

## 培養2次元神経回路網の表面電位ズーム顕微鏡による高次情報処理の解析と機能発現

特集 プロジェクト研究

岩崎 裕\*

Analysis and applications of cultured two-dimensional neural network by using a novel surface potential microscope

**Key Words** : 神経回路, 半導体バイオイメージセンサ, 神経活動電位, 活動電位画像化, バイオチップ

### 1. 概要

標記研究課題の研究プロジェクトが、平成10年度から3年間の予定の新エネルギー・産業技術総合開発機構の新規産業創造型提案公募事業研究開発プロジェクトとして採択された。連携研究グループは、大阪大学 産業科学研究所 岩崎 裕(研究代表者)グループ及び医学部津元忠治教授グループ、東海大学開発工学部榊原 学教授グループ、及び松下電器産業研究本部健康医療開発推進室杉原 宏和グループから構成されている。本研究では、神経回路の活動の可視化・画像化が可能な表面電位ズーム顕微鏡を開発し、培養神経回路の局所回路とそれらの集合系を総合的に研究し、その高次情報処理機能の理解を進め、バイオチップの開発に関する基礎的な研究を行う。神経回路の活動を観察可能な表面電位ズーム顕微鏡は、これまでに開発に成功している半導体基板を用いたレーザ走査による化学イメージセンサの高感度・高速化と、これをもちいた高速に変化している表面電位の測定法を開発することなどにより実現し、これを軸として神経活動の多点計測・時空解析、神経回路可塑性の研究、培養神経回路を用いたバイオサイバネティクス技術を開拓する。

### 2. はじめに

21世紀は脳の時代といわれている。学習・記憶に伴う神経回路の可塑変化について、例えば分担者津本が科研費重点研究「神経回路の機能発達」で推進したように、単一細胞レベル及び神経回路レベルで研究が盛んに行われており、例えば分担者榊原は軟体動物の神経系を培養条件下で長期間安定に維持し神経回路を再構築することが可能であることを示し、これらを用いた機能素子・バイオチップの実現が展開されている<sup>1)</sup>。

これらの研究を推進するためには、細胞個々の性質から出発して、局所回路、系へと理解を進めるべきである。これはコンピュータの構築が、デバイス、回路、システム、アーキテクチャ、アルゴリズムのように、微視的なレベルから全体のレベルの階層的な組立が必要なことと同じである。すなわち、局所しか見えないと、単一神経レベルのメカニズムが分からない。理想的には、ズーム機能を有する観測システムにより、回路パターンと神経活動を明らかにするなど、総合的、統一的に神経回路の高次な機能を解明することができ、且つ神経回路で可塑性がどのように実現されているかを定量的に評価するために、神経活動の長期にわたる安定な記録が求められる。

近年広く普及している膜電位感応色素による色素プローブ法は、ズーム機能の観点からは有力な手法であるが、その細胞への毒性のため望ましいとはいえない。この点で、分担者杉原らが開発した多点電極法(MEDシステム)が注目され、多くの成果を上げている<sup>2)</sup>。

しかし多点電極法の場合、空間解像度及び測定点



\*Hiroshi IWASAKI  
1945年2月1日生  
大阪大学工学研究科電子工学専攻修了  
現在、大阪大学産業科学研究所・量子機能科学研究部門、教授、博士(工学)、表面物理、化学センサ  
TEL 06-6876-4317  
FAX 同上  
E-Mail iwasaki@sanken.osaka-u.ac.jp

が離散的に限られている点で満足できるものではなく、これを補完する計測システムの出現が望まれている。

そこで本研究では、ミクロンからのセンチメートルの任意の解像度で神経回路の細胞外膜電位パターンをテレビ映像のように可視化・画像化でき、これを長期間にわたって安定に観測できる無侵襲な、表面電位ズーム顕微鏡を開発することを目標とする。

さらに本研究では、表面電位ズーム顕微鏡を用いて観測される神経活動パターンの高度な時空解析技術・画像処理技術を開発し、2次元培養神経回路の高次情報処理機能解明を試みるとともに、神経回路機能発現素子の可能性をも探る。

