

神経細胞ネットワーク機能解析への応用を目指した  
プレーナーイオンチャネルバイオセンサーの開発

浅野 豪文

博士 (理学)

総合研究大学院大学  
物理科学研究科  
構造分子科学専攻

2008

# 要旨

細胞は外界より与えられた様々な情報に対して、シグナル伝達機構を用いて細胞の増殖や分化、神経細胞のシナプス可塑性などの生命現象を展開している。このシグナル伝達機構の実体は主にタンパク質等の分子からなる巨大な生化学反応ネットワークである。近年、それらの機能分子の同定や分子機構が徐々に明らかになりつつあるが、細胞間あるいは細胞集合体としてのネットワークにおける情報処理機構については不明な点が多く、ネットワーク内の協調的作用機構の特性を明らかにする必要がある。細胞内外の情報のやり取りの中心的役割を担っているのが、生体内の細胞膜上に存在する膜タンパク質である。さらに、それらは多くの疾病との関与も示唆されており、神経ネットワーク網の破綻が神経変性疾患における神経機能の障害をもたらす直接的要因であることが考えられる。このように神経細胞が構成する細胞間ネットワークのシグナル伝達機構を解明するためには、膜タンパク質の活動メカニズムや生体システムとしての総合的な理解が必要であり、それを実現できる研究方法論及びデバイスの創製が急務である。

現在、細胞機能を計測する有力な手法としてパッチクランプ法が挙げられる。微小ガラス管ピペットにより区切られた細胞膜における単一あるいは複数のチャネル分子の活動を、それを通り抜けるイオン電流として記録する手法である。生細胞のイオンチャネル分子の機能をリアルタイムに観察できる優れた計測法である反面、①低いスループット性、②操作の熟練性、③小型化の困難性、④多点計測の困難性、⑤神経回路の全容解析の困難性などの欠点及び制限がある。これらの問題点に対して、二次元平面に展開したプレーナー型のパッチクランプ素子が提案されている。プレーナー素子のメリットは表面微細加工技術を駆使して、電極の微細・集積化による多点計測やハイスループット化が実現できる点である。さらに原子間力顕微鏡や共焦点レーザー顕微鏡、蛍光イメ

ージングなどの手法との組み合わせが容易に可能となる。近年、盛んに研究開発が進められており、小型化した素子や簡便性、多点計測を可能にした装置などが開発され、上記①～④の問題点に関しては解決されつつある。しかし、安定性において課題が残されていることやタイムラプスの計測ができないこと、剥離した直後の細胞のみに測定が限られることなどの欠点があり、⑤のような神経回路網全体を研究対象とする場合には適していない。

本研究では従来法の持つ問題点を解決し、細胞から細胞への化学的、電氣的にシグナル伝達を行う神経ネットワークの機能を解析するためのバイオセンサー素子及び手法の開発を行った。これまでに報告されている既存のプレーナー型のパッチクランプ素子の基板材料にはガラスやプラスチック等が用いられており、特にシリコン(Si)は高ノイズ性である点が問題視されていた。これに対し酸化膜層を Si 層でサンドウィッチ状にした silicon on insulator(SOI)を用いて、さらに熱酸化処理により基板表面に非導電性の酸化膜層を形成させることで膜厚に応じて基板の持つ浮遊容量を低減させた。これによりバックグラウンドノイズの最大の要因となる基板固有の電気容量起因のノイズを抑えることができ、S/N 比の大幅な向上を実現した。電極部に当たる基板の微細貫通孔(直径 1-1.5  $\mu\text{m}$ )は、半導体プロセス(異方性ウェットエッチングと熱酸化処理)及び収束イオンビーム(FIB)加工を用いた三次元加工プロセスにより作製した。さらに従来法では困難であった細胞間のシグナル伝達やタイムラプスの計測を可能にする培養計測モードを開発した。これは素子内で培養を行い、測定基板上に細胞間ネットワークを形成させた後に電気測定を適用することで、細胞間の応答や相互作用の観察が可能となる。細胞接着性タンパク質をコートしたセンサー基板上で培養したリガンド作動型 transient receptor potential vanilloid type 1(TRPV1)を発現した Human embryonic kidney 293(HEK293)細胞に対してホールセル電位固定記録を行い、リガンド(カプサイシン)刺激に応じたイオンチャネルの開閉によるイオン電流を観察することに成功し、本研究開

発のプレーナー型バイオセンサーが実用レベルでの高い S/N 比で電流記録が実現できることを実証した。また、素子の電気等価回路モデルを立て、培養モードにおける細胞－基板（微細孔）間接着部を流れる電流波形の解析を行い、本素子の主要なノイズ源が過剰電流ノイズであることを数値理論と実証実験で証明し、雑音低減の指針を示した。

神経細胞は生体内において感覚器や効果器といった複数の細胞と結合し複雑なネットワークを形成させることで情報伝達の処理機能を発揮しているため、シグナル解析が複雑困難である。そこで、細胞体と突起部を空間的に分離させた神経ネットワークを素子の測定基板上に形成させるために、microcontact printing( $\mu$ CP)を用いたタンパク質の固定化による細胞マイクロパターンニングを行った。神経細胞をパターン整列させるための形状と大きさの幾何学的パターンを持った polydimethylsiloxane(PDMS)製のスタンプをソフトリソグラフィにより作製し、このスタンプを用いて基板上にタンパク質パターンを形成させた。神経系のモデル細胞であるラット副腎髄質褐色細胞腫由来細胞(PC12)を用いて神経成長因子による分化誘導を行うと、タンパク質の特定の微細パターン形状に従い、細胞体の配置及び軸索伸張が誘導され、測定基板上に細胞の形態、成長領域が制御された神経細胞のネットワークアレイを形成させることができた。

細胞間のシグナル伝達解析を精密に行うために、時間的・空間的に解像度が優れている光を利用した光刺激法を開発した。遺伝子工学的手法を用いて生物由来の光受容体ロドプシンファミリータンパク質の神経細胞への発現を試みた。ロドプシンファミリータンパク質は、単細胞緑藻類の一種コナミドリムシの眼点に分布し、可視光に応答してイオンを透過させることで膜電位を制御する光受容チャネルである。その一つである channelrhodopsin-2(ChR2)の光感受性とイオンチャネルの機能を利用して、細胞に刺激を与える。 $\mu$ CPにより基板微細孔上に形成させた ChR2-PC12 のネットワークよりホールセル電位固定記録を行うと、光照射に同期した光電流の発生を確認した。また、光電流の活性化と脱活性化はともにミリ秒オーダーの時定数を示し、興奮性シナプス後

膜電流の立ち上がりの早さに匹敵することから刺激と反応の同期性という点で、ChR2を用いた光刺激によって細胞を刺激し、細胞から細胞への信号の送受信制御が可能であることを示した。

現在、神経系の研究ではガラス微小電極などによる電気生理学的手法や電位感受性色素などを用いたイメージング法により個々のニューロンの電位変化を一細胞レベルで記録している。また、フローサイトメトリー法などにより単位時間あたりに多くの細胞を測定できる細胞分析技術により統計的な解析が行われている。しかし、本研究で対象とする神経細胞ネットワークのような細胞間あるいは細胞集団における外的刺激前後の応答や特定の細胞に対する応答など、多くの細胞を対象とした一細胞レベルの解析は困難である。開発したセンサー素子は測定基板上で機能発現した細胞に対する観察を可能にし、細胞間のシグナル伝達や相互作用を計測することができる。さらに電極の集積化を行うことで、従来法では技術的に困難であった多数のニューロンの活動や応答を同時に記録することができ、神経回路全体のシグナル伝達機構の詳細な解析が可能となる。また、神経細胞ネットワークシステムの機能を明らかにすることは、神経変性疾患の神経細胞死の基礎過程との関係や発症機構の解明及び治療法の開発につながるものと期待できる。本研究開発素子は半導体材料であるシリコンを基板として用いていることから、半導体微細加工技術を用いて素子の微細化や後段のデータ処理回路の集積化を行うことで、小型且つ可搬型の細胞機能解析システムや非常に簡便な薬剤スクリーニングシステムなどの応用も期待できる。

# Abstract

Neuronal cells control the life phenomena such as the cell proliferation, differentiation and survival using the various signaling functions in the network for various external stimulations. However, the function of a neuronal network and the mechanism of a signal transduction is not fully understand. The function analysis of reproducible and well-defined artificial networks of neuronal cells in vitro offers a promising approach to refine existing neuronal models and to gain deeper understanding of the related processes. Membrane proteins are known as indispensably important molecules for the cell functions. In addition, many reports have shown that dysfunctions of membrane proteins strongly relate to severe diseases. The pipette patch-clamp is a very excellent technique which can be used to detect the electrical activity of cells and their networks. It, however, has several difficulties in monitoring multiple cells simultaneously, high-throughput screenings, and long time laps measurements and also has disadvantage of high level skill-requirement in operations. The planar patch-clamp method is suitable for the miniaturization of the experimental apparatus and moderates the requirement of high skill-level. However, some problems exist still even in the conventional planer patch-clamp method. The lifetime of the cells in the measurement is too short to be applied to cell function analysis.

