

平成 22 年 6 月 1 日現在

研究種目：基盤研究(B)
 研究期間：2006～2009
 課題番号：18300154
 研究課題名（和文）集積化電気化学マイクロポンプを利用した人工シナプスの開発
 研究課題名（英文）Development of an Artificial Synapse using an Integrated Electrochemical Micropump
 研究代表者
 吉見 靖男 (YOSHIMI YASUO)
 芝浦工業大学・工学部・准教授
 研究者番号：30267421

研究成果の概要（和文）：

本研究の最終目的は、特定複数の神経細胞刺激をピンポイント的に刺激できる集積化マイクロポンプを開発し、中枢神経系に情報を直接伝達するインターフェイス（人工シナプス）に発展させることにある。ポリジメチルシロキサン（PDMS）を主材として、水の電気分解を利用して、内容液を吐出およびそれを制御するチップ型バルブ付ポンプを開発した。このポンプによって、秒単位の吐出制御が可能であることが確認された。さらにこのポンプを使って、アメフラシ神経に伝達物質を供給することにより、興奮性シナプス後電位を誘発することも確認された。また本研究では、ポンプの性能を評価するために、複数の神経の活動を監視する方法が必要である。申請者は、アメフラシの神経を膜電位感受性色素で染色し、蛍光顕微鏡によるイメージングで膜電位を検出する方法を確立した。カリウムチャンネルブロック剤であるテトラエチルアミン塩化物で、活動電位を拡張することにより、神経の興奮の伝達を簡便に検出できる。この方法によって、マイクロポンプによって伝達される情報を解析できると考えられる。

研究成果の概要（英文）：

The final purpose of this project is a development of integrated micropumps working as an interface between electric circuits and neurons or an artificial synapse. We developed a chip of micropump with microvalve using electrodecomposition of water as a driving force. The chip can control the jetting with punctuality to the second. The pump could induce excitatory postsynaptic potential of *Aplysia* neuron by neurotransmitter administration. We developed also voltage imaging for central nerve system for evaluation of the ability of the interface. It has been difficult to detect the action potential of *Aplysia* neuron by voltage imaging. We succeeded in the detection of the action potential by prolonging by tetraethylammonium chloride as a potassium channel blocker. The technologies developed in the project will help the development of neuronal interface by neurotransmitter administration.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2006年度	6,800,000	2,040,000	8,840,000
2007年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2008年度	1,900,000	570,000	2,470,000
2009年度	1,900,000	570,000	2,470,000
総計	11,800,000	3,540,000	1,5340,000

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：人間医工学・医用生体工学・生体材料学

キーワード：電気化学マイクロポンプ、電気化学マイクロバルブ、ポリジメチルシロキサン、

神経細胞、膜電位イメージング、アメフラシ、神経節、カリウムイオンチャンネルブロック剤

1. 研究開始当初の背景

人工心臓などの循環器系人工臓器や、人工腎臓などの代謝系人工臓器の発展は目覚ましい。これらに比べると、感覚系人工臓器である人工感覚器の発展は著しく遅れている。人工感覚器は、電子カメラやマイクロホンで捉えた画像、音声を脳・神経系に認識させるデバイスである。既に実用段階にある人工内耳や人体試験段階にある人工網膜は、神経に接触した電極に通電させることで刺激し、それぞれ音声・画像を認識させる仕組みである。いずれも患者の生活の質を著しく高めることが示されており、期待が大きい。しかし人工網膜は、輪郭をおぼろげに認識させているに過ぎず、人工内耳については、「雑音を慣れによって音声と認識させているに過ぎない」との厳しい批判がある。認識させる情報の解像度については、ますますの改良が求められている。

