

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 12 日現在

機関番号：12602

研究種目：若手研究(A)

研究期間：2011～2014

課題番号：23687023

研究課題名(和文) ナノ加工技術を利用したオンチップ・神経ネットワーク機能計測技術

研究課題名(英文) Development of on-chip neuronal network measurement device using nanotechnology

研究代表者

寺園 英之 (TERAZONO, Hideyuki)

東京医科歯科大学・生体材料工学研究所・助教

研究者番号：30398143

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 21,100,000円

研究成果の概要(和文)：ナノ加工技術を利用したオンチップ・神経ネットワーク機能計測技術として、デジタルカメラに使用されるCMOSセンサアレイを細胞外電位計測電極として使用することにより神経ネットワークの面的な動きを高密度に計測するシステムの開発を行った。ハイスピードカメラに使用されるマイクロレンズアレイ並びにフォトダイオードアレイを有さないCMOSセンサアレイを採用し、センサアレイ上で培養出来るよう加工を行った。その結果、培養液をセンサアレイ上に浸して電位を検出できる原理検討に成功した。また、センサアレイ上で細胞を高密度に配置するための技術開発に成功した。

研究成果の概要(英文)：We developed a system using CMOS sensor array to detect extracellular action potential. Since CMOS sensor array consists of huge number of electrode, if cells directly contact sensor array, extracellular action potentials of neuronal network comprehensively can be detected. To detect action potential on the sensor array, we selected a sensor array of high-speed camera without photodiode array and micro lens array. As the result, coating with silicone polymer prevented the crush by culture medium and cells could be cultivated on the sensor array. Furthermore, sensor array filled with culture medium could detected electrical change generated with function generator. This result indicated the potential to detect the extracellular action potential.

Furthermore, we developed a new technique to adhere matured cells on the sensor array using calcium alginate gel. Using this technique, neurons could be detach from culture dish and recultivate without destructing synaptic connection.

研究分野：生物物理

キーワード：センサアレイ 神経ネットワーク ナノ加工 オンチップ CMOS

1. 研究開始当初の背景

我々は培養シャーレ上で神経細胞を特定の位置に配置し、神経伝達の方向性を制御し解析するオンチップ・神経ネットワーク計測技術の開発を行ってきた。その中で、神経ネットワークの情報処理に関して、現在神経ネットワークを同時に解析できる多点同時細胞外電位直接記録装置で計測しているが、測定原理上、神経細胞同士を点と点でつなげ仮想的条件でのみ解析されている。神経細胞はそれぞれの神経細胞と複雑に結合し情報処理を行いながら過疎的に変化するため、神経ネットワークを解析するためにはできるだけ多数の測定部位を設け、点と点ではなく面として解析する必要がある。

一方、ナノ加工技術の分野では、デジタルカメラで代表される CCD 技術はめざましい発展を遂げている。原理は光電効果を利用し、入射した光を電気に変換することでデジタルデータとして記録している。現在 CCD 素子一つ一つの素子はかなり高密度に配置できる技術が発達してきている。

そこで、CCD 素子の高密度に電位を測定できる特性を生かした神経細胞ネットワークの「面」的活動電位測定の可能性について思いついた。CCD センサアレイで神経活動を測定できれば神経ネットワークを面として解析でき、各シナプス間でどの様な変化が起き情報処理が行えるか明らかにできるとか考えている。さらにオンチップ・神経ネットワーク計測技術と組み合わせることで人工神経回路を CCD センサアレイ上で作製し、より詳細な神経ネットワークの動作原理を理解することを目指す。

2. 研究の目的

本研究は、半導体センサアレイ上で二次元的に複雑な神経ネットワークの情報伝達を計測することで、複雑な神経ネットワーク内の情報の流れを可視化することにある。これは複雑すぎて未踏領域であった神経細胞のネットワークレベルでの活動を計測できる初めての方法であり、得られた結果は、脳が電気信号を情報としてどの様に扱うか理解できる手がかりとなる。また、2 細胞間で神経の過疎性が証明されている論文は多いが、多細胞による神経ネットワーク上でそれぞれのシナプスがどの様な過疎的な変化を受けているか調べられた報告は未だない。

複雑な神経ネットワークを二次元的に同時に見ることで神経ネットワークの成熟過程を電気生理学的に検証できる点において独創性がある。これは、①複数のシナプスが存在する神経ネットワークにおいてどのシナプスが情報伝達経路として優先されるか、あるいは、②異なる情報をどの様にして同じ神経ネットワーク内で処理しているか明らかにする解析システムになる。いくつかのグ

