

平成 26 年 6 月 16 日現在

機関番号：13904

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23615005

研究課題名(和文) CCD型イオンイメージセンサを利用した安全に優れた非侵襲型動的イオン測定法の開発

研究課題名(英文) Development of Safely Non-Invasive Dynamic Measurement Method of Extracellular Ions Using CCD-type Ion Image Sensor

研究代表者

服部 敏明 (Hattori, Toshiaki)

豊橋技術科学大学・工学(系)研究科(研究院)・准教授

研究者番号：80198762

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円、(間接経費) 1,230,000円

研究成果の概要(和文)：生きた細胞を化学的外部刺激することで放出・吸収される細胞外の特定イオン濃度変化を追跡するために、可塑化ポリ塩化ビニル(PVC)膜を用いたCCD型イオンイメージセンサ(マイクロなイオン顕微鏡)を開発した。開発したマイクロなイオン顕微鏡は、細胞観察に特別な影響を与えることなく、実際に生きた細胞のイオン濃度観察に適用できた。また、安全性の高い非侵襲イオン計測法にするために、可塑化PVC膜イオンセンシング膜の細胞培養に与える阻害効果について調べた。

研究成果の概要(英文)：We developed several new CCD-type ion image sensors using plasticized poly(vinyl chloride) membrane (Ion Microscopes), in order to monitor extracellular concentration of analyte ions released from cells or adsorbed into cells by stimulation of chemicals. The ion microscope developed could be applied to micro observation of living cells actually. In addition, we examined inhibiting effect of plasticized poly(vinyl chloride) membranes during the cultivation of cells, and we obtained some guidelines of repairing safety and non-invasive membrane.

研究分野：安全環境計測法

科研費の分科・細目：安全環境計測法

キーワード：CCD型イオンイメージセンサ 半導体アレイセンサ 非侵襲測定 可塑化ポリ塩化ビニル膜 生細胞観察
イオン交換樹脂 肥満細胞 細胞外イオン濃度

1. 研究開始当初の背景

細胞や細胞株を安全な方法で管理育成することは、医学および生化学の分野で要求されている。そのため、生きた細胞や細胞株の状態を知る生体物質やイオンの非侵襲計測が望まれている。しかし、光学顕微鏡による形態観測はできても、細胞が吸収・放出する分子やイオンなどの生体重要物質を非侵襲で培養環境に影響を与えずに計測することは難しい。生体中の分子やイオンを動的に計測する蛍光プローブ法では、プローブ分子が引き起こす化学反応が生きた細胞に与える影響は問題である。また、質量分析やクロマト法を用いたマイクロダイアリス分析では、細胞培養環境から一部成分を搾取することが必要で、生存環境を必然的に変化させてしまう。特に、今後の再生医学において細胞を取り出して培養増殖させて自己に再移植させる場合には、安全な非侵襲型による生体重要物質の計測が必要とされている。

申請者らは、電荷結合素子 (CCD) の技術を利用した新規なセンサに着目し、CCD 型カリウムイオンイメージセンサの開発に成功した。CCD 型イオンセンサは、膜電位変化に依存した電荷蓄積層の電荷量を計測し、電荷転送機構により従来の電界効果トランジスタ型イオンセンサ (ISFET) よりイメージングに適した特性を持っている。また、サブマイクロオーダーの分解能での 1024 画素のカリウムイオン像を 0.2 秒毎に取得できるため、Light-Addressable Potentiometric Sensor (LAPS) のような走査型半導体イメージセンサと比べても画像取得速度が速く、動画計測が可能である (図 1)。可塑化ポリ塩化ビニル (PVC) 膜 CCD 型イオンセンサを用いて、ナトリウムイオン濃度 10^{-2} M の濃い溶液中に 10^{-4} M の薄い溶液をすばやく添加したときの動画計測を行った。添加直後に局所的な薄い濃度への変化を捉え、次の瞬間に、混合によって濃い濃度に変化していく現象を捉えられた。これは、濃度変化に対する追従性が優れていることばかりでなく、通常のイオンセンサでは捉え難い微小な濃度変化をも捉えることができることを示唆している。例えば、溶液全体での濃度変化が小さくても、瞬時でも局所で濃度変化が起これば、その事象を追跡できることを示している。

