

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 31 日現在

機関番号：34315
 研究種目：若手研究（B）
 研究期間：2011～2012
 課題番号：23710151
 研究課題名（和文）空間配列プローブ電極を包埋した 3 次元培養組織内の細胞応答シグナル計測
 研究課題名（英文）Electrophysiological recording using Spatially Arranged Microelectrode Embedded into 3D Culture
 研究代表者
 殿村 渉（TONOMURA WATARU）
 立命館大学・理工学部・助教
 研究者番号：50581493

研究成果の概要（和文）：

生体組織本来の性質により近づくと考えられる 3 次元培養組織に空間配列プローブ電極を基本構造とするマイクロデバイスを包埋することで、空間的な細胞シグナル計測を目指した。ワイヤーボンディング技術で実現した空間配列プローブ電極上に神経細胞の 3 次元培養組織を構築することで、細胞シグナルの計測に成功した。また、3 次元電極への細胞位置制御機能を始め、光学や電気化学の各種センシング機能を本デバイスに集積化する可能性を示した。

研究成果の概要（英文）：

3D cultures are more likely to mimic physiological tissue environments. This research focuses on spatial extracellular recordings inside 3D cultures using spatially arranged microelectrode embedded into 3D cultures. Wire-bonding-based probe technology makes it possible to provide the 3D microelectrodes. We demonstrated electrophysiological activities inside 3D neuronal cultures could be successfully recorded using the embedded microelectrodes. We also indicated that cell manipulation, optical sensing and electrochemical sensing were integrated with the spatially arranged microelectrode.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：複合新領域

科研費の分科・細目：ナノ・マイクロ科学、マイクロ・ナノデバイス

キーワード：空間配列プローブ電極、3 次元培養、マイクロバイオシステム

1. 研究開始当初の背景

近年、生体組織本来の性質により近づくと考えられる 3 次元培養組織を対象とした研究事例が増えており、幹細胞への展開を視野に進められている。細胞機能解析において一般的な手法であるパッチクランプ法を適用した研究事例としては、ゲル中にラット海馬神経細胞を包埋してディッシュ上に 3 次元培養し、その組織モデルを対象に 14 日間の成長過程における電気生理シグナル追跡をホールセルパッチクランプ法により実現している。一方、シリコン基板と感光性透明フィルムで構成した集積化電極基板をシリコ

ンラバーを介して積層した 3 次元培養組織解析ツールも報告されている。

しかしながら、パッチクランプ法は、ロースループットおよびガラス電極を 3 次元包埋培養したゲル内に刺入する際の影響による細胞の損傷といった課題点が挙げられる。一方、集積化電極基板を積層する事例においては、3 次元培養手法や基板上のどの細胞由来のシグナルかを特定することが困難である。また、生体機能の解明や先端医療分野への応用へ繋げるためには、3 次元培養組織内部において、外部刺激に対する細胞応答シグナル計測を低侵襲かつ空間的に実現できる

インタフェース技術が有効であると考えられ、その開発が求められている。

2. 研究の目的

本研究では、単一細胞（1次元）もしくは平面培養組織（2次元）を対象とした細胞機能計測用マイクロデバイスの開発で培ってきたインタフェース技術をボトムアップ的に展開し、生体組織本来の性質により近づくと考えられる3次元培養組織内への埋め込み計測を実現することが主な目的である。

生体組織本来の性質に近いと考えられる3次元培養組織に対して侵襲性の高い電極を刺入する手法ではなく、柔軟性も有する3次元プローブ電極アレイを基本構造とするマイクロデバイスを3次元培養組織内部へ包埋する。これにより、外部刺激に対する組織内部の細胞シグナル応答を低侵襲かつ空間的にハイスループット計測することができるインタフェース技術を確立させ、これまで得られてきた2次元培養組織における細胞活動データとの類似点・相違点を明らかにすることが主な目的である。

3次元培養組織内の細胞に対する電気生理シグナル計測を始め、3次元電極への細胞位置制御機能や光学・電気化学の各種センシング機能を本デバイスに集積化することを目標に、生体機能の解明や先端医療分野（再生医療、難治性疾患治療など）へ応用展開するための基礎データの取得を目指す。