ループにおいて脳スライスカルチャー系を用いたカルシウムイメージング法による多数の神経細胞の活動の同時測定に成功しているが、大規模で電気生理学的に測定できている報告はない。また、カルシウムイメージング法は侵襲性が高く、数時間の測定なら可能であるが、長期間に及ぶ測定はできない。そのため長期間に及ぶ幼弱期からの複雑な神経ネットワーク形成過程を測定する系は現在までに存在しない。そこで、本研究は「半導体センサアレイ上で的人工神経細胞ネットワークと機能計測法」を開発することを目標とした。

3. 研究の方法

(1) 半導体センサアレイ計測システム構築

通常、デジタルカメラで使用されるセンサアレイは単体で販売されておらず、すでにマイクロレンズアレイ、フォトダイオードが設置されたものが販売されている。また、最初から開発すると巨額の費用がかかる。そこで、CCD あるいは CMOS に関わらずセンサアレイのみの選定を行った。データ取得速度 30fps あるいは 300fps の CMOS センサアレイを選定し、データ取得のためのコネクタ作製、取得ソフトウェア、解析ソフトウェアを含む装置開発を行った。

(2) コーキング剤の選定

細胞障害性がなく、培地による短絡を防ぐコーキング剤の選定を行った。種類としてエポキシ系 2 剤混合型、エポキシ系熱硬化型、シリコン系脱アルコール型、脱酢酸型、脱アセトン型、シリコン系 2 剤混合型について検討を行った。シリコン系コーキング剤はさらに高、中、低粘度型について検討を行った。35mm プラスチックシャーレ内に円形の土手をそれぞれのコーキング剤で作製し、その内部に培養液を満たしモデル細胞として心筋初代培養細胞を培養した。1x10⁵cells/dish とし、生存数を計測した。

(3) 初代培養凍結保存技術の検討

一般的に *in vitro* 実験環境下で使用される細胞株は神経発火など電気的な活動を表現系として現すものが少ない。そのためセンサアレイを評価する上では初代培養細胞を用いる事が最も良い。そこで、恒常的に初代培養細胞で実験するために、初代培養の凍結保存技術の検討を行った。方法として、細胞凍結保存液セルバンカー I とガラス化法を比較し、急速凍結、緩慢凍結法で比較を行った。

細胞融解後、生細胞数をカウントすることで比較した。

(4) センサアレイ上の細胞接着向上の検討

センサアレイ上で細胞外電位を測定するにあたり、電極と細胞が強く接着することが条件となる。しかしながら、細胞接着因子な

どをコーティングする通常の方法ではセンサアレイの金属表面上細胞を接着させることが出来ない。そこで、一旦別な場所で培養し、ある程度、細胞が成熟した段階で多電極上に再配置方法としてアルギン酸を用いて細胞を非侵襲的に培養シャーレから回収し再培養する技術を開発した。方法として、半導体分野で使用されるスピナーを用いて、アルギン酸カルシウム薄膜層を培養シャーレ上に形成させた。次に細胞接着基質をコートし神経細胞を培養した。2-7日培養後、神経ネットワークが構築されたところで、5mM EDTA 入り培地を添加することで足場となるアルギン酸カルシウムをゾル化した。

回収した細胞をアルファメッドサイエンティフィック社 64chMEA assay system にて評価した。

4. 研究成果

当初 CCD センサアレイを用いて研究を進める予定であったが、センサアレイのみでは販売しておらず、最初から開発するとなると巨額の費用が必要であった。そこで、マイクロレンズアレイやフォトダイオードを有さないセンサアレイのみを販売している CMOS 型に変更し、細胞外電位を直接測定するシステム構築に変更した (Fig. 1)。

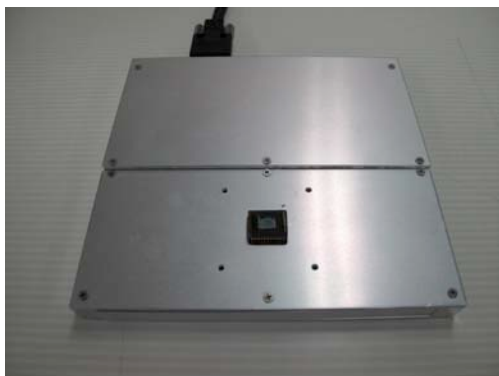
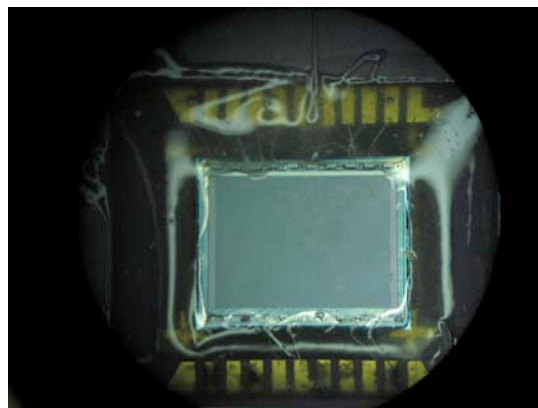