In the present study, a new planar type ion channel biosensor was developed to overcome the problems in the conventional methods. This biosensor has advantages in time laps recording, applicability to the analysis of a neural network function, and significant miniaturization by combining with a Si integrated electrical circuit, retaining the advantages of the conventional planar patch-clamp methods. This sensor can be potentially applied to functional analysis of

neural network, clarification of neurodegenerative disease mechanism, and development of their treatment method.

The micro fabrication of the sensor chip was achieved using a semiconductor technology and focused ion beam (FIB) process. The performance of the fabricated sensor was demonstrated with two measurement methods, the planar patch-clamp (conventional) mode and the incubation (newly developed) mode. The whole-cell current of the TRPV1-transfected HEK293 cells activated by capsaicin ligand stimulations was successfully recorded by both measurement modes. Current noise and its power spectrum have been measured by the incubation mode. The spectral density and the variance of these noises were formulated in the general form using an equivalent circuit. The observed noise in the present device was explained by the excess noise with  $1/f$  dependence, which mainly originates from the current through the cleft between the cell membrane and the substrate surface.

Neuronal networks on the substrate in the sensor were formed by microcontact printing ( $\mu$ CP). Extracellular matrix (ECM) proteins have been patterned with polydimethylsiloxane (PDMS) stamp by this method, in order to control the neuronal cell growth on the substrate surface in the sensor. PC12 cells were seeded on the substrate printed with laminin (LN) micropatterns. After the cells were cultured for 2 - 6 days, the growth of the cell bodies and neurites were confined to the LN patterns on the surface. The light-gated channel (ChR2) was expressed in PC12 cells for transmission and reception of the signal as a optical stimulation method. The photostimulation is ideal for stimulating a selected point of the soma or axon of a single cell in a neuronal network. In this study, it was shown that the present planar biosensor, the neural network device combined with photostimulation methods has tremendous potential for the investigation of cell-cell interactions, synapse functions and network functions.

## 本論文で使用した略語一覧

<b>AFM</b>	Atomic force microscope
<b>BHK</b>	Baby hamster kidney
<b>BOX</b>	Buried oxide
<b>CaM</b>	Calmodulin
<b>CAP</b>	Capsaicin
<b>Chop2</b>	Channelopsin-2
<b>ChR1</b>	Channelrhodopsin-1
<b>ChR2</b>	Channelrhodopsin-2
<b>CMOS</b>	Complementary metal oxide semiconductor
<b>DMEM</b>	Doubecco's modified Eagle's medium
<b>DNA</b>	Deoxyribonucleic acid
<b>EB</b>	Electron beam
<b>ECM</b>	Extracellular matrix
<b>EGF</b>	Epidermal growth factor
<b>FBS</b>	Fetal bovine serum
<b>FFT</b>	Fast Fourier transform
<b>FIB</b>	Focused ion beam
<b>FITC</b>	Fluorescein isothiocyanate
<b>FN</b>	Fibronectin
<b>HEK293</b>	Human embryonic kidney 293
<b>HIV-1</b>	Human immunodeficiency virus type 1
<b>IPA</b>	Isopropyl alcohol
<b>LN</b>	Laminin
<b>LSI</b>	Large scale integration
<b>MEMS</b>	Micro elector mechanical systems
<b>NGF</b>	Nerve growth factor
<b>PBS</b>	Phosphate buffered saline
<b>PC12</b>	Pheochromocytoma-12
<b>PDMS</b>	Polydimethylsiloxane
<b>PKC</b>	Protein kinase
<b>PLL</b>	Poly-L-lysin
<b>RCA</b>	Radio corporation of America



略語一覽

<b>SIMOX</b>	Separation by implantation of oxygen
<b>SOI</b>	Silicon on insulator
<b>S/N</b>	Signal-to-noise
<b>TE</b>	Trypsin-EDTA
<b>TEM</b>	Transmission electron microscope
<b>TMAH</b>	Tetra methyl ammonium hydroxide
<b>TRPV1</b>	Transient receptor potential vanilloid type 1
<b>UV</b>	Ultraviolet
<b>WCA</b>	Water contact angle
<b>μCP</b>	Microcontact printing

# 目次

## 第1章 緒論

1.1 研究目的と背景 .....	1
1.2 構成 .....	4
参考文献 .....	6

## 第2章 プレーナーイオンチャネルバイオセンサーの提案 と作製

2.1 緒言 .....	12
2.2 プレーナーイオンチャネルバイオセンサーの概念と設計 .....	13
2.3 イオンチャネル電流計測法	
2.3.1 ピペット - パッチクランプ法の原理 .....	14
2.3.2 プレーナー - パッチクランプ法 .....	17
2.3.3 プレーナー - 培養モード .....	18
2.4 SOI 基板を用いたセンサーチップの作製	
2.4.1 シリコン基板洗浄 .....	19
2.4.2 センサー電極部 - 微細貫通孔の作製 .....	21
2.5 熱酸化処理による基板修飾及び電気的特性評価 .....	24
2.6 センサーチップ洗浄方法 .....	27
2.7 結言 .....	28
参考文献 .....	29

## 第3章 プレーナー型イオンチャネルバイオセンサーの特性評価

3.1 緒言	34
3.2 実験方法	
3.2.1 細胞培養及びリガンド作動型イオンチャネル—TRPV1	34
3.2.2 電気測定システム	37
3.2.3 プレーナーパッチクランプモード	37
3.2.4 穿孔パッチ法	39
3.2.5 培養モード	40
3.2.6 電気ノイズ解析	42
3.3 実験結果及び考察	
3.3.1 TRPV1 チャネル電流記録—プレーナーパッチクランプモード	43
3.3.2 システム内における細胞培養	46
3.3.3 TRPV1 チャネル電流記録—培養モード	48
3.3.4 電気ノイズ特性評価	50
3.4 結言	55
参考文献	56

## 第4章 神経細胞ネットワーク機能解析素子への展開 —要素技術の開発—

4.1 緒言	63
4.2 実験方法	
4.2.1 神経細胞ネットワークアレイパターン設計	64
4.2.2 $\mu$ CP法を用いた細胞マイクロパターンニング	66
4.2.3 光感受性イオンチャネルの遺伝子導入	69

4.3	実験結果及び考察	
4.3.1	ネットワークスタンプの作製と ECM パターニング	71
4.3.2	神経細胞ネットワークの構築と評価	74
4.3.3	光感受性 PC12 細胞を用いた光刺激法	76
4.4	結言	79
	参考文献	80

<b>第5章</b>	<b>総括</b>	85
------------	-----------	----

	研究業績	89
--	------	----

参考資料

謝辞

# 第1章

## 緒言

1.1 研究目的と背景

1.2 構成

参考文献

### 1.1 研究目的と背景

細胞は外界より与えられた様々な情報(シグナル)に対して、シグナル伝達機構を用いて細胞の増殖や分化、神経細胞のシナプス可塑性などの様々な生命現象を展開している[1]。このシグナル伝達機構の実体は主にタンパク質等の分子からなる巨大な生化学反応ネットワークである[2-4]。近年、それらの機能分子の同定や分子機構が徐々に明らかになりつつあるが、細胞間あるいは細胞集合体としてのネットワークにおける情報処理機構については不明な点が多い。これまでにシグナル伝達ネットワークには非線形性が存在することが報告されており[5-7]、個々の分子の構造や機能と関連させたネットワーク内の協調的作用機構の特性を明らかにする必要がある。細胞内外の情報のやり取りの中心的役割を担っているのが、チャネルやトランスポーター、レセプターとして生体内の細胞膜上に存在する膜タンパク質である[8]。これらの膜タンパク質は生体機能維持に大きな役割を果たし、不可欠な重要分子であることが知られている[9,10]。さらに近年では様々な疾病との関与が示唆されており[11,12]、その一つに難治

性の神経変性疾患であるアルツハイマー病が挙げられる。神経細胞の顕著な脱落を伴う進行性の疾患で[13,14]、この疾患の症状である認知機能低下と神経細胞シナプスの機能変性との間の因果関係が示唆されているが[15-18]、発症メカニズムは明らかにされておらず、有効な治療法も見出されていない。しかし、神経変性疾患における神経機能の障害をもたらす直接的要因は、神経ネットワーク網の破綻である。神経細胞が構成する細胞間ネットワークのシグナル伝達機構を解明するためには、膜タンパク質の活動メカニズムや生体システムとしての総合的な理解が必要であり、それを実現できる研究方法論及びデバイスの創製が急務である。

脳神経系の活動においてイオンチャネルは膜電位変化を発生させ、電気信号による情報伝達の重要な役割を果たしている[10]。現在、細胞(イオンチャネル)機能を計測する有力な手法として、パッチクランプ法が挙げられる[19-23]。微小ガラス管ピペットにより区切られた細胞膜の一部における単一あるいは複数のチャネル分子の活動を、それを通り抜けるイオン電流として記録する手法である。パッチクランプ法の特徴は高抵抗シールを形成するために①リーク電流が極少[19]、②バックグラウンドノイズが極少[21]、③小細胞においても電位固定下での膜電流記録が可能[22]、④直接細胞内環境のコントロールが可能[23]なことが長所として挙げられる。しかし、生細胞のイオンチャネル分子の機能をリアルタイムに観察できる優れた計測法である反面、以下に示す欠点及び制限がある。