3. 研究の方法

(1) 3次元神経培養組織の電気生理シグナル計測

平面培養した細胞ネットワークの細胞外電気生理計測ツールとしてこれまで展開してきたマイクロチャンネルアレイ（MCA）を基本構造とする平面電極先端部に、ワイヤーボンディング技術とレーザーマシーニング技術を組み合わせた製作手法を適用することで、空間配列型の3次元プローブ電極を実現する。LSIの実装過程に汎用的に用いられているワイヤーボンディング技術とMEMS技術との高い整合性を利用して実現した柔軟性を有するプローブ電極は一括で製作することが可能であり、高い生産性を有する。上部基板と下部基板の間にワイヤーボンディングした柔軟金属ワイヤーのブリッジ構造をレーザー加工により切断することで容易に3次元プローブ電極を得ることができる。また、上部基板と下部基板間の段差およびレーザー加工の切断箇所を制御することで、所望の3次元座標位置に容易に製作できる特徴を兼ね備えている。

電気化学測定（サイクリックボルタメトリー測定）を用いることで、製作した空間配列プローブ電極が電氣的に独立し、個々の電

極として機能しているかを評価した。作用電極として本デバイスのプローブ電極、対向電極として白金、参照電極として銀/塩化銀を用い、フェロシアン化物イオンの酸化電流を測定した。電極半径 $1\mu\text{m}$ に対し、電位掃引 50mV/s 、 0.3V で 1nA の酸化電流が測定できるように、測定溶液の濃度を 4mM に調製した。

観測対象として、ラット大脳半球の組織片から回収する神経細胞を用いた。また、細胞培養担体として、細胞培養に一般的に用いられているコラーゲン・ゲルを使用した。

信号増幅用アンプは、パッチクランプ用アンプを細胞外記録モードとして使用した。その他、データ取得装置、データ解析用ソフトウェアのシステムで構成される。培養チャンバ内で3次元培養している本デバイスとの接続は、ヘッドアンプを介して実現する。参照電極は、銀/塩化銀を用いた。細胞外記録により記録される神経細胞の活動シグナルは 6kHz 程度までの周波数を含むとされていることを考慮すると、最低でも 25kHz 程度のサンプリング周波数が必要であると考えられる。このことから、アンプの増幅度は $2,000$ 倍、バンドパスフィルタ値は $10\text{Hz} \sim 5\text{kHz}$ 、サンプリング周波数は 40kHz に設定した。

(2) 3次元電極への細胞位置制御機能

(1)で空間配列プローブ電極上に3次元神経細胞培養組織を構築する際は、細胞を混ぜ込んだゲルを単に滴下したのみで、3次元電極への細胞位置制御は行っていなかった。本研究では、磁性粒子を用いた細胞磁気誘導技術の本マイクロデバイスに導入することで、3次元電極へ細胞を位置制御することを目指した。

空間配列プローブ電極に強磁性材料を成膜し、磁性体として機能させることで、磁性粒子を磁気誘導により電極部に位置制御可能な磁性プローブ電極を提案した。外部磁場を磁性プローブ電極先端部に集中できることを磁場解析により検証し、磁気ラベル化した細胞群の電極先端部への磁気誘導に向けて、磁性粒子群を用いてその効果を検証した。

(3) オンビジョンチップ型観察系を用いた3次元培養組織における細胞の位置計測

3次元培養組織における細胞位置情報の取得を目指し、本研究ではイメージセンサを用いたオンビジョンチップ型バイオ観察系を応用することで個々の細胞の3次元位置計測に取り組んだ。細胞どうしが複雑なネットワークを構成する3次元培養組織の機能を理解する上で個々の細胞を観測することが重要であり、細胞の位置情報を取得する技術が必要とされる。

3次元培養組織の観察系は高価で複雑な光学系を有する光学顕微鏡が主流であるが、一

度に観察可能なZ軸方向に制限があるため十分な観察が困難である。我々は、観察系におけるこれまでの成果として、細胞1個のサイズとイメージセンサの画素サイズの整合性の良さに着目し、イメージセンサ上に直接設置するだけでバイオ観察が可能であるレンズフリーの観察系を実現している。以上のような背景を踏まえ、本研究では、これまで開発したオンビジョンチップ型観察系の技術シーズを3次元培養組織評価に応用することで、3次元培養組織に存在する個々の細胞の3次元位置情報を取得することを目指した。

具体的には、イメージセンサで取得した1枚の画像情報から個々の細胞の蛍光強度の差を計測し、光拡散方程式の数値計算プログラムに通すことで、イメージセンサから細胞までの光路長(Z軸方向)を導出した。すなわち、ボケ画像の情報を応用することで、従来の観察系では網羅的に把握することが困難であった3次元培養組織に存在する細胞の位置情報を提案するレンズフリー観察系で明らかにする可能性を示した。