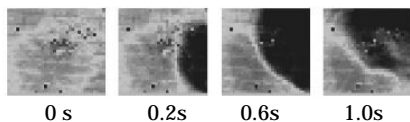


図 1 高濃度の塩化ナトリウム溶液 (10^{-2} M) に低濃度の塩化ナトリウム溶液 (10^{-4} M) を迅速に変えたときのナトリウムイオンのイメージ画像の変化

そこで、本研究では申請者らの開発した可塑化 PVC 膜 CCD 型イオンイメージセンサを用いて、実際の生きた細胞の周りのイオン濃度の計測に応用することは、同種の半導体イメージセンサが安全性に優れた細胞計測法になるかを検証する意味を持っている。

2. 研究の目的

本申請研究の目的は、申請者らがこれまで研究開発してきた CCD 型イオンイメージセンサを、生物現象におけるイオン濃度の増減現象の観察に展開することにある。すなわち、ミクロな領域のイオン濃度変化を測定できる申請者らの方法が、外部刺激で変化する細胞外のイオン濃度変化を追跡することにおいてどれくらい威力を発揮する測定技術になりえるかについて、以下の(1)~(3)の実験で検証した。

- (1) 先ず、イメージセンサが微量領域のイオンの動画測定に確実に適用できることを明らかにするために、ナトリウムイオンイメージセンサを用いて直径 1 mm 以下のイオン交換樹脂 1 粒のイオン交換挙動を研究した。
- (2) 数日間培養した PC12 細胞を培地ごとカルシウムイオンイメージセンサ上に移し、アスコルビン酸刺激に対する細胞のカルシウム吸収挙動を観察した。
- (3) ラットの腹腔から取り出した肥満細胞を有機アミン類に応答するイオンイメージセンサ上に移して、Compound 48/80 に対する細胞のヒスタミン類放出挙動を観察した。

また、安全性の高い非侵襲イオン計測法を目指して、CCD 型イオンイメージセンサに適用可能なイオンセンシング膜について、そのイオン応答性の評価、培養細胞に与える影響、その安全性について、(4)の実験で調べた。(4)カルシウムイオンイメージセンサにおける 2 種類の可塑化 PVC 膜を作製し、それぞれの膜の電気化学特性と HeLa 細胞培養に与える影響を調査し、安心安全なイオンイメージ測定法における指針を得た。

3. 研究の方法

(1) ナトリウムイオンイメージセンサを用いたイオン交換樹脂一粒のイオン交換挙動の観察 ナトリウムイオンに反応するイメージセンサ ($32 \times 32 = 1024$ ピクセル) を作製し、ナトリウムイオンに対する応答特性、およびカルシウムイオンやバリウムイオンに対する応答特性を混合溶液法により調べた。

陽イオン交換樹脂をナトリウムイオン型に調製し、イオン交換樹脂 1 粒と NaCl の水溶液をイメージセンサに設置した。(図 2)