- 1) スループットが低い。
- 2) 操作に熟練性が要求される。
- 3) 除振台など装置が大掛かりなために小型化が困難である。
- 4) 多点同時計測が困難である。
- 5) 神経回路のような生体システムの全容解析が困難である。

これらの問題点に対して、ピペットパッチクランプ素子を二次元平面に展開したブ

プレーナー型のパッチクランプ素子が提案されている。プレーナー素子のメリットは表面微細加工技術を駆使して、電極の小型・集積化による多点計測やハイスループット化が実現できる点である[24]。さらに原子間力顕微鏡(AFM; atomic force microscope)[25]や共焦点レーザー顕微鏡[26]、蛍光イメージング[27]、分光分析[28]などの物理学的手法との組み合わせが容易に可能となる。近年盛んに研究開発が進められており、小型・微細化した素子[29-38]や簡便性、多点計測を可能にした装置[39,40]などが開発され、上記 1)~4)の問題点に関しては解決されつつある。しかし、感度や安定性において課題が残されていることやタイムラプスの計測ができないこと、剥離した直後の細胞のみに測定が限られることなどの欠点があり、5)のような神経回路網全体を研究対象とする場合には適していない。

そこで、従来法の持つ問題点を解決し、細胞から細胞への化学的、電気的なシグナル伝達を行う神経ネットワークの機能を解析するためのバイオセンサー素子及び手法の開発を目的として本研究を行った。具体的にはプレーナー型パッチクランプ素子構造とし、神経細胞ネットワークをセンサー上に形成させ、単純化された *in vitro* の測定系を構築することで、細胞間の相互作用や信号伝達の観察を可能にするセンサーとした。これにより神経ネットワークにおけるシグナル伝達機構の定量的な解析が可能となる。また、神経細胞が構成する情報処理システムを明らかにすることは、神経変性疾患過程で観察される神経細胞死の基礎過程との関係や発症機構の解明及び治療法の開発につながるものと期待できる。

## 1.2 構成

本論文は提案したプレーナーイオンチャネルバイオセンサー及び研究手法について、素子の有用性を検証するとともに、神経細胞ネットワークの機能解析に応用するために行った要素技術及び手法の開発についてまとめたものであり、5つの章より構成される。

第1章では緒論として、神経科学分野における研究手法と現状及び、近年盛んに研究が行われているバイオセンサーの研究動向について言及し、本研究の位置付けと目的について述べた。

第2章では提案したプレーナーイオンチャネルバイオセンサーの概念及び作製方法について述べた。神経細胞ネットワークの機能解析に応用するために、培養中の細胞に対するタイムラプス測定が可能な培養測定モードを開発した。半導体プロセスと集束イオンビーム(FIB; focused ion beam)を用いた三次元微細加工法を確立し、基板微細孔の作製を行った。作製した基板の電気的特性を検証し、熱酸化プロセスを用いた基板修飾による最適構造化を行った。

第3章では作製したセンサー素子の特性評価として、二つの測定モードによる全細胞膜電流記録及びノイズ解析を行った。基板表面に細胞外基質修飾を行い、測定基板上での細胞培養からイオンチャネル電流計測までの一連の操作を素子内で実現した。またシステムの電気的特性を検証し、数値理論計算と実証実験によるノイズ解析を行い、雑音低減の指針を示した。



第4章ではタンパク質分子パターンニングによる神経細胞ネットワークの構築法及び光感受性イオンチャネルを用いた光刺激法の要素技術の構築を行った。Microcontact printing ( $\mu$ CP)法を用いて形成した細胞外基質のパターンによる細胞マイクロパターンニングを行い、パターン形状によるネットワーク構築特性を評価した。遺伝子工学手法を用いて生物由来の光受容体ロドプシンファミリータンパク質を神経細胞に発現させ、光照射により細胞を刺激する細胞興奮法を開発した。

第5章では総括として本論文内容をまとめると共に、今後の展望について述べた。

## 参考文献

1. Kandel, E. R., Schwartz, J. H. and Jessell, T. M. "*Principals of neural science*"; Appleton & Lange, (2000).
2. Radhika, V. and Dhanasekaran, N., "Transforming G proteins", *Oncogene*, (2001), **20**, 1607-1614.
3. Neves, S. R., Ram, P. T. and Iyengar, R., "G protein pathways", *Science*, (2002), **296**, 1636-1639.
4. Berman, D. M., Karhadkar, S. S., Hallahan, A. R., Pritchard, J. I., Eberhart, C. G., Watkins, D. N., Chen, J. K., Cooper, M. K., Taipale, J., Olson, J. M. and Beachy, P. A., "Medulloblastoma growth inhibition by Hedgehog pathway blockade", *Science*, (2002), **297**, 1559-1561.
5. Baker, N. E., "Notch signaling in the nervous system. Pieces still missing from the puzzle", *Bioessays*, (2000), **22**, 264-273.
6. Bliss, T. V. P. and Collingridge, G. L., "A synaptic model of memory long-term potentiation in the hippocampus", *Nature*, (1993), **361**, 31-39.
7. Watabe, A. M., Zaki, P. A. and O'Dell, T. J., "Coactivation of beta-adrenergic and cholinergic receptors enhances the induction of long-term potentiation and synergistically activates mitogen-activated protein kinase in the hippocampal CA1 region", *J. Neurosci.*, (2000), **20**, 5924-5931.
8. Ganong, W. F. "*Review of medical physiology*"; Maruzen, (2006), **22**.
9. Weinreich, F. and Jentsch, T. J., "Neurological diseases caused by ion-channel

- mutations", *Curr. Opin. Neurobiol.*, (2000), **10**, 409-415.
10. Hille, B. "*Ion channels of excitable membranes (3rd edition)*"; Sinauer, (2001).
  11. Erica, C. L. and H., E. L. F., "Axonal transport and neurodegenerative disease", *Biochim. Biophys. Acta*, (2006), **1762**, 1094-1108.
  12. Arispe, N., Diaz, J. C. and Simakova, O., "A beta ion channels. Prospects for treating Alzheimer's disease with A beta channel blockers", *Biochim. Biophys. Acta*, (2007), **1768**, 1952-1965.
  13. Yankner, B. A., "Mechanisms of neuronal degeneration in Alzheimer's disease", *Neuron*, (1996), **16**, 921-932.
  14. Hardy, J. and Selkoe, D. J., "Medicine - The amyloid hypothesis of Alzheimer's disease: Progress and problems on the road to therapeutics", *Science*, (2002), **297**, 353-356.
  15. Yamamoto, N., Fukata, Y., Fukata, M. and Yanagisawa, K., "GM1-ganglioside-induced A $\beta$  assembly on synaptic membranes of cultured neurons", *Biochim. Biophys. Acta*, (2007), **1768**, 1128-1137.
  16. Hayashi, H., Kimura, N., Yamaguchi, H., Hasegawa, K., Yokoseki, T., Shibata, M., Yamamoto, N., Michikawa, M., Yoshikawa, Y., Terao, K., Matsuzaki, K., Lemere, C. A., Selkoe, D. J., Naiki, H. and Yanagisawa, K., "A seed for Alzheimer amyloid in the brain", *J. Neurosci.*, (2004), **24**, 4894-4902.
  17. Yamamoto, N., Matsubara, E., Maeda, S., Minagawa, H., Takashima, A., Maruyama, W., Michikawa, M. and Yanagisawa, K., "A ganglioside-induced toxic soluble A beta assembly - Its enhanced formation from A beta bearing the Arctic mutation", *J. Biol. Chem.*, (2007), **282**, 2646-2655.
  18. Mattson, M. P., "Cellular actions of beta-amyloid precursor protein and its soluble and fibrillogenic derivatives", *Physiol. Rev.*, (1997), **77**, 1081-1132.

19. Neher, E. and Sakmann, B., "Noise-analysis of drug-induced voltage clamp currents in denervated frog muscle-fibers", *J. Physiol.*, (1976), **258**, 705-729.
20. Neher, E. and Sakmann, B., "Single-channel currents recorded from membrane of denervated frog muscle-fibers", *Nature*, (1976), **260**, 799-802.
21. Neher, E., Sakmann, B. and Steinbach, J. H., "The Extracellular Patch Clamp; A Method for Resolving Currents through Individual Open Channels in Biological Membranes", *Pflug. Arch.*, (1978), **375**, 219-228.
22. Sakmann, B. and Neher, E. "*Single-channel recording, 2nd edition*"; Plenum Press, (1995).
23. Hamill, O. P., Marty, A., Neher, E., Sakmann, B. and Sigworth, F. J., "Improved patch-clamp techniques for high-resolution current recording from cells and cell-free membrane patches", *Pflug. Arch.*, (1981), **391**, 85-100.
24. Xu, J., Wang, X. B., Ensign, B., Li, M., Wu, L., Guia, A. and Xu, J. Q., "Ion-channel assay technologies: quo vadis?", *Drug Discov. Today*, (2001), **6**, 1278-1287.
25. Quist, A. P., Chand, A., Ramachandran, S., Daraio, C., Jin, S. and Lal, R., "Atomic force microscopy imaging and electrical recording of lipid bilayers supported over microfabricated silicon chip nanopores: Lab-on-a-chip system for lipid membranes and ion channels", *Langmuir*, (2007), **23**, 1375-1380.
26. Fertig, N., Tilke, A., Blick, R. H., Kotthaus, J. P., Behrends, J. C. and ten Bruggencate, G., "Stable integration of isolated cell membrane patches in a nanomachined aperture", *Appl. Phys. Lett.*, (2000), **77**, 1218-1220.
27. Ide, T. and Yanagida, T., "An artificial lipid bilayer formed on an agarose-coated glass for simultaneous electrical and optical measurement of single ion channels", *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, (1999), **265**, 595-599.