(4) 電気化学特性に優れた3次元プローブ電極

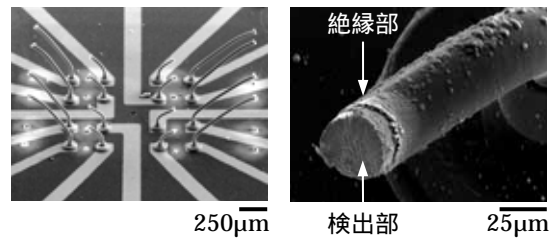
1 チップ上に高さの異なる微小電極を有する空間配列プローブ電極を用いて、溶液中における3次元的な試薬濃度分布の情報を取得するセンシング技術を開発した背景を踏まえ、本研究では、更なる展開として、金/カーボン複合材料を電極材料として導入することで、従来の電極材料に比べて電位窓が広く、電極活性に優れた高感度な電気化学センサを提案した。電気化学特性に優れた3次元微小電極アレイを実現し、3次元培養組織から分泌される生体関連物質の簡便なオンチップ計測を目指した。

1 チップ上に電気的に独立した高さの異なる電極がアレイ状に存在しており、金/カーボン複合電極は、金表面に成膜したポリマー材料(パリレン)を不活性雰囲気中で熱処理することで得ることができる。金/カーボン複合電極の電気化学特性を明らかにするために、金/カーボン複合材料の電位窓や電極活性についてサイクリックボルタムメトリー法を用いて平面電極で測定し、従来の電気化学センサの電極材料と比較した。

4. 研究成果

(1) 3次元神経培養組織の電気生理シグナル計測

各々電気的に独立した空間配列プローブ電極デバイスの製作結果を図1に示す。本デバイス中心部を示す図1(a)のSEM写真より、3次元位置座標が異なるプローブ電極がアレイ状に16極存在していることがわかる。また、図1(b)に1電極先端部の拡大写真を示



(a) デバイス全体 (b) 1電極先端部

図1. 空間配列プローブ電極デバイス

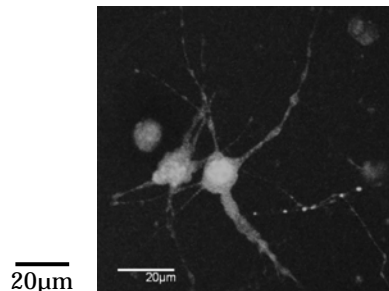


図2. 神経細胞のゲル包埋培養

す。電極径は 25 μm で、先端部のみ検出部(金)が露出している。

製作した空間配列プローブ電極の機能評価を電気化学測定により行ったところ、1電極より8nAの酸化電流を測定することができた。作用電極として用いているプローブ電極の半径は12.5 μmであることから、期待される測定電流値に対して妥当であると考えられる。他の電極においても妥当な値が得られたが、いくつかの電極においては100nAを超える電流値となった。これは、絶縁膜のパリレンが一部剥離し、実効電極サイズが大きくなったことによる影響であると考えられる。

ラット大脳半球の神経細胞を観測対象とし、37℃でゲル化するコラーゲン・ゲルを用いた3次元包埋培養手法により本プローブ電極デバイス上で3次元培養組織を構築した。冷却しているコラーゲン・ゲル混合溶液に細胞密度500,000 cells/mlで神経細胞を素早く混合した後、その溶液を本デバイス上に注ぎ、インキュベータ内(37℃、CO₂:5%)に静置することでゲル化し、細胞の足場が構築される。培養開始9日目後、神経細胞の核、樹状突起、軸索を一度に染色できるAlexa488をコンジュゲートした蛍光抗体を用いて染色し、共焦点顕微鏡によりゲル内部で成長している神経細胞の観察を行なった。図2に示すように、蛍光染色された神経細胞がゲルの足場内で3次元的に配置および軸索を伸ばして成長している様子を観察することができた。