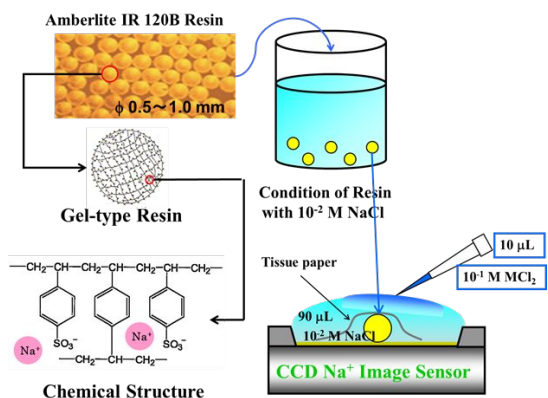


図 2 イオン交換樹脂の設置と観察
その後、10 倍濃度の CaCl_2 (または BaCl_2) を添

加したことによるナトリウムイオンの濃度変化を動画計測した。

(2)カルシウムイオンイメージセンサを用いた培養ゲル中の PC12 細胞の刺激による細胞外カルシウムイオン濃度変化の観察

カルシウムイオンに反応するイメージセンサ(32x32=1024 ピクセル)を作製し、その応答特性を評価した。

PC12 細胞をコラーゲンシート上で、数日間培養した。培養後に図3のようにコラーゲンシートの一部を切り取り、培養液とともにカルシウムイ

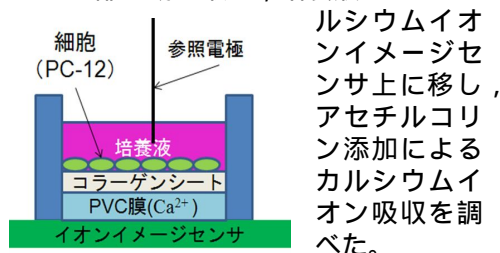


図3 コラーゲンシート上の PC12 の観察のモデル

(3)有機アミンイオンイメージセンサを用いたラット肥満細胞の刺激によるヒスタミン類放出の観察

ヒスタミン類に反応するイオンイメージセンサ(128x128=16384 ピクセル)を作製し、その応答特性を評価した。

生後7週目のラットの腹腔から肥満細胞を取り出し、遠心分離法により肥満細胞を精製する操作を行った。その後、少量の肥満細胞溶液を有機アミンイオンイメージセンサ上に移し、微量の Compound48/80 を添加して、ヒスタミン類の放出挙動を観察した。図4はセンシングピクセルと肥満細胞の関係を模式的に表している。

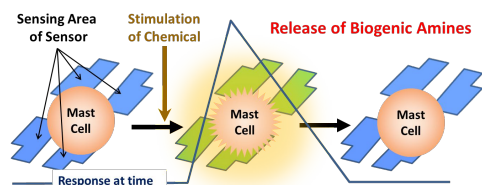


図4 肥満細胞とセンシングピクセルサイズの関係

(4)2 種類のカルシウムイオンイメージセンサ用可塑性 PVC 膜の HeLa 細胞培養に与える影響

2 種類のカルシウムイオンイメージセンサ用のセンシング膜を作製し、カルシウムイオンに対する応答特性を評価した。

同様のセンシング膜をガラス管内に作製し、水をそのガラス管に加えて、6 時間そのままにして長時間接した溶液を調製した。その溶液中に溶け出した可塑剤の量をガスクロマトグラフィーで測定した。

先の長時間接した溶液の一部を用いて混合培養溶液を調製した。この混合培養液を用いて、HeLa 細胞を 5%の二酸化炭素雰囲気下 37 のインキュベーター中で培養した。培養した細胞は、所定の時間に取り出し、その状態を倒立光学顕微鏡で観察した。

4. 研究成果

(1)ナトリウムイオンイメージセンサを用いたイオン交換樹脂一粒のイオン交換挙動の観察

ナトリウムイオンに対して応答する最適膜を調製して、イメージセンサを作製した。作製したナトリウムイオンイメージセンサは、 10^{-5} M から 10^{-1} M の濃度に対して 30mV/decade の応答を持ち、カルシウムイオンとバリウムイオンに対する選択係数は、それぞれ、 $10^{-2.8}$ と $10^{-3.2}$ であり、ナトリウムイオンに選択的に応答することが分かった。

このイメージセンサを用いてイオン交換を行ったときの動画計測における画像を図5に示す。カルシウムイオン添加により、

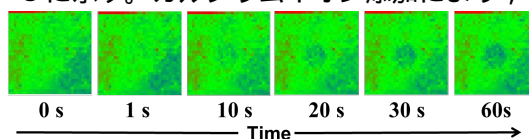


図5 Ca²⁺添加によるの Na⁺-Ca²⁺イオン交換挙動

ナトリウムイオンとのイオン交換がゆっくり起こり、イオン交換樹脂1粒のシルエットが徐々に現れた。一方、バリウムイオンを添加した場合には、イオン交換速度がカルシウムイオンの場合よりも2倍速く起こることが分かった。これを、ネルンスト-プランクの式を用いて解析すると、バリウムイオンのイオン交換樹脂での選択係数が、カルシウムイオンの2倍であること一致した。これにより、作製したナトリウムイオンイメージセンサが微量なイオン交換反応の濃度変化を確実に捉えていることが分かった。