28. Macdonald, A. G. and Wraight, P. C., "Combined spectroscopic and electrical recording techniques in membrane research Prospects for single channel studies", *Prog. Biophys. Mol. Biol.*, (1995), **63**, 1-29.
29. Sordel, T., Garnier-Raveaud, S., Sauter, F., Pudda, C., Marcel, F., De Waard, M., Arnoult, C., Vivaudou, M., Chatelain, F. and Picollet-D'hahan, N., "Hourglass SiO<sub>2</sub> coating increases the performance of planar patch-clamp", *J. Biotechnol.*, (2006), **125**, 142-154.
30. Pantoja, R., Nagarah, J. M., Starace, D. M., Melosh, N. A., Blunck, R., Bezanilla, F. and Heath, J. R., "Silicon chip-based patch-clamp electrodes integrated with PDMS microfluidics", *Biosens. Bioelectron.*, (2004), **20**, 509-517.
31. Matthews, B. and Judy, J. W., "Design and fabrication of a micromachined planar patch-clamp substrate with integrated microfluidics for single-cell measurements", *J. Microelectromech. Syst.*, (2006), **15**, 214-222.
32. Li, X. H., Klemic, K. G., Reed, M. A. and Sigworth, F. J., "Microfluidic system for planar patch clamp electrode arrays", *Nano Lett.*, (2006), **6**, 815-819.
33. Mayer, M., Kriebel, J. K., Tosteson, M. T. and Whitesides, G. M., "Microfabricated teflon membranes for low-noise recordings of ion channels in planar lipid bilayers", *Biophys. J.*, (2003), **85**, 2684-2695.
34. Klemic, K. G., Klemic, J. F., Reed, M. A. and Sigworth, F. J., "Micromolded PDMS planar electrode allows patch clamp electrical recordings from cells", *Biosens. Bioelectron.*, (2002), **17**, 597-604.
35. Klemic, K. G., Klemic, J. F. and Sigworth, F. J., "An air-molding technique for fabricating PDMS planar patch-clamp electrodes", *Pflug. Arch.*, (2005), **449**, 564-572.
36. Fertig, N., George, M., Klau, M., Meyer, C., Tilke, A., Sobotta, C., Blick, R. H. and Behrends, J. C., "Microstructured apertures in planar glass substrates for ion channel

- research", *Recept. Channels*, (2003), **9**, 29-40.
37. Kiss, L., Bennett, P. B., Uebele, V. N., Koblan, K. S., Kane, S. A., Neagle, B. and Schroeder, K., "High throughput ion-channel pharmacology: Planar-array-based voltage clamp", *Assay Drug Dev. Technol.*, (2003), **1**, 127-135.
38. Pandey, S., Mehrotra, R., Wykosky, S. and White, M. H., "Characterization of a MEMS biochip for planar patch-clamp recording", *Solid-State Electron.*, (2004), **48**, 2061-2066.
39. Bruggemann, A., Stoelzle, S., George, M., Behrends, J. C. and Fertig, N., "Microchip technology for automated and parallel patch-clamp recording", *Small*, (2006), **2**, 840-846.
40. Stett, A., Burkhardt, C., Weber, U., van Stiphout, P. and Knott, T., "Cytocentering: A novel technique enabling automated cell-by-cell patch clamping with the CytoPatch (TM) chip", *Recept. Channels*, (2003), **9**, 59-66.

## 第2章

# プレーナーイオンチャネルバイオセンサー の提案と作製

原著論文: *表面科学*, (2007), **28**, 385-390.

*Trans. MRS-J*, (2008), **33**, 767-770.

- 2.1 緒言
- 2.2 プレーナーイオンチャネルバイオセンサーの設計
- 2.3 イオンチャネル電流計測法
  - 2.3.1 ピペット - パッチクランプ法の原理
  - 2.3.2 プレーナー - パッチクランプモード
  - 2.3.3 プレーナー - 培養モード
- 2.4 SOI 基板を用いたセンサーチップの作製
  - 2.4.1 シリコン基板洗浄
  - 2.4.2 センサー電極部 - 微細貫通孔の作製
- 2.5 熱酸化処理による基板修飾及び電気的特性評価
- 2.6 センサーチップ洗浄方法
- 2.7 結言
- 参考文献

## 2.1 緒言

これまでに報告されている既存のプレーナー型素子の基板材料にはガラス[1,2]やプラスチック[3,4]、polydimethylsiloxane(PDMS)[5,6]、シリコン[7]等が用いられており、特にシリコンは高ノイズ性である点が問題視されていた。この問題に対してシリコン酸化膜( $\text{SiO}_2$ )の上にシリコン(Si)単結晶層を形成させた構造の silicon on insulator (SOI)を基板として用いることとした。SOIはCMOS LSIの高速性・低消費電力化を向上させる目的で開発された基板で、サイモックス(SIMOX: separation by implantation of oxygen)方式と張り合わせ方式の2つの製造法がある[8,9]。SIMOX方式はSiウェーハに酸素イオンを注入し埋め込み、それを高熱で酸化させることでシリコン結晶中に $\text{SiO}_2$ の絶縁膜を形成させる。張り合わせ方式は、 $\text{SiO}_2$ 層をウェーハ上に直接成長させ、その上に別のウェーハを貼り合わせて作製する。酸化膜が絶縁体として作用することで、シリコンに吸収される電気エネルギー量が低減され、寄生容量を大幅に抑制する特徴を持っている。本研究では寄生容量及び基板強度を考慮して、厚い $\text{SiO}_2$ 層を形成できる張り合わせ方式で作製されたSOIを用いた。

本章では提案したプレーナーイオンチャネルバイオセンサーの概念及びパッチクランプ法、新しく開発した測定法について述べ、作製方法並びに熱酸化処理プロセスを用いた基板修飾による素子の特性評価と構造の最適化を行った結果を詳述する。



## 2.2 プレーナーイオンチャンネルバイオセンサーの設計

本研究開発のセンサーは細胞間において化学的・電氣的に情報伝達を担う神経細胞の機能計測への応用を念頭に置き、素子設計を行った。神経ネットワークにおける細胞間の観察を行うために、システム内で細胞培養により神経細胞ネットワークを測定基板上に形成させることで、生理機能発現後の細胞に対して計測が可能なセンサーとした。図 2.1 に提案したプレーナーイオンチャンネルバイオセンサーの素子構造及び測定モードの概略図を示す。プレーナーパッチクランプモード及び培養モードの測定法の詳細については、第 2.3.2 及び 2.3.3 節にてそれぞれ述べる。素子は上下 2 層のチャンバーで構成されており、電極となるセンサーチップを PDMS によってチャンバー間にシールする。システム内培養を行うために必要となる素子の滅菌はアルコール洗浄と ultraviolet(UV) 照射により行う。そのため、素子の材質としては培養部である上チャンバーにはフッ素系樹脂(ダイフロン)、下チャンバーには加工が容易な塩化ビニル樹脂を用いた。また、下チャンバー部の電極には銀管を用いてアンプとの電氣的接続点に加えて、薬物や電解液の溶液交換をするための還流用の流路として利用した。

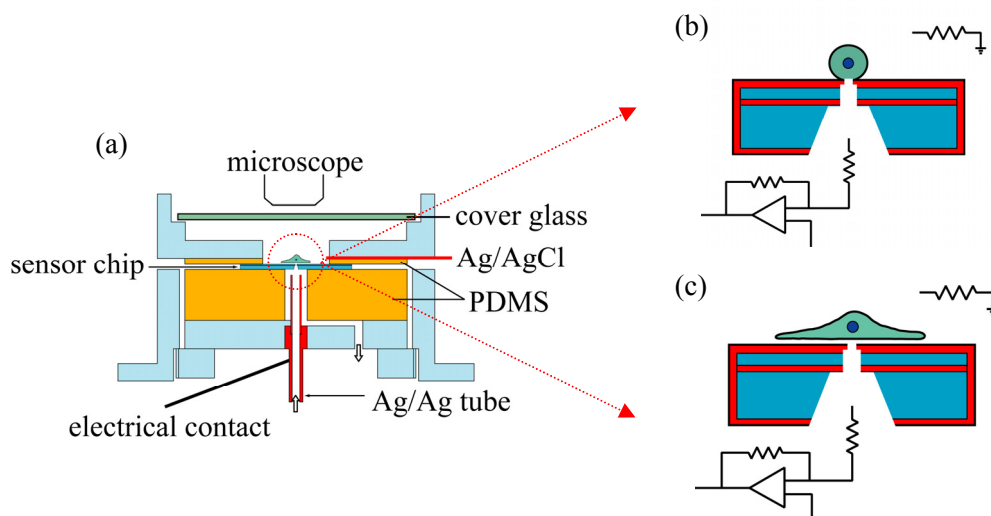


図 2.1 提案したプレーナーイオンチャネルバイオセンサーの概略図  
 (a) 素子構造の全体図、(b), (c) 本素子による二つの測定モードの概略図；プレーナーパッチクランプモード(b), 培養モード(c)