本来、脳・神経系は、神経細胞を素子とした高度な並列処理機構を有している。したがって人工感覚器における情報伝達は、本来、信号に応じて、複数の特定細胞のシグナル個別にかつ選択的に刺激する必要がある。しかし電気刺激法では、電場によって複数の神経を一纏めに同時刺激するもので、選択性を細胞レベルにまで上げることは不可能である。細胞レベルの選択的細胞刺激には、シナプスと同様に、神経細胞に特定の神経伝達物質を供給する方法が望ましいと考えられる。基礎研究においては、神経細胞の刺激には、光照射によって神経伝達物質を遊離する化合物（ケージド化合物）が用いられている。この方法は、選択性が極めて高く、神経伝達物質の作用機構や情報処理における役割について、重要な知見を与えた。ただしこの方法はレーザー光源や分光器など大がかりな装置を必要とするため、人工臓器に用いることは困難である。

2. 研究の目的

申請者は、微小なポンプを用いて特定の神経細胞に神経伝達物質を供給し、そのシグナルを制御する方法を考えた。この方法は、神経への情報伝達を生体のシナプス同

様、神経伝達物質の供給にゆだねているため、「人工シナプス」という呼び名が適切であろう。

申請者は、神経細胞への神経伝達物質溶液の微量高速投与を目的とした、電気化学マイクロポンプを開発している。この電気化学マイクロポンプは、筑波大学の鈴木博章教授らが開発したものである。白金黒電極上で 1.2V 以上の電位を印加すると水は迅速に電気分解して気泡を発生し、また電位印加を停止すれば、その気泡は、迅速に消滅する。したがって、この気泡発生をポンプの推進力に利用すれば、制動性に富んだ微量送液が可能になる。またピエゾ素子などに比べると構造が単純で、高密度な集積化に期待できる。

申請者は、鈴木らの電気化学マイクロポンプの改良型を試作し、アメフラシ神経細胞への神経伝達物質投与を試みた。その結果、神経細胞の興奮や抑制を、リアルタイムで実現できた。電気化学マイクロポンプが、人工シナプスとして期待できるデバイスであることが示された。

本応募研究では、複数の神経細胞に細胞を投与することで、神経ネットワークの活動制御、ひいては神経ネットワークに疑似情報を認識させる方法を確立する。

本研究の申請前に開発していた電気化学ポンプは、白金黒電極をシリンジやガラス管に封入した構造なので、そのまま高密度に集積することは難しい。さらに、吐出後に内容液を再補充する機構を持っておらず、逐次的な神経刺激が難しかった。

そこで、シリコーン樹脂の一種であるポリジメチルシロキサン (PDMS) の微細加工法を利用して、集積可能なポンプ素子を開発する。さらに、水の電気分解を駆動源として、PDMS 製のダイアフラムで、内容液の供給流路を開閉し、吐出後の液の再補充を可能にした。

このポンプの性能を評価するためには、伝達物質投与に対する、複数の神経の膜電位応答を監視し、解析する必要がある。ガラス電極穿刺による従来の膜電位測定では、複数の細胞の膜電位変化をモニタリングできない。またアメフラシ神経は、カルシウ

ム感受性色素を取り込みにくく、カルシウムイメージングによる、神経シグナルの解析は難しい。

そのため本研究では、複数の神経のシグナルを解析するために、アメフラシ神経の膜電位イメージング法の開発を試みた。

3. 研究の方法

(1) チップ型電気化学ポンプの開発

電気化学マイクロポンプを神経制御用デバイスとして用いるためには、吐出後に液を迅速に補充できなければならない。バルブの駆動力として、白金黒電極における水の電気分解を利用した。白金黒電極への電圧印加により発生した気泡は電極表面によく付着する。そして電圧印加を停止すると白金の触媒作用で発生した気体は水に戻り、気泡は消失する。この現象を動力源に利用し、ダイアフラムを变形させることで流路を開閉できるバルブ付きポンプを製作した(図1)。主材にはポリジメチルシロキサン(PDMS)を用いた。熱収縮ポリスチレン板にレーザープリンタで流路を描画し、加熱収縮することで鋳型を作製した。鋳型をPDMSで象ることで、バルブチャンバー、ポンプ部を形成したチップ状のパーツを作製した。これらのパーツを重ね合わせて接着し、電気化学マイクロポンプ/バルブを作製した。ポンプ部およびバルブチャンバーには白金黒電極を固定し、0.1 M 塩化カリウム水溶液を充填した。ポンプ部にエオシンイエローの水溶液を満たし、このポンプを蒸留水中で作動させ、吐出と充填の様子をCCDカメラで撮影した。