(2)カルシウムイオンイメージセンサを用いた培養ゲル中の PC12 細胞の刺激による細胞外カルシウムイオン濃度変化の観察の成果

カルシウムイオンに対して応答する最適膜を調製して、イメージセンサを作製した。作製したカルシウムイオンイメージセンサは、 10^{-4} M から 10^{-1} M の濃度に対してネルンスト電位に近い応答を持ち、カリウムイオン、ナトリウムイオン、マグネシウムイオンに対する選択係数は、それぞれ、 $10^{-2.7}$ 、 $10^{-2.9}$ 、 $10^{-3.4}$ であり、カルシウムイオンに選択的に応答することが分かった。

PC12 細胞を培養液とともにカルシウムイオンイメージセンサ上に移し、アセチルコリン添加によるカルシウムイオン吸収を調べた動画画像の結果を図6に示す。

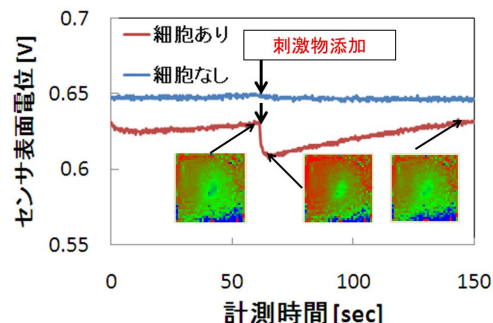


図6 PC12 細胞動画画像とその電位-時間応答曲線

PC12 細胞がある部分にアセチルコリンが加わると、カルシウムイオン濃度が一時的に低下し、徐々にカルシウムイオン濃度が回復していることが分かる。PC12 細胞がない部分ではこのような変化は起こらない。すなわち、PC12 細胞がアセチルコリンで刺激されると細胞外カルシウムイオンを細胞内に取り込むため、カルシウムイオンが一時的に低下することが示唆された。これは、PC12 細胞が生きたままその変化を捉えられたことを示す。(3)有機アミンイメージセンサを用いたラット肥満細胞の刺激によるヒスタミン類放出の観察の成果

ヒスタミンに対して応答する最適膜を調製して、イメージセンサを作製した。作製した有機アミンイメージセンサは、カリウムイオン、ナトリウムイオン、マグネシウムイオン、カルシウムイオンが共存する溶液中で 10^{-5} M から 10^{-2} M のヒスタミンに対して選択的に応答することが分かった。

少量の肥満細胞溶液を有機アミンイメージセンサ上に移し、微量の Compound48/80 を添加して、ヒスタミン類の放出挙動を観察した動画画像の一部を図 7 に示す。

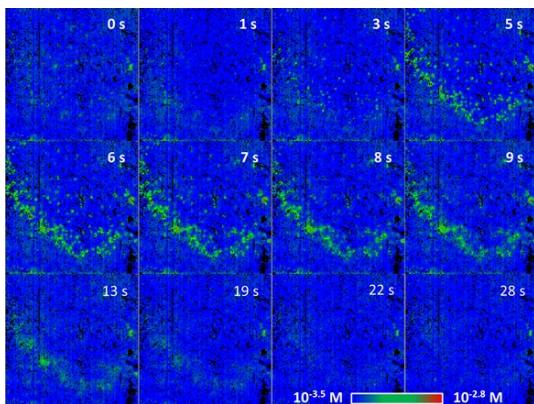


図 7 肥満細胞から放出される有機アミン(ヒスタミン) Compound48/80 を添加後 5 秒から 9 秒まで著しいヒスタミンの濃度が増加し、30 秒後にはヒスタミン量は減少した。この結果は、これまでの単一のイオンセンサでは、このような刺激剤の少ない量での肥満細胞のヒスタミンの放出を捉えられたことはなかった。また、刺激剤をさらに添加するとヒスタミンの放出が起こることが観測され、生きたまま肥満細胞が着実に捉えられていることが明らかとなった。