## 2.3 イオンチャネル電流計測法

### 2.3.1 ピペット - パッチクランプ法の原理

パッチクランプ法は、細胞膜における単一あるいは複数のイオンチャネル分子の活動や機能をリアルタイムに計測できる手法である[10-14]。細胞膜に微小ガラス管ピペットを高抵抗で密着させ、その先端開口部の微小膜領域を電氣的に他の領域と隔絶した状態で電位固定することで、そこに含まれるイオンチャネルを通るイオン電流を計測する(図 2.2)。パッチクランプ法は高抵抗シールを形成するため、リーク電流が極めて少なく、電位固定を正確に行うことが可能である[11]。熱ノイズ及びパッチクランプアンプ

装置に生じる電流雑音はシール抵抗に反比例し小さくなるため、高抵抗シール下ではバックグラウンドノイズが極めて低くなる[13]。また、小細胞においても電位固定下での膜電流記録を可能とすることや直接細胞内環境のコントロールが可能なことなどが長所として挙げられる[14]。

パッチクランプ法はOPアンプで構成されるI-Vコンバーターが基本回路となっている(図 2.2)。OPアンプの電圧利得を無限大とすると、両端(+と-)の入力端子は等電位となり、+の入力端子にコマンド電位を加えるとバーチャル・ショートによって-端子(パッチ膜)も同電位にクランプされる。細胞膜とピペットとの間を高抵抗でシールすることで、シャント電流は極小となり、 $I_p = I$ となる。これをI-Vコンバーター内のフィードバック抵抗( $R_f$ )における電圧降下として検出することで、パッチ膜を横切る電流( $I$ )のほぼ100%をパッチ電極からの記録電流( $I_p$ )として計測する。また、初段OPアンプ  $A_1$  の出力には、膜電位成分も含まれるため  $A_2$  で差し引いている。このように nA - pA オーダーレベルの極小電流の測定を実現している。

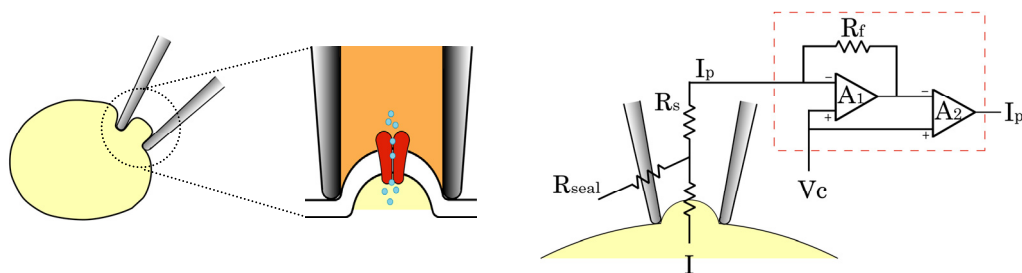
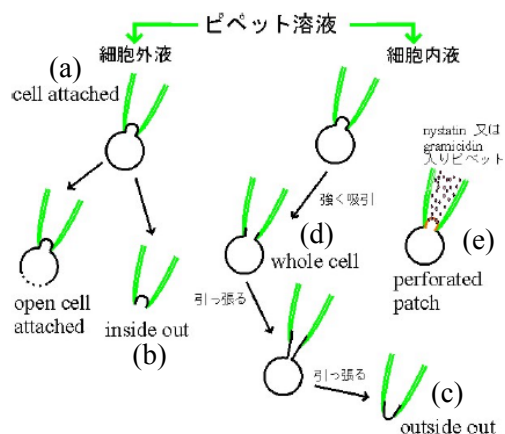


図2.2 ピペットパッチクランプ法の原理図と計測回路

ピペット電極抵抗( $R_s$ )は通常1 - 5 M $\Omega$ 程度で $R_s \ll R_{seal}$ となれば、 $I_p / I = R_{seal} / (R_s + R_{seal}) \sim 1$ となる。 $I_p$ をI-Vコンバータ(点線)内の高抵抗 $R_f$  (feedback resistor)における電圧降下として検出することで細胞膜を通過する電流が計測できる。初段OPアンプ( $A_1$ )に含まれる膜電位成分を次段OPアンプ( $A_2$ )で差し引いている。

補足： $R_s$ はパッチ膜に直列に入るピペット電極抵抗(access resistance または series resistance)、 $R_{seal}$ はピペットー細胞膜間のシール抵抗を示す。

パッチクランプ法には実験目的、方法に応じて種々の測定モードがある。単一チャネル記録(single channel recording)法として、セルアタッチモード(cell-attached mode) [12]、インサイドアウト(inside-out mode) [14]、アウトサイドアウトモード(outside-out mode) [14]、また全細胞膜を流れる電流の記録法としてホールセルモード(whole-cell mode または conventional whole-cell mode) [14]、穿孔パッチモード(perforated patch mode) [15,16]がある(図 2.3)。セルアタッチモードはパッチ電極を細胞上に装着したままで単一チャネ



モード	計測対象	利点	欠点
(a) cell-attached	単一チャネル電流	細胞内環境の保持 セカンドメッセンジャーの予見	細胞内液のコントロール不可 実行電位が不明
(b) inside-out	単一チャネル電流	細胞内液がコントロール可 セカンドメッセンジャーの予見	細胞内環境の欠落
(c) outside-out	単一チャネル電流	細胞外液がコントロール可 リガンド活性の観察	細胞内環境の欠落
(d) whole-cell	全細胞膜電流	細胞内環境がコントロール可 細胞内電位の測定 リガンド活性の観察	チャネルの rundown
(e) perforated patch	全細胞膜電流	細胞内環境の保持 細胞内電位の測定 リガンド活性の観察	$R_a$ が高い 細胞内液のコントロール不可

図2.3 パッチクランプ法の各種の測定モード模式図と特徴

単一チャネル記録(single channel recording)法として、(a) cell-attached mode、(b) inside-out mode、(c) outside-out、全細胞膜を流れる電流(whole-cell mode)法として(d) whole-cell、(e) perforated patch modeがある。各測定モードには表に示すような特徴をそれぞれ持っている。

ル電流を記録する(a)。セルアタッチモードからパッチ電極を引き上げて、細胞からパッチ膜を切り取り、細胞内をバス液に露出させた状態での記録がインサイドアウトモードである(b)。アウトサイドアウトモードは細胞内側が電極内液に面したモードで後述するホールセルモードからパッチ電極を引き上げることで形成される(c)。セルアタッチモードでパッチ膜を破り穴を開け、パッチ膜以外の全細胞膜を流れるイオン電流を記録するのがホールセルモードである(d)。ホールセルモードの細胞内液の washout 問題を克服するためにイオン透過性の高い小孔（イオノフォア）を形成させることで全細胞膜電流を測定するのが穿孔パッチモードである(e)（詳細は第3章 3.2.4 節にて述べる）。

### 2.3.2 プレーナー - パッチクランプモード

プレーナーパッチクランプ法は、平面基板上に形成した微細貫通孔を従来のピペット電極部の替わりとして用いて、細胞膜を捉え計測する手法である(図 2.1 b)。システム構造が二次元平面に展開されたプレーナー素子のメリットは、表面微細加工技術を駆使して小型化や電極のアレイ化を行うことができ、多点計測やハイスループット化が実現できる[17]。また、ピペット電極を配置する必要がなく素子上部の空間自由度が高いため、AFM[18]や共焦点レーザー顕微鏡[19]、蛍光イメージング[20]、分光分析[21]など物理的手法との組み合わせが容易となる。プレーナーパッチクランプではインサイドアウトやアウトサイドアウトモードによる記録は困難であるが、セルアタッチやホールセルモードの記録が可能である。また、素子内に流路を持たせることで還流による電極内液の交換を容易にすることができ、ピペットパッチクランプでは比較的困難である穿孔パッチモードによる記録が再現性良く実現できる。

### 2.3.3 プレーナー - 培養モード

培養モード測定ではプレーナーパッチクランプモードと同様に基板上の微細貫通孔を電極として用いて、システム内の測定基板上で細胞培養を行い、細胞膜の接着、伸展により微細孔を覆わせた後に電流記録を行う(図 2.1 c)。生理機能を発現した細胞を観察することができ、剥離した直後の細胞のみに限られずに、培養中の細胞に対してタイムラプスの計測や細胞間の相互作用の計測などが可能となる。培養モードによる電流記録実験では長時間の観察、測定を考慮し、細胞内の機能分子の washout を抑制し低侵襲的に測定できる穿孔パッチ法によるホールセル電流記録を行う。