(2) 膜電位イメージング法の開発

膜電位感受性色素 Di-4-ANEPPS (3 mg)を、可溶化剤 Cremophor® EL 45 μ L、SL-15 培養液 405 μ L、エタノール 450 μ L の混合液に溶解し、ストック液として冷蔵庫に保管した。色素ストック液を 100mM の TEA を含む SL-15 培養液で 80 倍に希釈し、染色液を調製した。塩化マグネシウム水溶液に浸漬して麻酔した米国産アメフラシから腹部神経節を摘出した。この神経節の保護膜を、微小ハサミで切除した。その後、この染色液に 30 min 浸して染色し、培養液で洗浄した。蛍光画像を、蛍光顕微鏡に取り付けた膜電位イメージング用 CCD カメラ (MiCAM02, ブレインビジョン, 東京) で高速撮影した。蛍光強度の変化と膜電位変

化を対比させた。

4. 研究成果

(1) チップ型電気化学ポンプの開発

ポンプ用電極およびバルブ用電極に、3.0 V の作動電圧印加を印加した。ポンプ側の印加時間を 1.0 s に固定し、バルブ側印加時間を 0-10 s に変化させ、同時に印加を終了させた。その際の吐出開始と停止のタイムラグを図2に示す。バルブの作動時間が 2 s 以下では、吐出は見られなかった。これは、ポンプに対して後部にある流路の閉鎖が不十分なために、内容液が逆流したことに原因があると考えられる。バルブ作動時間 3 s 以上においては、作動電位を印加してから開始までにかかる時間は、バルブ側電圧印加時間にかかわらず約 1 s であった。一方停止までにかかる時間は、バルブ作動時間と共に長くなった。バルブ作動時間が長いと、ダイアフラムと流路が強く接着し、流路の再開に時間がかかるためと思われる。バルブおよびポンプの作動時間を制御することにより、溶液の吐出の開始および停止を秒単位で制御できることが示唆された。

さらにこのバルブ付きポンプの上面で、アメフラシ神経細胞を培養して、図3に示すようにアセチルコリンを投与した。図4に示すように、投与直後に興奮性シナプス後電位が神経細胞膜電位において検出され、神経インターフェイスへの応用の可能性が示唆された。

(2) 膜電位イメージング法の開発

アメフラシ神経節を膜電位感受性色素で染色して、蛍光強度を検出したところ、興奮性シナプス後電位を反映した膜電位変化は確認できたものの、活動電位を反映した膜電位の検出はできなかった。神経節を予め、プロテアーゼで処理すると、大部分の神経細胞の活動電位の時間幅が拡張され、蛍光イメージングに反映されたが、一部の神経については逆に時間幅が縮小され、かえって検出されにくくなった。この結果より、活動電位の時間幅を拡張すれば、活動電位を膜電位イメージングで検出できることが示唆された。