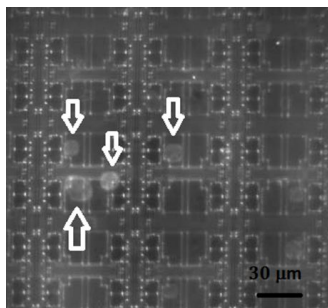


図 8 イメージセンサ上の肥満細胞の顕微鏡写真

図 8 はアミンイメージセンサ上の肥満細胞の光学顕微鏡写真で、1 ピクセルの上に 1 細胞が入る大きさになっている。

図 9 に肥満細胞 1 個がヒスタミン放出をした時の時間-有機アミン濃度曲線を示す。

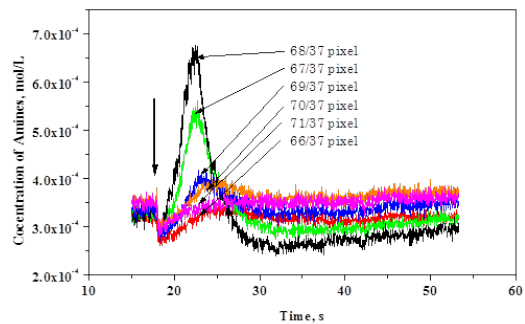


図 9 68/37 ピクセルとその周りのピクセルの時間-濃度曲線(中心部 68/37 以外に肥満細胞が無い状態)

このように顕微鏡ではなく、ヒスタミンの濃度変化を捉えることで、肥満細胞 1 個のヒスタミン放出をリアルタイムに捉えられたことは、世界初である。一方で、イオンイメージセンサが肥満細胞に与えるダメージが少ないために観察できたことを暗示している。(4)2 種類のカルシウムイオンイメージセンサ用可塑化 PVC 膜の HeLa 細胞培養に与える影響の成果

Ca-HDOPP-DOPP 膜と Ca-K23E1-NPOE 膜の 2 つの最適膜を調製して、電位応答特性を評価した。図 10 に示すように Ca-K23E1-NPOE 膜は 10^{-6} M 以下まで直線的な電位勾配を持つが、Ca-HDOPP-DOPP 膜は 3×10^{-5} M までしか電位勾配を持たなかった。

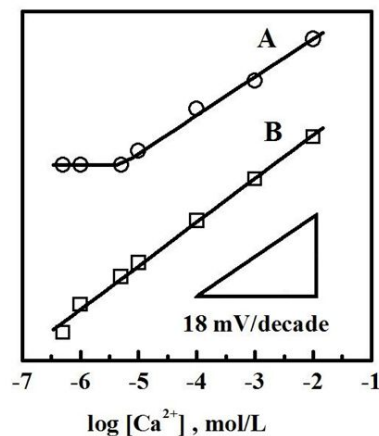


図 10 Ca-HDOPP-DOPP 膜(A)と Ca-K23E1-NPOE 膜(B)の電位応答特性

この結果は、Ca-K23E1-NPOE 膜からイオノフォアである K23E1 が漏れにくいと低濃度まで測定できるものと考えられた。

次に、ガスクロマトグラフィーを用いて、それぞれの膜からの可塑剤の漏れを評価した。Ca-HDOPP-DOPP 膜は可塑剤の漏れが認められたが、Ca-K23E1-NPOE 膜は可塑剤の漏れが認められなかった。ガスクロマトグラムを図 11 と図 12 に示す。

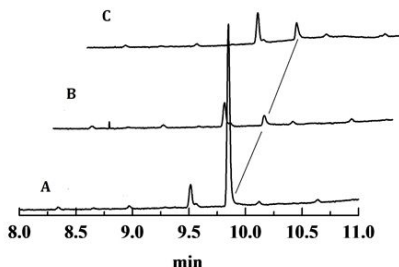


図 11 Ca-HDOPP-DOPP 膜は可塑剤の漏出 A, ヘキサン中 6 ppm の DOPP; B, ヘキサン中 0.6 ppm の DOPP; C, 長時間接触した溶液に含まれていた DOPP