これらの研究を進めるためには、個々の専門分野の個別の研究だけでは推進が困難で、本研究計画のように半導体物理・バイオセンサ、測定計測システム、画像処理・解析、神経情報工学、神経生理学の共同研究が必須である。例えば、試料そのものもシステムの一部であり、表面電位ズーム顕微鏡を開発するためには、実際センサ表面上に神経回路を親和性よく培養し、その活動を観測・解析した結果のフィードバックがなければ、充分な装置性能の向上を図ることができないし、逆にこのような表面電位ズーム顕微鏡が実現しなければ、従来の質を越える神経回路の観測データは得られないし、このようなデータなくしては時空解析プログラムの開発は机上の空論の域を出ることはできない。

本研究により得られる成果は、バイオセンサー技術とシリコンテクノロジーを組み合わせた高度なバイオセンサーシステムの一例となり、神経回路の理解の進展を促すことにより人工的な神経回路素子の開発、ひいては脳機能の解明、バイオコンピュータの開発に貢献することが期待される。

さらに一般的な波及効果としては、本研究による表面電位ズーム顕微鏡は高度なバイオセンシング顕微鏡であり、工業的には、食品の広範な食品中の細菌の高感度(例えば、リッター当たり1個のオーダーの検出感度)・迅速(分・時間のオーダー)測定を可能とし、現在、細菌検査結果待ちのため数日程度の食品貯蔵を余儀なくされているが、これを不要とすることによる食品加工コスト削減の莫大な経済効果がもたらされる。バイオセンサーの2010年の2兆円市場予測が行われているが、その意味でも新規産業創出に寄与する意義がある。また、水の安全性を

高めることにより開発途上国における衛生の向上が図られ、医療・福祉の向上に寄与する。また、学問的には、バイオ化学の新たな分野などで広範な寄与が考えられる。

また、本研究は、我が国の得意とする産業技術である半導体・薄膜・光学、制御・画像処理、医用工学の広い分野にわたる技術を集積し、高度な水準の神経科学と連携することにより目標を実現しようとしている点に特色がある。

### 3. 化学イメージセンサと表面電位イメージセンサ

神経回路の活動を観察可能な表面電位ズーム顕微鏡は、これまでに開発に成功している半導体基板を用いたレーザ走査による化学イメージセンサをベースに開発する。

#### 3.1 レーザ走査型化学イメージング装置と原理

我々の開発したレーザ走査型化学(pH)イメージング装置の概念図を図1に示す<sup>3-5)</sup>。電解液は、表面に酸化シリコン及び窒化シリコンの絶縁層を形成した半導体センサプレートと接している。電解液と半導体の間に適当なバイアスを印加して絶縁膜/半導体界面に空乏層を形成し、半導体側に強度変調した光を照射して外部回路に流れる交流光電流を測定する。以下に述べるようにセンサ絶縁層表面に接した試料の局所的なpHに依存して電気二重層が形成され、半導体の空乏層の2次元的な分布が生じ、これにより光生成電荷の充放電による交流光電流が変調されるので、光を小さな径に集光し半導体裏面を2次元走査することにより試料のpH分布のイメージングが可能となる。

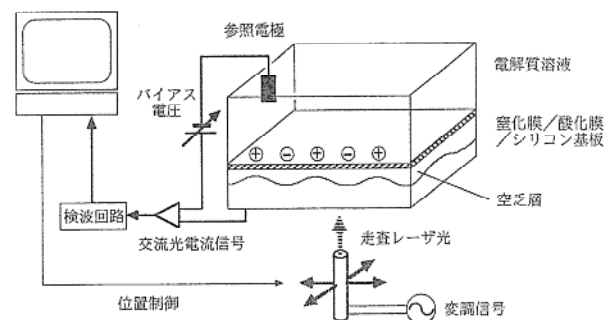


図1 レーザ走査型pHイメージング装置の概念図

交流光電流の測定によるpHセンシングの原理は、Hafemanら<sup>6)</sup>により提案され、Light-Addressable Potentiometric Sensor(LAPS)と呼ばれる。酸化

