

レドックス型非標識乳酸イメージセンサの製作と 薬理刺激による海馬からの乳酸放出の評価

Fabrication of redox-type label-free lactate image sensors and an evaluation of released lactate from hippocampal slice with pharmacological stimulation.

豊橋技科大¹, エレクトロニクス先端融合研究所², 山梨大学³

○(D) 土井 英生¹, 堀尾 智子¹, 繁富 英治³, 篠崎 陽一³, Lee You-Na¹, 吉見 立也¹,
岩田 達哉^{1,2}, 野田 俊彦^{1,2}, 高橋 一浩^{1,2}, 服部 敏明¹, 小泉 修一³, 澤田 和明^{1,2}

○Toyohashi Univ of Tech¹, EIIRIS², Yamanashi Univ³, ○H. Doi¹, T. Horio¹, E. Shigetomi³, Y. Shinozaki³,
Y. Lee¹, Y. Yoshimi¹, T. Iwata^{1,2}, T. Noda^{1,2}, K. Takahashi^{1,2}, T. Hattori¹, S. Koizumi³, K. Sawada^{1,2}

E-mail: info-bio@int.ee.tut.ac.jp

代謝における細胞内エネルギー分子として知られる乳酸は、細胞外に放出される神経伝達物質として脳機能制御に大きく寄与することが推測されている[1]。しかしながら、細胞外乳酸の高分解能リアルタイムイメージングは実現されていない。これまでに、本研究室ではイオンイメージセンサを基盤技術とした電位検出型レドックスセンサアレイを開発してきた[2]。本報では、レドックス型非標識乳酸イメージセンサの製作及びマウス海馬の細胞外イメージングについて報告する。

図1に、電位検出型レドックスセンサアレイを用いた乳酸計測の原理を示す。乳酸は、乳酸分解酵素 (LOX) 及び過酸化水素分解酵素 (HRP) の反応において電子授受するメディエータの酸化還元状態を金薄膜上の電位変化として検出する。酵素膜を修飾した非標識乳酸イメージセンサの製作方法を次に示す。まず、40 μm ピッチ、128 $\times$ 128 画素のアレイセンサ上に高真空 EB 蒸着法で Au/Ti (20/5 nm) 積層膜を形成する。次に、高分子電解質 PSS および PLL, LOX, HRP の混合溶液を Au 薄膜上に滴下し、4 $^{\circ}\text{C}$ で 20 時間程度乾燥させた。

図2に、乳酸イメージングの結果を示す。同図に示すように、乳酸滴下後から出力画像が変化することを確認した。また、濃度依存性を解析した結果、1 μM まで検出可能であった。一方、数 100 μM 以上における出力は上昇後に減衰した。これは乳酸のみで確認された応答であるが、考察中である。

続いて、イメージセンサ上に海馬切片を乗せてグルタミン酸刺激による乳酸放出を検討した。図3に、細胞外イメージングの結果を示す。同図に示すように、LOX および HRP を固定化した乳酸センサの出力画像は明瞭に変化した。また、出力電位はグルタミン酸刺激直後に 100 mV 程度上昇(数 100 μM ~ 数 mM に相当)し、減衰した。一方、HRP のみ固定化したセンサの出力電位は徐々に 30~40 mV 程度上昇した。これは、内在性の過酸化水素に起因すると考えられる。さらに、これらの応答を酵素固定しないセンサで検証した結果、刺激前後の電位変化量は 10 mV 程度であった。これらのことから、本センサは数 100 μM ~ 数 mM のような高濃度の細胞外乳酸の時空間解析センサとして有用である可能性を示した。

謝辞：本研究は JST CREST Grant Number JPMJCR14G2 の支援を受けて行われました。

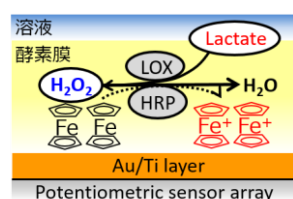


Fig1. 乳酸の検出原理

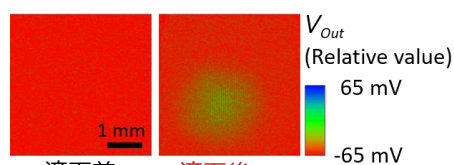


Fig2. 乳酸イメージングの結果

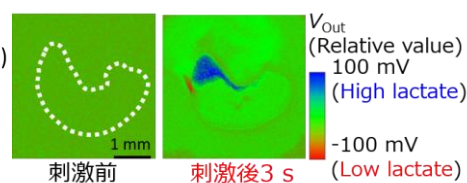


Fig3. 細胞外イメージングの結果

[1] A. Suzuki, et al, Cell, 144, 810 (2011). [2] Y. Okumura, et al, IMCS 2018, 141 (2018).