Fig. 1 細胞外電位計測システム

この CMOS センサアレイを用いてまず培養中にセンサに通電しても短絡しない回路保護方法または細胞に障害性のないコーキング剤の検討を行った。その結果、センサアレイ部と一部の領域以外の金属部分をコーキングすることで培養液をセンサアレイ上に満たしても短絡しないことを明らかにした (Fig.1)。

また、モデル細胞で筋初代培養細胞を用いてコーキング剤の種類を検討したところ、一部のシリコン性のコーキング剤でより細胞障害性が非常に少ないことを明らかにした。特に脱アセトン型のシリコン性コーキング剤が最も細胞障害性が少なかった。そこで、拍動の様子を顕微鏡下で観察することにより、細胞接着や生死が簡単に確認できる筋初代培養を用いる事により、センサアレイ上

で培養が可能か検討を行った。その結果、特定のコーキング剤を用いる事により、センサアレイ通電中でも心筋細胞が培養で可能であることを明らかにした。



一方で、細胞外電位の記録には様々な課題があることもわかった。CMOS センサ上で心筋細胞を培養できる事を明らかにしたが (Fig.4),

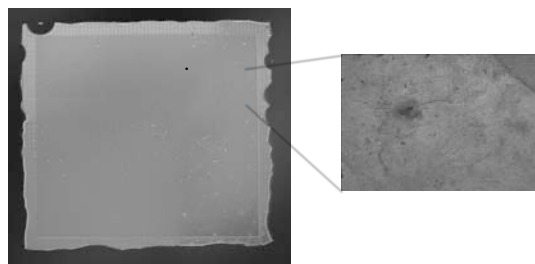


Fig. 4 CMOS センサアレイ上での心筋細胞培養

CMOS センサ上はアルミなどの金属が表面に存在することから、細胞接着に関わるタンパク質をコーティングするなど表面材質の修飾が必要であること、また、細胞外電位は非常に微弱でシグナル様の電位変化は確認できたものの確定するに至らない。そこで、まず、センサアレイ上に細胞が接着できる細胞外基質の検討を行った。その結果、神経細胞にはポリ-L-リジン、心筋細胞にはコラーゲンを培養前にコーティングしたところ、どちらも共にセンサアレイ上に接着、培養できる事が明らかとなった。ただ、通常のプラスチックシャーレを用いた細胞培養法に比べやはり接着性は大きく異なり軸索の伸長度は低かった。

次に細胞外電位の測定であるが、通常用いられる細胞株は細胞外電位を示すものが少なく、一般的に胎仔から回収される初代培養を用いられる。そのため、これまでは実験の都度調達する必要が生じた。そこで、研究を迅速に進めるため、電気活動を損なわない初代細胞の凍結保存技術の確立を行った。近年、細胞の凍結技術の進歩は進んでおり、様々な試薬や保存方法が存在する。結果、細胞凍結保存液セルバンカーと、簡便なプログラムフリージング法を用いることにより、細胞機能

を損なわず、生存率を高める凍結保存技術を開発した。

さらに、課題となっている細胞外電位測定を進めるため、より高感度の CMOS センサを採用した。特に神経細胞、心筋細胞の活動電位変化は変化が早いため通常のいわゆるビデオレートとされる取得速度 30Hz は変化を捉えることが難しいため、フレームレートが 10 バイトなる 300fps を持つハイスピードカメラに使用される CMOS センサアレイを採用した。さらに、この高感度 CMOS センサアレイを駆動させるためのデバイスを開発した。