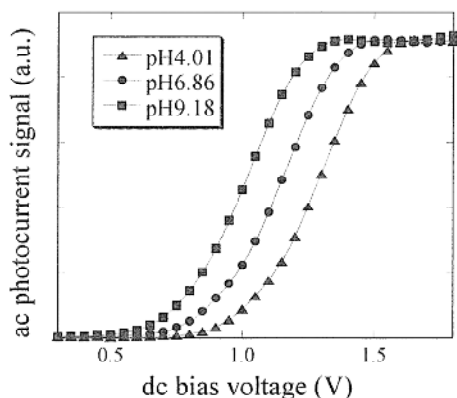


図2 pHイメージングセンサの交流光電流のバイアス電圧依存性

膜界面の半導体が蓄積状態となるバイアスでは、内部短絡するコンダクタンスが大きいので外部回路に光電流は流れない。一方反転側では、空乏層が伸びてインピーダンスが大きくなり外部回路を流れる光電流が増加するので、LAPSのI-V特性は図2に示すような階段関数的な特性となる。空乏層が消失する近傍でインピーダンスのバイアス依存性は急峻であり、光電流の変曲が起こるバイアス電圧は精度よく測定できる。この変曲バイアス電圧は以下のように電解液のプロトン濃度に依存してシフトするのでpHが測定できることになる。電解液/絶縁膜界面には、電解液のpHに依存して電気二重層が形成される。例えばpHが大きくプロトン濃度が低いと、表面のシラノール基( $\equiv\text{Si-OH}$ )の水素が解離して $\equiv\text{Si-O}^-$ となり、電解液側の水和カチオンと電気二重層を形成する。この電気二重層の電位差だけ変曲バイアス電圧がシフトするのである。シフト量は、上で述べたように解離平衡に支配されているので、ネルンスト則に近い1pHあたり50数mVである。この原理は、イオン感応性電解効果トランジスタ(ISFET)のpHセンシングと同様である。変曲電圧の測定の代わりに、一定のバイアスにおける交流光電流を測定してもpHを求めることができる。

シリコン酸化膜は試料が含んでいる水分と接触すると膨潤するので、実際には表面にシリコン窒化膜を形成する。我々が用いているセンサ構造の一例は、LPCVDシリコン窒化膜(100nm)/シリコン熱酸化膜(50nm)/n型シリコン(001)基板(15 $\Omega$ cm)である。酸化膜-シリコン界面の欠陥によるキャリアの再結合は、外部に取り出せる光電流を減少させるので、

欠陥を少なくするために熱酸化膜を用いている。シリコン窒化膜表面は酸化され、表面にはシラノール基とアミノ基が存在していると考えられており、これらがより広い範囲のpHに対する直線的な応答性を保証している。pH画像の空間分解能は、シリコン基板が厚い場合には、その厚み程度となるが<sup>4)</sup>、侵入長の長い赤外光を用いればより高い分解能を得ることができる。現在までに得られている最高の空間分解能は10 $\mu\text{m}$ で、厚さ20 $\mu\text{m}$ のシリコン基板と赤外レーザを用いて得られたものである<sup>4)</sup>。その他の到達性能は、測定感度;0.01pH, 測定速度;1000画素/秒である。

### 3.2 細菌コロニーのpHイメージング例

生物は、代謝することによって一般に周囲を酸性化している。微生物や細胞は、代謝により乳酸や炭酸などを外部に排出し周囲を酸性化する。化学イメージングセンサを用いて細菌コロニー近傍のpH分布をイメージングすることに成功している<sup>7-10)</sup>。

電解質としてKClを0.1モル/l添加してある寒天培地上に、表面塗抹植菌し培養してコロニーを形成させ、寒天を天地反転してセンサ面上に接触させる。培養時間による酸性化領域の拡大や、中心付近の酸性化の進行がよく分かり、微生物の代謝活性や増殖に関する情報が得られる。これまでに観察した例は、大腸菌(K12株JM109, IFO3301), 酵母菌(IFO203), *P. diminuta* (超純水中の菌の一種)などである。大腸菌(IFO3301)に関してはわずか8時間培養で、大きさが0.2mm $\phi$ , 大腸菌数が約800個のコロニーについてpH 2次元像を検出している<sup>9)</sup>。またセンサ表面を酵素などで修飾することにより、pH以外の化学情報をイメージングする試みも報告されている<sup>11,12)</sup>。LAPSは、微少なトレンチに補足された千個程度の少数の細胞の活動度を測定するマイクロ生理計として、細胞レベルの薬理の研究にも使われている<sup>13)</sup>。