そこで、カリウムイオンチャンネルブロック剤であるテトラエチルアンモニウム塩化物 (TEA) で神経節を前処理し、膜電位イメージングを行った。

100 mM TEA 含有培養液中の神経節の蛍光画像を、記録した。神経束に固定した

銀線に3Vの電圧をパルス状(継続時間2ms、休止時間400ms)に印加し、活動電位を反映した蛍光強度変化の検出を試みた

図5に蛍光画像と、同定された神経細胞における測定開始時からの相対蛍光強度変化を示す。TEAで処理した神経節は、電気刺激を受けている間に活動電位と見られる高頻度なスパイク状の蛍光強度変化を発生させた。しかし、TEAを加えずに同じ処理を施したものは、活動電位と見られる蛍光強度変化を生じさせなかった。これは、TEAの作用でカリウムチャンネルがブロックされることによって活動電位の時間幅が拡張され、蛍光画像の低いサンプリング速度でも検出しやすくなったためと考えられる。TEAは確実に活動電位を拡張できると考えられる。したがって、TEAで前処理してアメフラシ神経の膜電位イメージングを行えば、電気化学マイクロポンプによって刺激された神経細胞を確実に特定することができる。この技術は、電気化学マイクロポンプを神経と電子回路の間のインターフェイスとして用いる上で、不可欠である。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計0件)
(現在、二報を投稿準備中。)

[学会発表] (計22件)

- ① 吉見 靖男, 青木一途: テトラクロロアンモニウム塩を用いたアメフラシ神経活動電位の光学的検出, 日本膜学会第32年会(東京), 2010年5月
- ② 吉見 靖男, 青木一途, 松本直子, 島村秀: 蛍光膜電位イメージングによるアメフラシ神経ネットワーク解析の可能性, 電気化学会第77年会(富山), 2010年3月
- ③ 松本直子, 吉田優太, 青木一途, 島村秀, 吉見 靖男: アメフラシ培養神経細胞の蛍光膜電位イメージング法の確立, 電気化学会第77年会(富山), 2010年3月
- ④ 吉見 靖男, 青木一途, 島村秀, 松本直子: アメフラシ中枢神経の膜電位イメージングにおけるプロテアーゼ処理の効果に関する考察, 化学工学会第75年会(鹿児島), 2010年3月
- ⑤ 島村秀, 青木一途, 吉見 靖男: アメフラシ中枢神経系膜電位イメージングのためのプロテアーゼ処理の至適条件, 第12回 化学工学会学生発表会東京大会, 2010年3月
- ⑥ Y. Yoshimi, K. Aoki, N. Matsumoto: Fluorescent voltage imaging of central nerve system in Aplysia for analysis of neuronal network, Asia Pacific Biochemical Engineering Conference (APBioChEC'09), 神戸, 2009年11月
- ⑦ K. Aoki, N. Matsumoto, Y. Yoshimi: Analysis of Aplysia Neuronal Network by Fluorescent Voltage Imaging, AIChE Annual Meeting, Nashville, 2009年11月
- ⑧ 青木一途, 松本直子, 吉田優太, 吉見 靖男: 蛍光膜電位イメージングによる単一アメフラシ神経細胞のシグナル解析, 化学工学会第41回秋季大会(広島), 2009年9月
- ⑨ 松本直子, 吉田優太, 青木一途, 赤池哲, 吉見 靖男: アメフラシ培養神経細胞の光学的膜電位イメージング法の開発, 日本膜学会第31年会(東京), 2009年5月
- ⑩ 吉見 靖男, 赤池 哲: 集積化電気化学ポンプ/バルブの開発およびそれを用いた神経シグナル制御, 電気化学会76回大会(京都), 2009年3月
- ⑪ 吉見 靖男, 青木一途, 赤池 哲: 蛍光膜電位イメージング法によるアメフラシ神経の中樞パターン機構シグナルの検出, 電気化学会76回大会(京都), 2009年3月
- ⑫ 吉見 靖男, 青木一途, 吉田優太, 赤池 哲: 神経ネットワーク解析を目的としたアメフラシ神経の膜電位イメージング法の開発, 化学工学会第74年会(横浜), 2009年3月
- ⑬ 赤池哲, 吉見 靖男: 液の再充填が可能な電気化学マイクロポンプ・バルブの開発, 第46回日本人工臓器学会大会(東京), 2008年11月
- ⑭ 赤池 哲, 青田尚之, 吉見 靖男: 集積化が可能な電気化学マイクロポンプ・バルブの開発, 第40回 化学工学会秋季大会(仙台), 2008年9月
- ⑮ 吉見 靖男, 青木一途, 赤池 哲: 神経細胞の膜電位イメージングにおけるプロテアーゼ処理の効果, 第40回 化学工学会秋季大会(仙台), 2008年9月
- ⑯ 吉見 靖男, 青木一途, 赤池 哲: アメフラシ神経の蛍光膜電位イメージング, 第46回化学センサ研究発表会(沖縄), 2008年8月
- ⑰ 青木一途, 吉見 靖男: プロテアーゼ前処理とDi-4-ANEPPS染色によるアメフラシ神経細胞の蛍光イメージング, 第31回日本神経科学大会(東京), 2008年7月
- ⑱ 青木一途, 吉見 靖男, 赤池 哲, 青田尚之: アメフラシ神経膜電位の蛍光イメージング法の開発, 日本膜学会第30