空間配列マイクロ電極デバイス上において神経細胞の3次元包埋培養を28日間行い、その組織内部の成長過程を電気生理シグナ

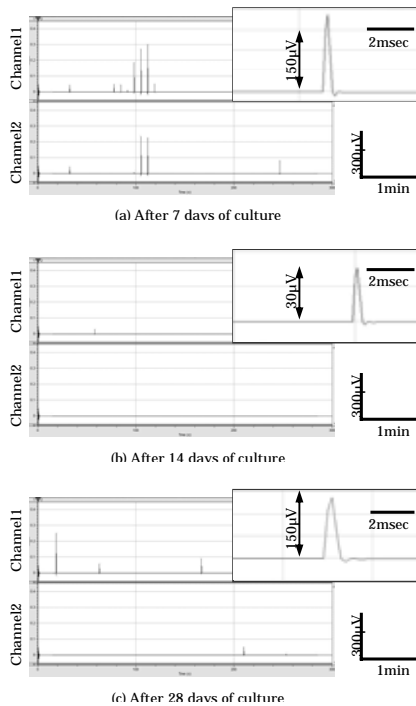


図 3. 3次元細胞培養組織のシグナル計測

ル計測により追跡した。図 3 に培養開始 7 日後、14 日後、28 日後の計測結果をそれぞれ示す。培養開始から 7 日後まで、検出される神経細胞活動電位の信号強度および発生頻度が徐々に増加するのを確認した。培養開始 14 日後の時点で活動が一時的に弱まり、その後再び活動電位の信号強度増大および発生頻度の増加を確認した。本結果は、2 次元神経回路の成長追跡データとの類似を示唆する。培養開始後 2 週間の時点で一旦活動が弱まるという点において特に類似が示唆され、その他の点においても培養開始後や活動が弱まった後、徐々に信号強度や発生頻度が増大する点も類似が示唆される。また、神経細胞を包埋せずゲルのみに対し行った対照実験において、反応が確認出来なかったことから、得られたデータが神経細胞由来のシグナルであると考えられる。

(2) 3次元電極への細胞位置制御機能

磁性プローブ電極をネオジウム磁石上に設置した場合の磁束密度について磁場解析をしたところ、電極先端部に磁気集中が起こり、磁場勾配の形成がなされることを確認した(図 4)。また、磁性プローブ電極同士の磁場干渉の影響もないことを確認した。

リン酸緩衝液中における磁性プローブ電極への磁性粒子磁気誘導実験を行った(図 5)。図 5(a)が磁性粒子滴下直後、図 5(b)が電極部に位置制御された磁性粒子以外をウォッシュアウトした写真である。磁性粒子が磁性プローブ電極部に位置制御されていることが確認できた。

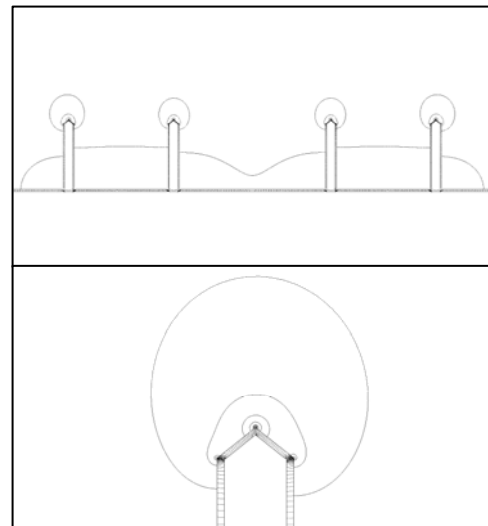
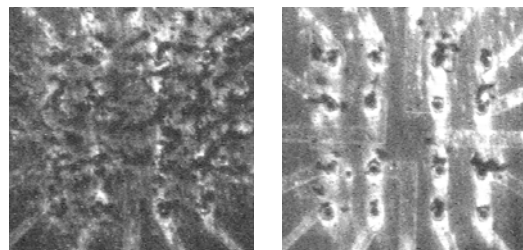


図 4. 磁性プローブ電極先端部の磁場勾配



(a) 磁性粒子滴下 (b) ウォッシュアウト後

図 5. 磁性プローブ電極への磁気誘導

(3) オンビジョン型観察系を用いた 3次元培養組織における細胞の位置計測

オンビジョン型観察系を用いてコラーゲン・ゲルに包埋されたマイクロビーズの画像情報を取得した(図 6)。ピンホールアレイを用いることで、センサ上の観察対象に対し一様な光を照射するように光学系を設計した。得られたゲル中マイクロビーズの画像情報より、センサ面からの距離が異なる対象間において、検出される影の濃淡を確認した。これは、光の回折や散乱の影響により対象とセンサ面との間に光が回り込むためであると考えられる。よって、任意の 2 対象を選択し、それぞれの影の濃淡を光強度差として捉え、光拡散方程式の数値計算プログラムに代入した。また、2 対象間の Z 軸方向における距離は光学顕微鏡を用いて計測し、約 10µm であった。それぞれの画像情報より光強度を計測し、最暗点における光強度差を用いて数値計算した結果、実測値 10µm に対して 8.1µm が得られた。生じた誤差は媒体の光学特性値が不明であったために用いた仮数の影響であると考えられる。よって、本研究で提案する光拡散方程式により光路長を導出する手法が、蛍光画像情報だけでなく画像情報全般に適用出来る可能性を示すことができた。