### 3.3 表面電位ズーム顕微鏡

本研究の目的は、半導体と光プローブを用いた従来の原理と全く異なる方法で、無侵襲で、ミクロンからセンチメートルの任意の解像度で、高感度・高速度な神経活動電位の測定が可能で、最終的には神経回路活動電位分布の画像化が可能な装置を開発することである。3.1節で述べた化学イメージングセンサのセンサ面上に、培養液とともに神経細胞を載せ、神経細胞をセンサ面に密着させて培養することにより、

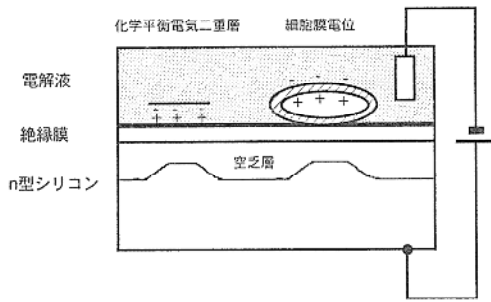
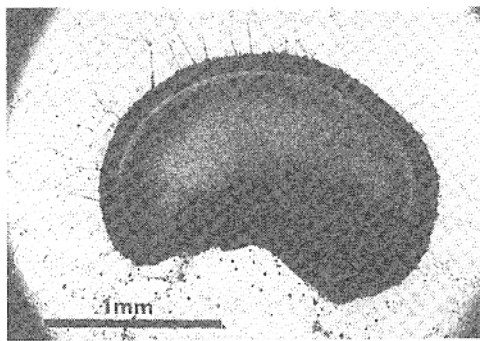


図3 pHセンシングと細胞膜電位センシングの概念図

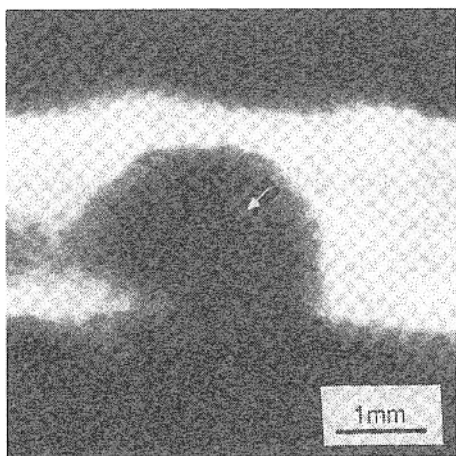
pH測定と同様に神経活動電位の測定が可能であると考えられる(図3)。前者では、化学平衡による電気二重層の電位差が検出され、後者では細胞膜電位が検出される。ただし、細胞がセンサ面から遊離し、その間の培養液によって細胞内の電位が「シールド」される場合には、センサ半導体の空乏層は形成されず、神経活動電位は測定できない。本測定手

法の原理的な可能性は、例えば本センサと同様半導体の空乏層形成による化学センサ(ISFET)を用いた神経活動電位の測定法(neuron-FET)が報告されていること<sup>14)</sup>から、裏付けられているといえる。ここで提案している神経活動観察のためのイメージングセンサを表面電位ズーム顕微鏡と名付ける。測定対象である神経電位が10msec程度の高速な時間変化をしていることから、静的な表面電位分布を測定する化学イメージセンサと異なる測定方法の開発も期待できる。

図4は、ラット胎児脳スライスをセンサ面上で10日培養したものの光学顕微鏡像(上)と代謝により酸性化したpHイメージ(下)である<sup>15)</sup>。図5はレーザービームを1点に固定(図4下矢印)して測定した交流光電流(上)、およびその振幅(中)と中心電位(下)の時間変化を示す<sup>15)</sup>。この結果は、2次元神経回路網



生後2日齢ラット脳切片(培養10日目)