年会(東京), 2008年5月

①⑨ 吉見 靖男, 赤池 哲, 青田尚之: 白金黒電極とダイアフラムを用いた電気化学バルブの至適設計, 電気化学会第75回大会(甲府), 2008年3月

②⑩ 吉見 靖男, 青田尚之: 神経シグナル制御を目的とした電気化学マイクロポンプチップの開発, 電気化学会第75回大会(甲府), 2008年3月

②⑪ Y. Yoshimi, K. Aoki, S. Akaike, N. Aota: Voltage imaging of Aplysia neuron in ganglion for analysis of neuronal network, 13th YABEC (Young Asian Biochemical Engineers' Community) Symposium, Seoul, 2007年11月

②⑫ Y. Yoshimi, K. Aoki, S. Akaike, N. Aota: Stabilized voltage imaging of Aplysia neuron in ganglion using di-4-ANEPPS and agarose gel, Annual Meeting of Society for Neuroscience, San Diego, 2007年11月

[図書] (計0件)

[産業財産権]

出願状況 (計1件)

名称: 微細パターン形成方法

発明者: 吉見 靖男

権利者: 芝浦工業大学

種類: 特許

番号: 特開 2010-31084

出願年月日: 平成 20年 7月 25日

国内外の別: 国内

6. 研究組織

(1)研究代表者

吉見 靖男 (YOSHIMI YASUO)

芝浦工業大学・工学部・准教授

研究者番号: 30267421

(2)研究分担者

無し ()

(3)連携研究者

金森 敏幸

(KANAMORI TOSHIYUKI)

産業技術総合研究所・

器官発生工学研究ラボ・

主任研究員

研究者番号: 50356797

八木 透 (YAGI TOHRU)