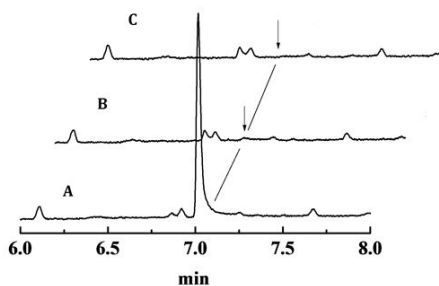


図 12 Ca-K23E1-NPOE 膜からの可塑剤の漏出 A, ヘキサン中 3.7 ppm の NPOE; B, ヘキサン中 0.15 ppm の NPOE; C, 長時間接触した溶液に含まれていた NPOE (検出限界以下のため検出できなかった)

可塑化 PVC 膜に長時間接触した溶液を含む培養溶液での HeLa 細胞の培養への影響を評価した。Ca-HDOPP-DOPP 膜および Ca-K23E1-NPOE 膜と接触した溶液による培養では、いずれも細胞を殺傷する毒性はなかった。しかし、培養初期に細胞増殖を抑制することが観察された。その抑制効果は、Ca-HDOPP-DOPP 膜と接触した溶液の方が Ca-K23E1-NPOE 膜と接触した溶液よりも大きいことが分かった。また、いずれも、2 回目に接触した溶液を使った培養では、初期の細胞増殖抑制が少なくなることが分かった。結論として、細胞のカルシウムイオンをイメージングする可塑化 PVC 膜として、Ca-K23E1-NPOE 膜は Ca-HDOPP-DOPP 膜より優れていること、また、膜を使用する前に長時間水に接触した後で、可塑化 PVC 膜を使うことが有効であることが分かった。

安心して安全なイオンイメージ測定を行うセンサ膜の条件として、電位応答が低濃度まで行えるかどうかや可塑剤の漏れがないかは、重要な項目であることが明らかとなった。一方で、コンディショニングのようなあらかじめ水溶液で膜を暴露させることは、細胞観察前にダメージを減らすのに有効であると考えられた。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計 5 件)

原著論文 3 件

Toshiaki Hattori, Youichiro Tamamura, Kenta Tokunaga, Takashi Sakurai, Ryo Kato, Kazuaki Sawada, Two-Dimensional Microchemical Observation of Mast Cell Biogenic Amine Release Monitored by 128 × 128 Array-type CCD Ion Image Sensor, *Analytical Chemistry*, 査読あり, 86 巻, 2014, pp.4196-4201.

服部敏明, 櫻井孝司, 加藤絢巳, 加藤 亮, 平田幸夫, 澤田和明, 2014, *分析化学*, 査読あり, 63 巻, 2 号, 2014 年, pp.119-126.

Toshiaki Hattori, Yoshitomo Masaki, Satoshi Mori, Daichi Miyamoto, Ryo Kato, and Kazuaki Sawada, CCD-type Sodium Ion Image Sensor: Dynamic Observation for Ion-exchange Reactions of a Single Na-type Cation-Exchange Resin Bead, *Electroanalysis*, 査読あり, 24 巻, 2012, pp.114-120.

総説 2 件

服部敏明, 櫻井孝司, 二川雅登, 飛沢健, 太齋文博, 奥村弘二, 澤田和明, 「CCD 型イオンイメージングデバイス」, *Electrochemistry*, 査読あり, Vol. 82 No. 4, pp.288-293, 2014.

服部敏明, 櫻井孝司, 澤田和明 「CCD 型イオンイメージセンサを用いるバイオイメージング」, *月刊画像ラボ*, 査読無し, 11 月号, pp.8-13, 2013.