代謝によるpH変化

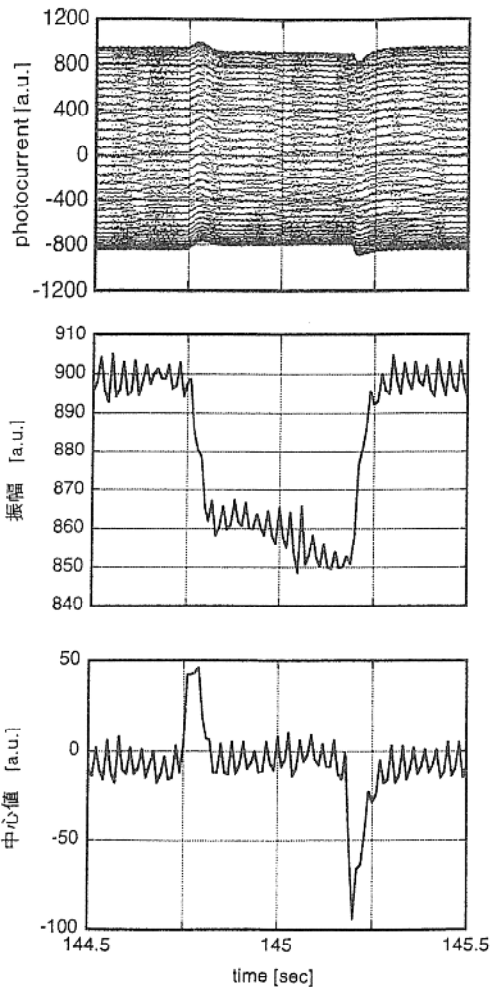


図5 レーザビームを1点に固定(図4下矢印)して測定した交流光電流(上)、およびその振幅(中)、中心電位(下)の時間変化<sup>15)</sup>

図4 ラット胎児脳スライスをセンサ面上で10日培養したものの光学顕微鏡像(上)、および代謝により酸性化したpHイメージ(下)<sup>15)</sup>

の自発発火による正の膜電位変化を観測していると考えられる。単一神経細胞の大きなアンプラシの神経細胞の培養およびKイオン注入による膜電位変化と表面イメージセンサの検出交流光電流の相関についての予備的な測定も行っている<sup>16)</sup>。これらの結果は、センサ面の適切な修飾による培養の密着性の向上、センサ検出の高感度・高速化などにより、神経回路活動電位分布の画像化が可能であることを示している。

本顕微鏡では、表面が、平坦な、アルミナ、シリコン酸化膜・窒化膜などでできたセンサ面上に、培養液とともに神経細胞を載せ、培養液の電位を参照電極により取るだけで測定でき、プローブとしては半導体膜に吸収される裏面から照射した集光レーザーを用いている。

従って、本システムは、オプティカルレコーディングや多電極面を用いた従来の手法と比べて、

(1) 上面に液晶などの検出層を必要としないため、またレーザー光は半導体に吸収され試料には影響しないため、侵襲性がきわめて低い、(2) 任意の場所をミクロンメートルからセンチメートルレベルの分解能で観察・画像化できる、(3) 神経代謝物質の分布などの生理学的情報を同時に画像化できる可能性がある、(4) 高信頼測定(センサー面に配線がない)、(5) 本来的にズーム観察機能を有する、などの点で優れ、神経回路・生体生理現象測定・画像化装置としてこれまでに全くなかった独創的な装置である。

さらに本顕微鏡は、原子間力顕微鏡(AFM)と組み合わせ、そのプローブにより全体を見ながら狙った局所を刺激する機能をも有する。

本顕微鏡は、センサ面上はAFMと参照電極以外はフリーな空間が確保できるので、従来のガラス微小電極やオプティカルレコーディング法が併用でき、従来法による活動電位の校正や、従来の神経回路研究手法を併用して高次情報処理機能の研究を行える利点がある。

#### 4. 研究開発目標

本研究では、(1) 半導体の光・表面電位応答性を用いた新たな原理も含めた高空間・時間分解能の表面電位イメージセンサ・測定システムの実現を目指す。これらはレーザー光をプローブとしているので光の波長程度の分解能以上の画像は任意の大きさの画像を得ることができ、ミクロンからセンチメートルのズーム画像化を実現する。