東京工業大学・

大学院情報理工学研究科・

准教授

研究者番号: 90291096

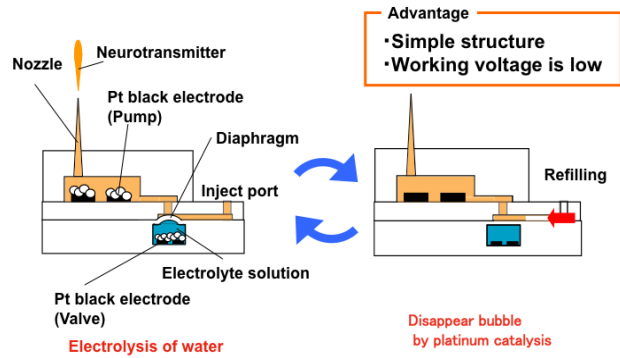


図 1: 電気化学ポンプ/バルブの構造および作動原理

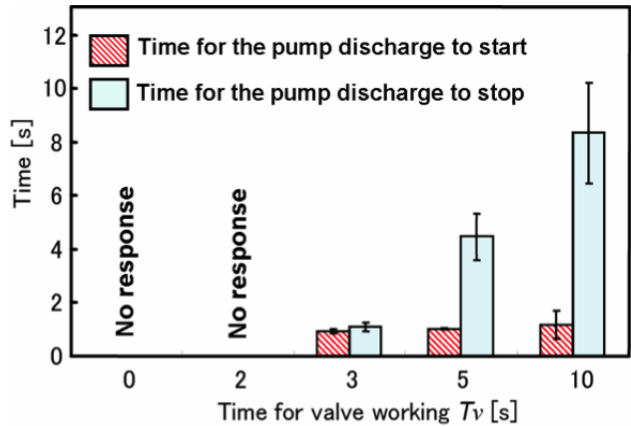


図 2: 吐出開始または吐出停止のタイムラグとバルブの作動時間の関係 (ポンプ作動時間 1s)

