16a-C4-10

高分解能アセチルコリンイメージングセンサの提案と神経細胞応答計測

Development of a high spatial resolution type acetylcholine imaging sensor for analysis of neuronal responses

豊橋技科大 [1]，　JST-CREST[2]　°岩下 彰宏 [1]，櫻井 孝司 [1,2]，奥村 弘一 [2]，石田 誠 [1]，澤田 和明 [1,2]

Toyohashi Univ. of Tech.[1], JST-CREST[2] °A. Iwashita[1], T.Sakurai[1,2], K.Okumura[2], M. Ishida[1], K. Sawada[1,2]

E-mail: iwashita-a@int.ee.tut.ac.jp

【概要】

これまで我々は、神経伝達物質である ACh (Acetylcholine)をラベルフリー検出できるイメージセンサを開発してきた。本稿では，従来法と比較し高い空間分解能を有するセンサ作製法を提案し、この高分解能型センサを用いて実際に脳スライスのグルタミン酸応答を測定したので報告する。

【ACh 検出原理とセンサの作製】

ACh と AChE(Acetylcholine Esterase)が起こす酵素反応で水素イオンが発生する。この原理から、pH イメージセンサ上に酵素膜を設置することで ACh 濃度に依存した pH 低下としてリアルタイム計測することが可能となる[1]。pH センサは、当研究室で開発した電荷転送型 pH イメージセンサ（128 x128 piexls，23 μm pixel pitch）[2]を用いた。各画素のセンシングエリアにおける 3 μm の凹み空間へ AChE を結合した微小粒子を配置した。Figure 1 に対照（左）と粒子を格納した後の pH センサ（右）の 4 画素領域の写真を示す。図の通り、微小粒子を各画素のセンシングエリアだけに高密度で局在化させることに成功し、ACh 依存性の pH低下を確認することもできた。本手法により空間分解能は画素ピッチで規定でき，ACh 検出感度の向上も期待できる。

【脳スライスにおける ACh イメージング】

構築した ACh イメージセンサを神経細胞から放出される ACh の 2 次元イメージングに応用した。Figure 2 に測定結果を示す。ACh センサに神経細胞標本（培養したラット大脳スライス）を静置し（左上）、グルタミン酸を滴下することにより脱分極を誘導した。脳スライスが存在していない箇所では pH の変化は見られなかったのに対し、脳スライスが存在する箇所の一部ではグルタミン酸刺激による急激な pH の低下が見られた。比較対照として、AChE 酵素なしで同一の測定を行ったところ、脳スライスが存在する箇所で急激な pH 変化がみられなかった。以上の結果から、グルタミン酸刺激による pH 低下は神経細胞からの ACh 放出を反映していることが示唆された。神経応答の時空間解析における本センサの有用性が期待される。

【参考文献】

1. S. Takenaga, et al., “Label-free acetylcholine imagesensor based on charge transfer technology for biological phenomenon tracking”, JJAP, vol. 51, pp.027001-027005, 2012.
2. F. Dasai, et al., “A 128 x 128 pixels charge transfer type pH and photo image sensor with high density and high frame rate” Proc. APCOT2012, ac12000201,2012.

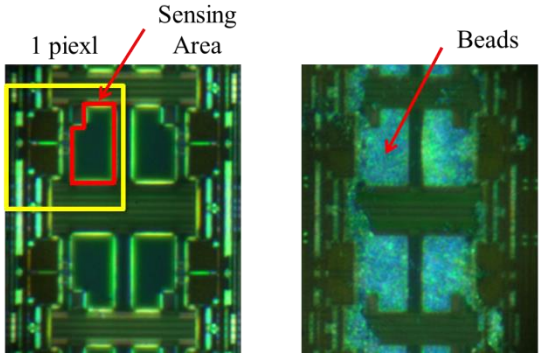

Figure 1: Light micrographs of an ion image sensor surface of before (left) and after (right) placements of the bead-complexes at the sensing area.

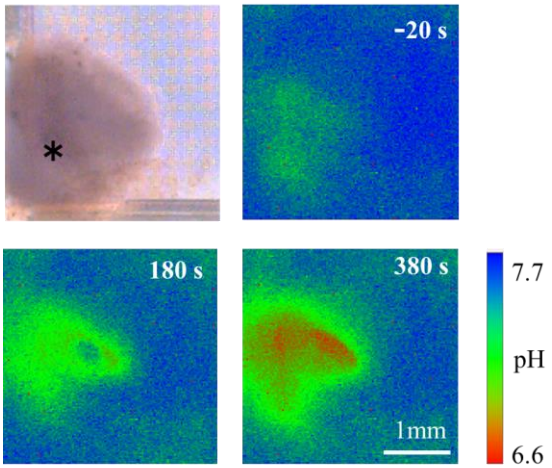

Figure 2: ACh imaging of the cortical slice. Top left, a bright-field image of the cultured slice (asterisk) mounted on the ACh image sensor. The [pH]o images were sequentially recorded at the different time. The slice was stimulated with glutamate at 0 s. Color bar is pH scale.

© 2013 年　応用物理学会