Fig. 1 細胞外電位計測システム

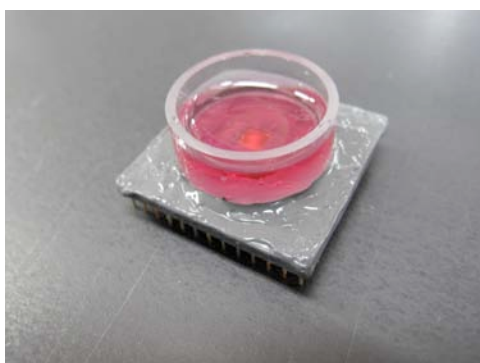


Fig. 1 細胞外電位計測システム

また、構築したシステムで電気学的特性の検討を行った。

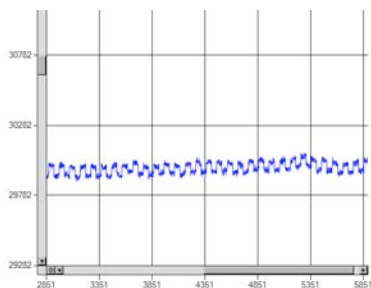


Fig. 3 CMOS センサアレイの電気学的特性

ファンクションジェネレータを用いて、培養液を満たしたセンサアレイチップに人工的に矩形波の電気刺激を加えたところ、全ての電極で Fig.3 のように電位的な変化を捉え

ることに成功した。

加えて、心筋細胞の分散培養において、シグナル様の電位変化を捉えることに成功した。ただ、やはり電極面への細胞接着は強力ではなく、シグナル検出と細胞接着の問題が重要であることが明らかとなった。強力に接着させシグナルを得るためには新たな技術の構築が必要であった。一般に培養細胞は一細胞を孤立培養するより細胞同士が接合した状態の方が生存率が高い。また、神経細胞に関しては成熟し神経発火を記録するまでに時間を要する。そこで、一旦細胞ネットワークが形成しやすい器材で一旦培養し、後 CMOS センサアレイに再配置することでシグナルを得やすくするための技術構築を試みた。ただ、一般的に培養器剤から細胞を剥離し再培養する手段としては、トリプシンなどのタンパク分解酵素を用いるが、初代培養細胞は侵襲性が高く、また、細胞間ネットワークも破壊する。そこで、細胞に低侵襲的にかつ細胞間ネットワークを保存したまま培養器剤から細胞を剥がし再培養する技術の構築を行った。方法としてはカルシウムイオンの有無でゲル-ゾルの相転移を行うアルギン酸を用いた。アルギン酸カルシウムを培養皿底面にコーティングする事で細胞接着の足場を構築し、トリプシンなどのタンパク分解酵素を使用することなくキレート剤を添加することで細胞の足場を分解し培養皿から細胞を剥がす技術の構築を行う事が出来た。本技術は細胞シート技術としても応用することができ、これまでの温度応答性ポリマーを使用した方法では出来なかった神経細胞シートの作製を新規に作製出来るようになった。神経細胞で構築された細胞シートによる細胞外電位変化は一細胞の電位変化に比べ、数倍大きいことから、神経細胞シートを CMOS 上に配置することで電位変化を捉えることが可能となると考えている。

結論として、CMOS センサアレイ上で細胞の活動電位を取得するための様々な新規の技術構築に成功した。現在引き続き、CMOS センサアレイを用いた面的な細胞外電位取得に向けて研究を進める。

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 0 件)

[学会発表] (計 3 件)

① 寺蘭英之、野村典正、金賢徹、服部明弘、安田賢二、Development of an artificial neuronal sheet technique and electrophysiological evaluation between neuronal sheets、第 38 回日本神経科学大会、2015.7.15、神戸国際展示場、兵庫・神戸

② 寺蘭英之、野村典正、服部明弘、安田賢二、Constructive approach to understand neuronal

communication by controlling spatial patterns using micro-processing and cell-sheet technique、2015 BRIDGING BIOMEDICAL WORLDS CONFERENCE、2015.5.11.、飯野ホール、千代田区・東京

③寺菌英之、金賢徹、野村典正、浜田智代、安田賢二、Toward quasi-in vivo from in vitro assay (IV). Development of the artificial neuronal networks system using actual neurons toward to evaluate effects of medicines for Neuropsychiatric disorders、SPS2013、2013.9.17.、Congress Centre de Doelen、ロッテルダム・オランダ

〔図書〕（計 0 件）

〔産業財産権〕

○出願状況（計 0 件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

○取得状況（計 0 件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究代表者

寺菌 英之 (TERAZONO, Hideyuki)
東京医科歯科大学・生体材料工学研究所・
バイオ情報分野

研究者番号：30398143

(2)研究分担者

()

研究者番号：

(3)連携研究者

()

研究者番号：