〔学会発表〕(計 11 件)

国際会議発表 7 件

T. Hattori, T. Sakurai, K. Okumura, F. Dasai, and K. Sawada, Label-Free Real-time Chemical Observation of Living Cells Using a New CCD-type Ion Image Sensor, *Pittcon Conference*, 2014, Chicago, Illinois, USA (2014).

T. Hattori, Y. Tamamura, K. Tokunaga, T. Sakurai, R. Kato, K. Sawada, CCD-Type Organic Cation Image Sensor: Direct Observation of Biogenic Amine Release from Mast Cells, *ASIANALYSIS XII The Twelfth Asian Conference on Analytical Sciences*, 2H1-AM2, Fukuoka, Japan (2013).

T. Hattori, CCD-type ion image sensor with plasticized PVC membrane for a micro-observation tool, *German-Japanese Mini-Workshop on Nano- and Biotechnologies*, 24th of May 2012, Aachen University of Applied Sciences, Campus Jülich Gerling Pavillon, Germany (2012).

H. Taki, T. Sakurai, Y. Masaki, T. Hattori, K. Takahashi, S. Terakawa, M. Ishida, K. Okumura, K. Sawada, Label-free

real-time imaging of $[Ca^{2+}]_i$ in endocrine cell by an ion image sensor-based chemical microscopy. 2012 International Symposium on Chemical Environmental Biomedical Technology, September 2-5, Tainan, Taiwan (2012).

T. Hattori, K. Okumura, and K. Sawada, CCD-type Ion Sensitive Image Sensor for Rapid Monitoring Biological Cells and Tissues, Pittcon Conference, 2012, Orlando, Florida, USA (2012).

Y. Tamamura, Y. Tamai, K. Okumura, R. Kato, K. Sawada, and T. Hattori, CCD-type hydrophobic cation sensitive image sensor for measurement of acetylcholine, The Asia-Pacific Interdisciplinary Research Conference 2011, Toyohashi, Japan (2011).

T. Hattori, M. Yoshitomo, S. Mori, D. Miyamoto, R. Kato, and K. Sawada, Dynamic Observation on Ion Exchange of a Grain of Na-type Cation Exchange Resin Using CCD Sodium Ion Selective Image Sensor, Mátrafüred 2011 International Conference on Electrochemical Sensor, Dobogókő, Hungary (2011).

国内学会発表 4 件

服部敏明, 櫻井孝司, 加藤亮, 平田幸夫, 澤田和明, 安全安心な細胞・組織の動態観察法として可塑化 PVC 膜 CCD 型イオンイメージセンサの開発, Separation Science 2013, G10, 東京都産業技術センター(東京)(2013)

玉村葉一郎, 加藤亮, 澤田和明, 服部敏明, 脂溶性陽イオンに反応するイオンイメージセンサの応用, 日本分析化学会 61 年会, K1005, 金沢大学(金沢市), (2012)

服部敏明[招待講演]「イオンイメージセンサによる非侵襲顕微観察へ」第 43 回 中部化学関係学協会支部連合秋季大会「未来を支える分析化学」, 名古屋工業大学(名古屋), (2012)

滝 秀範, 正木良知, 服部敏明, 高橋一浩, 櫻井孝司, 寺川 進, 石田 誠, 奥村弘二, 澤田和明, Ca^{2+} イメージセンサを用いた PC12 細胞応答のリアルタイム解析, 第 59 回 応用物理関係連合講演会, 16p-F8-3, 2012, 3, 早稲田大学

〔図書〕(計 1 件)

1 Kazuaki Sawada and Toshiaki Hattori, Image Sensor for Biological Application, Ed. by Kiyoshi Toko, Biochemical Sensors: Mimicking Gustatory and Olfactory Senses, Pan Stanford Publishing, 18-29, (2013)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

服部敏明 (HATTORI, Toshiaki)
豊橋技術科学大学・大学院工学研究科・電気
電子情報工学・准教授
研究者番号: 80198762

(2) 連携研究者

奥村弘一 (OKUMURA, Koichi)
公益財団法人科学技術交流財団・知の拠点重
点プロジェクト総括部主幹研究員