また、研究分担者らは大脳皮質における視覚情報処理機構の解析、感覚入力遮断の神経回路発達に及ぼす影響、大脳皮質における興奮性伝達物質、グルタミン酸とその受容体の役割、シナプスの可塑性における各種セカンドメッセンジャーの役割、神経回路形成における神経栄養因子の役割の研究や、学習・記憶に伴う神経回路の可塑的变化について単一細胞レベル、神経回路レベルで研究している。また、分担者らは、なるべく構成が簡単な神経システムを対象としたいという要求から、これまで軟体動物のエムラミノウミウシ、ヨーロッパモノアラガイを材料として、これら動物を古典的条件づけることにより対照動物と比較し、脳の可塑性の基礎過程を捉えている。ここで対象としている軟体動物の神経系は、学習と関係づけられ固定された神経細胞を培養条件下で長期間安定に維持しながら、神経回路を再構築することが可能である。更に、分担者らは多電極Ⅲマルチ神経測定システムの開発に成功している。そこで本研究の第2のテーマとして、(2) 器官培養された脳切片や培養環境で再構築された神経回路を材料として、表面電位ズーム顕微鏡で計測される神経活動を、これまでの電気生理実験法、蛍光顕微鏡、オプティカルレコーディング法、MEDシステムと併用して、時間的、空間的解像度の限界を探るシステムの評価を行い、神経回路の高次情報処理の解析と機能発現の研究を行う。一部の研究分担者らは、(3) 画像処理・解析技術の開発を担当し、測定システムに組み込む。これらの研究の進展により、神経回路活動電位分布の画像化と、これを用いた神経回路発達過程に関する研究の端緒が切り開かれることを望んでいる。

#### 参考文献

- 1) 榎原学, 川名明夫: Computer Today 84, 10 (1008).
- 2) 杉原宏和, 小川竜太, 竹谷誠: ブレインサイエンス7, 425 (1996), 8, 97 (1997).
- 3) M. Nakao, T. Yoshinobu and H. Iwasaki: Sensors and Actuators B20, 119 (1994).
- 4) M. Nakao, T. Yoshinobu and H. Iwasaki: Jpn. J. Appl. Phys. 33, L394 (1994).
- 5) M. Nakao, S. Inoue, T. Yoshinobu and H. Iwasaki: Sensors & Actuators B, 34, 234 (1996).

- 6) D. G. Hafeman, J. W. Parce and H. M. McConnell, *Science* 240, 1182 (1988).
- 7) N. Nakao, S. Nomura, T. Nakanishi, S. Takamatsu, K. Tomita, T. Yoshinobu and H. Iwasaki : *BUNSEKIKAGAKU*, 47, 369 (1998).
- 8) T. Yoshinobu, H. Iwasaki, M. Nakao, S. Nomura, T. Nakanishi, S. Takamatsu and K. Tomita : *Bioimages*, 5, 143 (1997).
- 9) M. Nakao, S. Inoue, R. Oishi, T. Yoshinobu and H. Iwasaki : *Journal of Fermentation and Bioengineering*, 79, 163 (1995).
- 10) 岩崎裕, 吉信達夫 : *応用物理* 66, 488 (1997).
- 11) M. Shimizu, H. Uchida, CG. Zhou, H. Maekawa, I. Matsuda and T. Katsube : *Proc. Transducers 93, 7th Int. Conf. Solid-State Sensors and Actuators*, 495 (1993).
- 12) S. Inoue, T. Yoshinobu and H. Iwasaki : *Sensors & Actuators B32*, 23 (1996).
- 13) J. W. Parce, J. C. Owicki, K. M. Kercso, G.B. Sigal H. G. Wada, V. C. Muir, L. J. Bousse, K. L. Ross, B. I. Sikic and H. M. McConnell : *Science* 246, 243 (1989).
- 14) P. Fromherz, A. Offenhausser, T. Vetter and J. Weis : *Science* 252, 1290 (1991).
- 15) S. Inoue, M. Nakao, T. Yoshinobu, H. Sugihara and H. Iwasaki : *The 8th interna. Conf. on Solid State Sen. and Actuators, Late News Abst. Stockholm 63* (1995).
- 16) H. Tanaka, T. Yoshinobu and H. Iwasaki : *Sensors & Actuators (to be published)*.