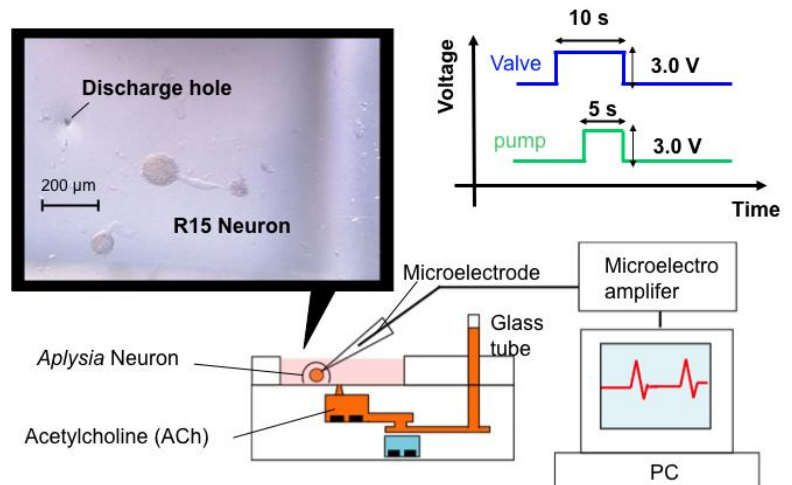


図 3: 電気化学マイクロポンプ/バルブによる神経細胞の刺激

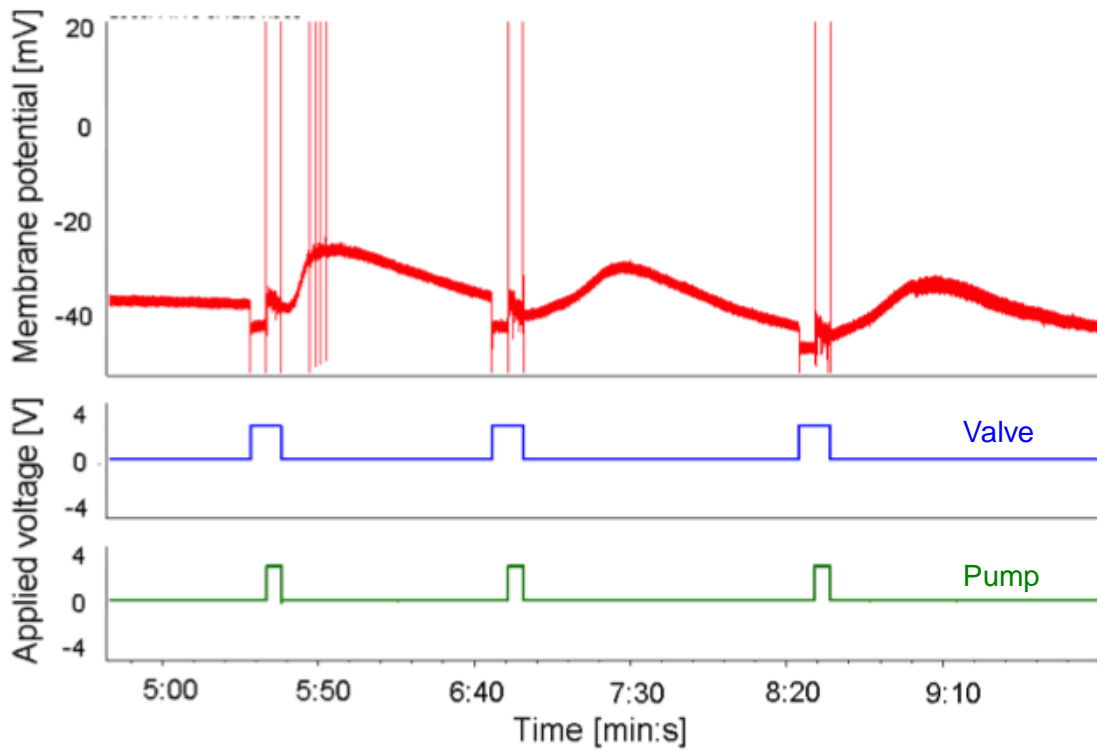


図4: 電気化学マイクロポンプ/バルブからのアセチルコリン投与による膜電位の変化

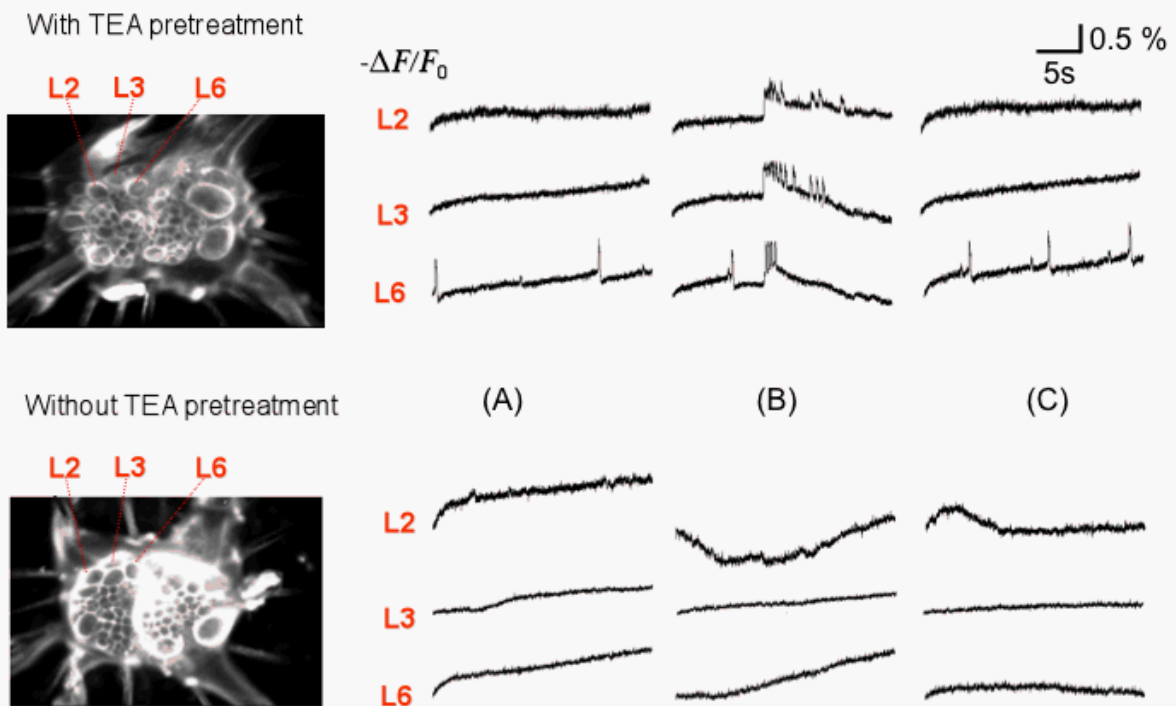


図5: 同定されたアメフラシ腹部神経節の蛍光イメージングおよび蛍光強度変化 (A) 電気刺激前、(B) 電気刺激中、(C) 電気刺激後