## 2.4 SOI 基板を用いたセンサーチップの作製

第 2.1 節にて述べたようにシリコンは抵抗が低いためにバックグラウンド雑音電流が大きいという問題が指摘されていた。そこで、本研究ではシリコン基板の高ノイズ問題をトップ Si 層とバルク Si 間に張り合わせ法で形成した厚い SiO<sub>2</sub> 層(4 $\mu$ m)を BOX(buried oxide)層として挟んだ構造の SOI を基板として用いた。使用した SOI 基板断面の電子顕微鏡(SEM; scanning electron microscope)像を図 2.4 に、仕様を表 2.1 に示す。シリコン基板は半導体プロセスである異方性ウェットエッチングを利用することができ、微細貫通孔構造を正確に作製することができる。また、表面平坦性が高く、種々の表面化学修飾を容易に可能とする点でシリコン基板は有利となる。さらに電子回路を集積することで超小型素子の開発が期待できる点も利点として挙げられる。

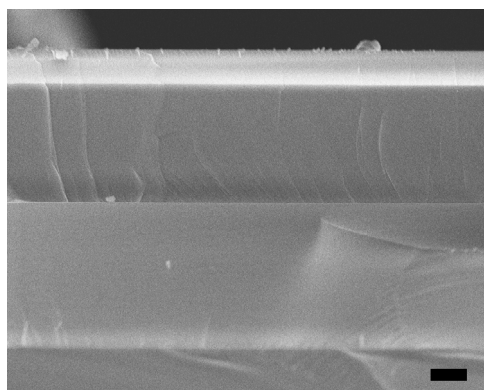


図 2.4 SOI 基板の断面 SEM 像

SiO<sub>2</sub>層が Si 層に挟まれている様子が確認できる。上部最表面層には熱酸化処理による酸化膜層 1 μm が堆積している(2.4.2 節を参照)。(scale bar : 1μm)

表 2.1 SOI 基板の仕様表

type	P-type
抵抗率	50 - 75 Ωcm
面方位	< 100 >
Overall thickness	532 ± 5 μm
SOI (Si) thickness	3 ± 0.5 μm
Oxide thickness	4 ± 0.2 μm

### 2.4.1 シリコン基板洗浄

大気中でシリコン表面は自然酸化によって SiO<sub>2</sub> 層が形成され、また有機物などの汚染を受けるが、RCA 洗浄(Radio corporation of America 社考案のシリコン基板洗浄方法)による十分な洗浄を行うことで清浄な表面を得ることができる。以下の操作は全てクリ

ーンルーム内にて行い、各工程間には超純水( $\geq 18.2 \text{ M}\Omega \text{ cm}$ , Advantech, Millipore Ltd.)によるすすぎ工程を含んでいる。また、フッ化水素酸水溶液処理(工程 5)ではフッ素樹脂製ビーカーを使用し、それ以外の工程ではガラス製ビーカーを用いた。

1. アセトン中で超音波洗浄(RT, 5 min)
2. メタノール中で超音波洗浄(RT, 5 min)
3. Piranha 溶液(硫酸 : 過酸化水素水 = 4 : 1 [v/v])中で煮沸( $90^{\circ}\text{C}$ , 10 min)
4. アンモニア水 : 過酸化水素水 : 純水 = 1 : 4 : 20 [v/v]溶液中で煮沸( $90^{\circ}\text{C}$ , 10 min)
5. 1%フッ化水素酸水溶液中で静置(RT, 10 min)
6. 塩酸 : 過酸化水素水 : 純水 = 1 : 1 : 6 [v/v]溶液中で煮沸( $90^{\circ}\text{C}$ , 10 min)
7. 窒素ガスにて乾燥

以上の方法により清浄な  $\text{SiO}_2$  層を基板表面に形成させた。各溶液による処理は以下の目的のために行った。

- |     |   |             |
|-----|---|-------------|
| 1~3 | : | 有機汚染物と金属の除去 |
| 4   | : | 塵埃吸着物と金属の除去 |
| 5   | : | 自然酸化膜除去     |
| 6   | : | 表面酸化        |



## 2.4.2 微細貫通孔作製

ピペット電極部にあたる基板の微細貫通孔の作製プロセスを図 2.5 に示す。サブマイクロメートルオーダーの精度で微細な三次元加工を実現するため、異方性ウェットエッチング及び FIB 加工を用いて作製を行った。作製手順を以下に示す。水酸化テトラメチルアンモニウム (TMAH; tetra methyl ammonium hydroxide) エッチングの保護及び基板の寄生容量を抑制(詳細は第 2.5 節にて述べる)させるためにウェット熱酸化処理による酸化膜を形成させた。熱酸化プロセスは、酸化性雰囲気中で高温に加熱することでシリコン表面に二酸化珪素( $\text{SiO}_2$ )を形成させる方法である[22,23]。表面に形成された  $\text{SiO}_2$  膜中の拡散速度は酸素イオンより水酸イオンの方が大きいため[24]、水蒸気下での加熱によって酸素下よりも短い時間で膜厚の大きな  $\text{SiO}_2$  層を形成することができる。電気炉に  $95^\circ\text{C}$  で水中をバブリングさせた酸素(1 L/min)雰囲気下で熱酸化を行った。 $\text{Si}/\text{SiO}_2$  のエッチングレート比の差を利用した TMAH エッチング[25-27]によってバルク Si 層を削り BOX 層の  $\text{SiO}_2$  を露出させ、SOI 層と BOX 層のみを残した薄膜部分を形成させた。そして、FIB を用いてエッチング加工することで直径約 0.7- 1.5  $\mu\text{m}$  の貫通孔を作製した。FIB 加工は透過型電子顕微鏡(TEM; transmission electron microscope)試料の作製ツールとしても使用されており、試料表面のイオンビームの照射された部分だけを選択的にエッチングすることができるためマスクレス加工を可能とし、高精度に微細加工ができる特徴を持っている[28,29]。なお、工程 2 と 5 は分子科学研究所 装置開発室とエスアイアイ・ナノテクノロジー(株)にそれぞれ依頼し加工を行った。

1. 基板表面に熱酸化処理[900°C, 10 h, O<sub>2</sub> + H<sub>2</sub>O (95°C, bubbling)]によって約 1 μm の SiO<sub>2</sub>層を形成する。
2. φ 1 mm のダイヤモンドグラインダーにより、SiO<sub>2</sub>層及びバルク Si を切削する (深さ 0.40 - 0.45 mm)。
3. 8% (v/v) TMAH により残りの Si の異方性ウェットエッチング(90°C, 50 min)を行い、BOX 層である SiO<sub>2</sub>層まで到達させる。
4. 熱酸化処理[900°C, 10 h, O<sub>2</sub> + H<sub>2</sub>O(95°C, bubbling)]によってエッチングされ Si が露出した部分を含めた基板表面全体に約 1 μm の SiO<sub>2</sub>層を形成する。
5. FIB を用いて直径約 0.7- 1.5 μm の微細貫通孔を形成する。

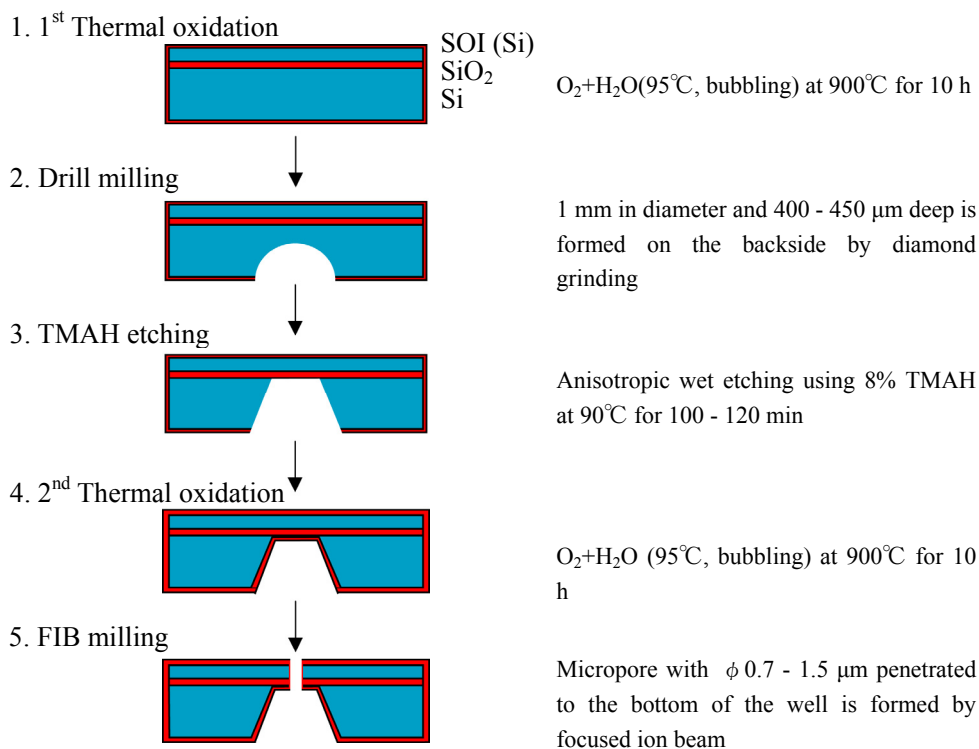


図 2.5 異方性ウェットエッチング及び FIB 加工を用いたセンサーチップの作製方法

Si/SiO<sub>2</sub>のエッチングレート差を利用して、貫通孔のボトムにあたる BOX 層の SiO<sub>2</sub>でエッチングを精確に停止させた。エッチング後に再び熱酸化処理を施し、露出した Si 表面に絶縁体である酸化膜層を形成させた。