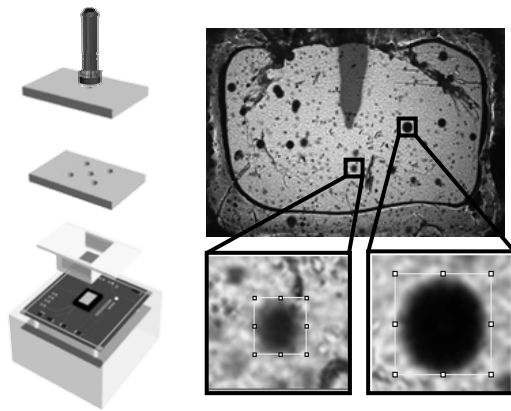


図 6. オンビジョン型観察系を用いた 3次元位置計測

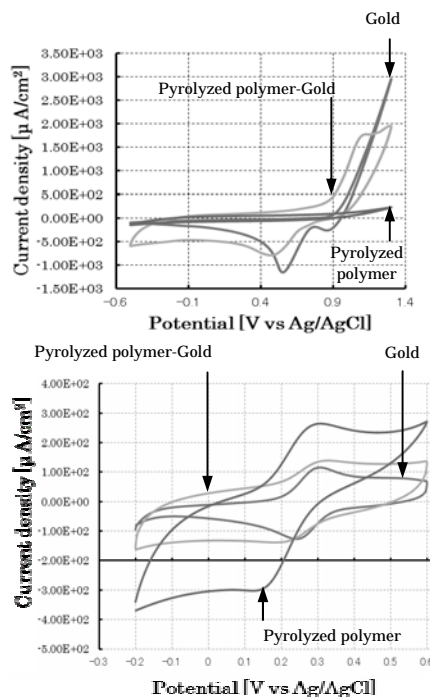


図 7. 金/カーボン電極の電気化学特性

(4) 電気化学特性に優れた 3次元プローブ電極

金/カーボン複合材料の電位窓測定結果を図 7(上)に示す。金電極や不活性雰囲気中で熱処理したカーボン電極に比べてより広い電位窓を示すことが示唆された。また、電極活性測定結果を図 7(下)に示す。金/カーボン電極のピーク電流値 (0.129V) に対し、金電極は 0.070V、カーボン電極は 0.187V であった。このことから、金/カーボン電極はカーボン電極よりも電極活性に優れていることが示唆された。更なるデータの蓄積は必要であるが、カーボン層への金の拡散が影響していると考えられる。

金/カーボン複合材料の 3次元電極を製作し、電解質溶液の拡散をクロノアンペロメトリー法により測定したところ、電気化学特性に優れた反応を示すことが示唆された。

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)

〔学会発表〕(計 8 件)

発表者名: W. Tonomura, Y. Mori and S. Konishi、発表標題: High-sensitivity electrochemical sensor using pyrolyzed polymer-gold 3D probe arrays for spatial chemical sensing、学会名等: The 26th IEEE International Conference on Micro Electro Mechanical Systems (MEMS2013)、発表年月日: 2013年1月22日、発表場所: 台北(台湾)

発表者名: J. Sato, W. Tonomura and S. Konishi、発表標題: Magnetic microprobes spatially arranged in culture gel for 3D patterning of magnetically labeled cells、学会名等: The 6th Asia-Pacific Conference on Transducers and Micro/Nano Technologies (APCOT2012)、発表年月日: 2012年7月9日、発表場所: 南京(中国)

発表者名: W. Tonomura, S. Taga, C. Koike and S. Konishi、発表標題: Multi-site electroretinogram recordings inside isolated mouse retina using flexible spatially arranged microelectrode probes、学会名等: The 16th International Conference on Solid-State Sensors, Actuators and Microsystems (Transducers2011)、発表年月日: 2011年6月7日、発表場所: 北京(中国)

発表者名: 殿村 涉, 五十嵐 悠太, 清水 一憲, 小西 聡、発表標題: 3次元培養組織解析のための空間配列マイクロ電極を用いた包埋計測、学会名等: 日本機械学会 ロボティクス・メカトロニクス講演会 (ROBOMECH2011)、発表年月日: 2011年5月27日、発表場所: 岡山コンベンションセンター(岡山県)

〔図書〕(計 1 件)

著者名: 小西 聡, 小林 大造, 殿村 涉, 清水 一憲、出版社名: シーエムシー出版、書名: 食のバイオ計測の最前線-機能解析と安全・安心の計測を目指して-(4 バイオセンサーデバイスにおけるサンプル前処理技術)、発行年: 2011、ページ: 31-37

6. 研究組織

(1) 研究代表者

殿村 涉 (TONOMURA WATARU)

立命館大学・理工学部・助教

研究者番号: 50581493