作製した微細貫通孔の SEM 像を図 2.6 に示す。基板上に FIB 加工によって平滑な壁面を持ったミクロンオーダーの微細な貫通孔が高精度に形成されていることが確認できる(a)。また、基板裏側では TMAH 異方性ウェットエッチングにより SiO<sub>2</sub> 層で正確にエッチングが停止されているのが観察された(b)。約 300 μm×300 μm の領域のみを薄膜化することで基板強度を維持しつつ、ミクロンオーダーの貫通孔加工を可能にした。

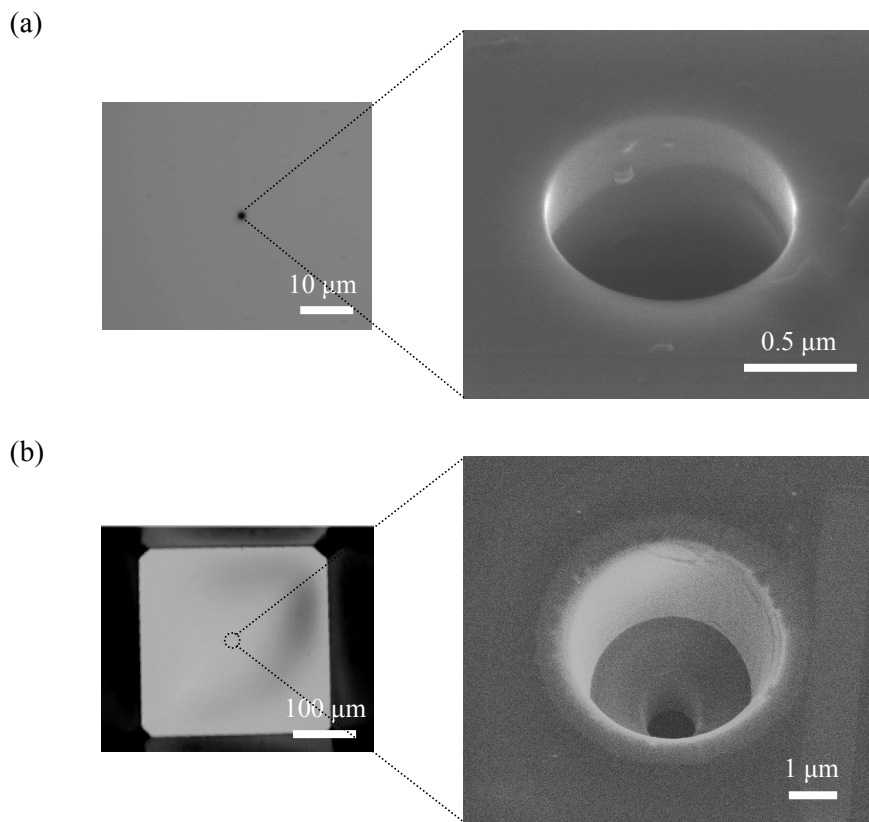


図 2.6 SOI 基板に形成された微細貫通孔の光学顕微鏡像(左)と SEM 像(右)  
(a) 基板上面, (b) 基板下面。FIB 加工によって直径約 1 μm の貫通孔が精密  
且つ滑らかに形成されていることが確認できる。TMAH 異方性エッチング  
によって SiO<sub>2</sub> 層で正確にエッチングが停止されている。また貫通孔部(SOI  
+ SiO<sub>2</sub> 層 = 約 8 μm)は厚いため十分な機械的強度が保持されている。

## 2.5 熱酸化処理による基板修飾及び電気的特性評価

極めて短い時間内においてイオンチャネルの高周波開閉現象を記録するパッチクランプ記録では、バックグラウンドノイズが大きな問題となる[30]。その原因としては熱ノイズやショットノイズが挙げられるが、最も大きく起因するのが浮遊容量性ノイズである[14]。電流測定を行う際に基板は電解液と接触するために電極基板の寄生容量由来のノイズが発生する。よって、ノイズを抑えるために低容量の基板が要求される[31]。そこで、熱酸化処理を用いて酸化膜を形成させ、寄生容量の抑制を行った。実験方法は2.4.2節と同様の方法で行った。

素子の電気的特性を評価するために等価回路モデル(図 2.7)を立て、基板抵抗及び容量について検証した。基板抵抗(access resistance)  $R_s$  ( $\Omega$ )は、センサーチップの微細貫通孔の伝導性により定義され、(2.1)式より電解液の電気抵抗率  $\rho$  ( $\Omega$  m)、微細孔の断面積  $A$  ( $m^2$ )、微細孔の長さ  $l$  (m)から求められる[32]。

$$R_s = \frac{\rho \cdot l}{A} \dots\dots\dots (2.1)$$

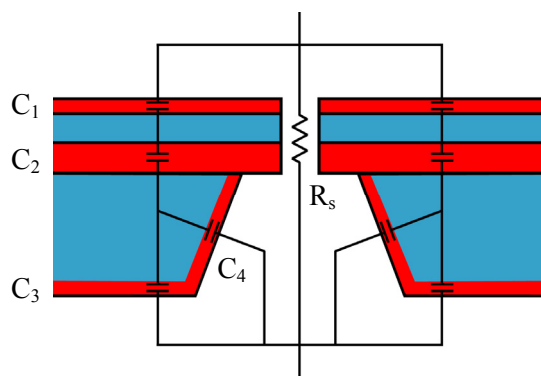


図 2.7 センサーチップの電気的等価回路モデル

図 2.8 に  $R_s$  の測定結果と(2.1)式から求めた計算値を示す。微細孔の断面積(A)に対して抵抗が反比例しており、実験値とほぼ一致した。また、その抵抗値はピペットパッチクランプで使用するピペット抵抗( $1 - 5 \times 10^6 \Omega$ )と同等もしくは低い値を示している。ホールセル記録時には、膜容量( $C_m$ )が  $R_s$  を介してチャージされる( $R_s C_m$ )ことによる slow transient の発生や単一チャンネル計測時に比べて流れる電流が大きいため  $R_s$  での電圧降下が無視できない問題が生じる。そのために  $R_s$  はできる限り小さく抑える必要がある[1]。

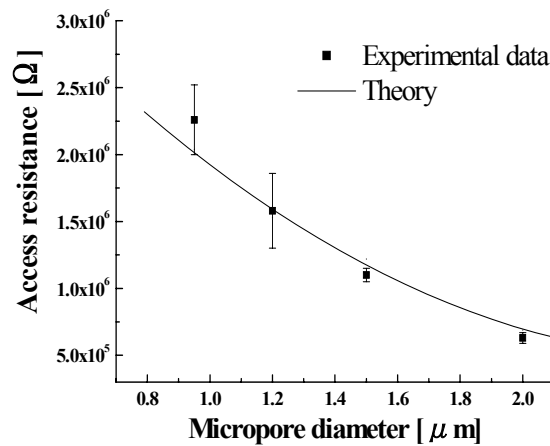


図 2.8 センサーチップ基板の抵抗  $R_s$  の実測値と計算値(式 2.1)

基板の浮遊容量  $C_s$  (F)は、(2.2, 2.3)式より真空誘電率  $\epsilon_0 = 8.854 \times 10^{-12}$ 、比誘電率  $\epsilon_r$  ( $\text{SiO}_2 = 4.5$ )、面積  $S$  ( $\text{m}^2$ )、厚み  $d$  (m)から求められる[32] (Si 層の寄生容量は寄与が小さいため考慮しない)。

$$C_i = \epsilon_0 \cdot \epsilon_r \cdot \frac{S}{d} \quad (i = 1 - 4) \quad \dots\dots\dots (2.2)$$

$$C_s = \left( \frac{1}{C_1} + \frac{1}{C_2} + \frac{1}{C_3 + C_4} \right)^{-1} \quad \dots\dots\dots (2.3)$$

熱酸化処理を行った基板を直径 3 mm の PDMS ( $S = 7.069 \times 10^{-6} \text{ m}^2$ )によりシールをしてセンサーシステムに組み込み、容量を測定した結果を図 2.9 (a)に示す。これより基板表面に非導電性の酸化膜層を形成させることで、基板固有の寄生容量が酸化膜厚に応じて減少していることがわかる。また、図 2.9 (b)は基板の電解液と接触する面積と容量の関係を示したもので、接触面積を減少させることで容量を抑制できることを示している。プレーナー型のメリットである素子のダウンサイジングを行い、マイクロ流体回路と組み合わせて微細化することでさらに低ノイズ化が可能となることが示唆される。

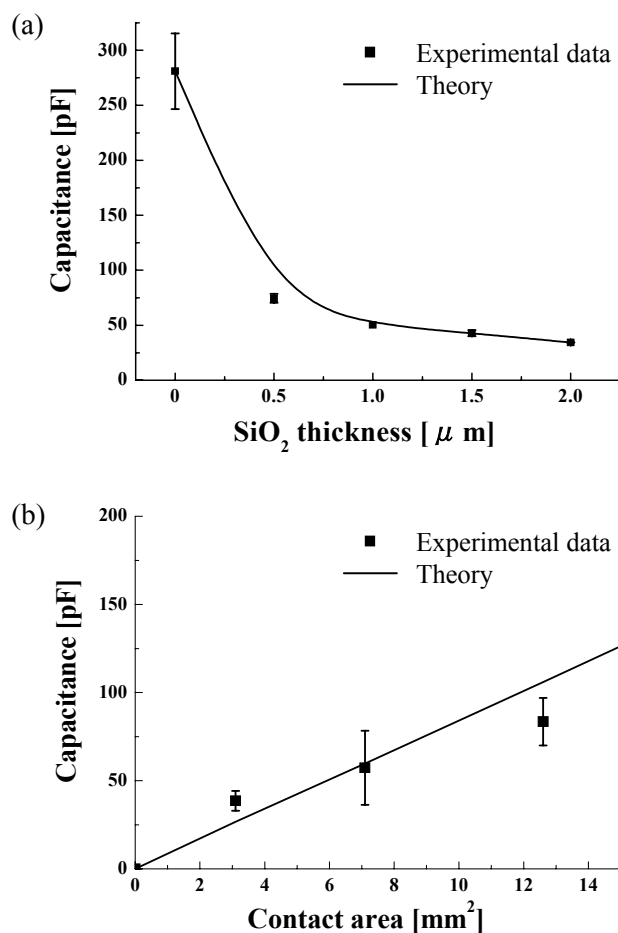


図 2.9 センサーチップ基板の電気容量  $C_s$  の実測値と計算値(式 2.2, 2.3)  
 (a) 熱酸化処理により形成した酸化膜厚に対する基板容量の関係( $S = 7.069 \times 10^{-6} \text{ m}^2$ 一定)と(b) 電解液との接触面積に対する容量の関係( $\text{SiO}_2 = 2.0 \text{ μm}$ 一定)

次に AFM (SPA400, Seiko Instruments Inc.)を用いて熱酸化処理前後の基板表面を観察した(タッピングモード, RT, 大気中)。図 2.10 に示すように熱酸化処理によって基板表面の粗さが低下し、より平坦化されていることが確認できる。これは基板上での培養時及び電流測定時の基板と細胞膜との間の密着性の向上が期待できる。

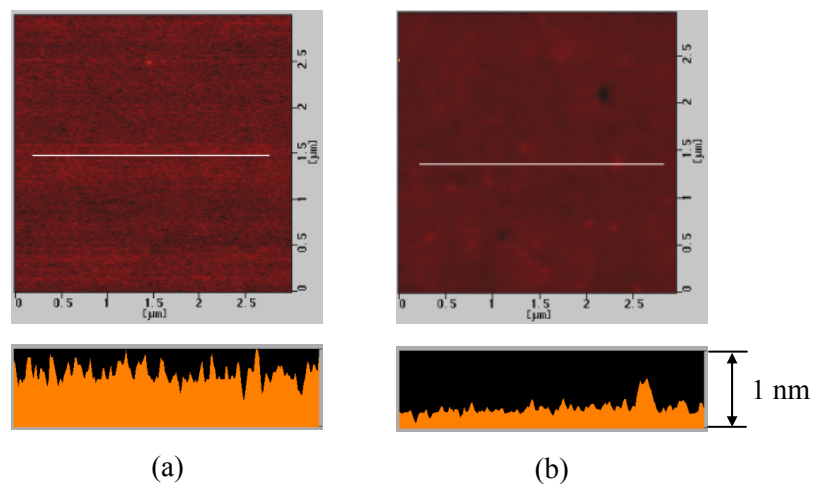


図2.10 熱酸化処理前(a)と処理後(b)のSOI基板表面のAFM像( $3 \times 3 \mu\text{m}^2$ )と断面プロファイル

熱酸化処理を施すことによって表面粗さが低下し、より平坦化されていることが確認できる。RMS : (a) 0.15 nm, (b) 0.08 nm

## 2.6 センサーチップ洗浄方法

シリコン製のセンサーチップ基板は強酸化洗浄プロセスにより種々のタンパク質や細胞膜片などの有機物を除去し、十分に洗浄することで再使用することができる。以下の操作は全てクリーンルーム内にて行い、各工程の間には超純水によるすすぎ工程を含んでいる。微細貫通孔を壊さないために超音波洗浄は行わず、各溶液中に静置

させ洗浄を行う。

1. アセトン中に浸漬(RT, 20 min ~)
2. メタノール中に浸漬(RT, 20 min ~)
3. Piranha 溶液(硫酸 : 過酸化水素水 = 4 : 1 [v/v])中で煮沸(90°C, 20 min ~)

## 2.7 結言

本章では新しく提案したプレーナーイオンチャネルバイオセンサーの概念及び作製方法、作製したセンサーチップ基板の特性評価の結果について述べた。

プレーナーパッチクランプ素子の基板材料としてシリコンを用いる際の問題点であった高ノイズ性を、絶縁体として働く  $\text{SiO}_2$  層を挟み込んだ SOI を用いて、熱酸化処理による最適構造化を行うことで解決した。電極となる基板の微細貫通孔は半導体プロセスの異方性ウェットエッチングと FIB 加工による精密な三次元加工プロセスにより作製した。微細孔の抵抗は孔下側が大きく広がった構造となっているためにピペットパッチクランプで使用されるガラスピペットと比較して小さく、パッチクランプ電極として適用できることを示した。また、熱酸化処理によって基板表面に非導電性の酸化膜層を形成させることで、基板固有の浮遊容量を膜厚に応じて減少させた。SOI をセンサー素子の基板として用いることで精密な微細加工と電気特性の向上の両者を実現することができた。また、半導体材料であるシリコンを用いることは微細加工技術を駆使して素子の微細化や電子回路の集積化による超小型素子の開発を期待することができる。



## 参考文献

1. Fertig, N., George, M., Klau, M., Meyer, C., Tilke, A., Sobotta, C., Blick, R. H. and Behrends, J. C., "Microstructured apertures in planar glass substrates for ion channel research", *Recept. Channels*, (2003), **9**, 29-40.
2. Bruggemann, A., Stoelzle, S., George, M., Behrends, J. C. and Fertig, N., "Microchip technology for automated and parallel patch-clamp recording", *Small*, (2006), **2**, 840-846.
3. Kiss, L., Bennett, P. B., Uebele, V. N., Koblan, K. S., Kane, S. A., Neagle, B. and Schroeder, K., "High throughput ion-channel pharmacology: Planar-array-based voltage clamp", *Assay Drug Dev. Technol.*, (2003), **1**, 127-135.
4. Mayer, M., Kriebel, J. K., Tosteson, M. T. and Whitesides, G. M., "Microfabricated teflon membranes for low-noise recordings of ion channels in planar lipid bilayers", *Biophys. J.*, (2003), **85**, 2684-2695.
5. Klemic, K. G., Klemic, J. F., Reed, M. A. and Sigworth, F. J., "Micromolded PDMS planar electrode allows patch clamp electrical recordings from cells", *Biosens. Bioelectron.*, (2002), **17**, 597-604.
6. Klemic, K. G., Klemic, J. F. and Sigworth, F. J., "An air-molding technique for fabricating PDMS planar patch-clamp electrodes", *Pflug. Arch.*, (2005), **449**, 564-572.
7. Pandey, S., Mehrotra, R., Wykosky, S. and White, M. H., "Characterization of a MEMS biochip for planar patch-clamp recording", *Solid-State Electron.*, (2004), **48**, 2061-2066.
8. Lasky, J. B., "Wafer bonding for silicon-on-insulator technologies", *Appl. Phys. Lett.*,

- (1986), **48**, 78-80.
9. Colinge, J. P., "The development of CMOS/SIMOX technology", *Microelectron. Eng.*, (1995), **28**, 423-430.
  10. Monyer, H. and Lambolez, B., "Molecular biology and physiology at the single-cell level", *Curr. Opin. Neurobiol.*, (1995), **5**, 382-387.
  11. Neher, E. and Sakmann, B., "Noise-analysis of drug-induced voltage clamp currents in denervated frog muscle-fibers", *J. Physiol.*, (1976), **258**, 705-729.
  12. Neher, E. and Sakmann, B., "Single-channel currents recorded from membrane of denervated frog muscle-fibers", *Nature*, (1976), **260**, 799-802.
  13. Neher, E., Sakmann, B. and Steinbach, J. H., "The Extracellular Patch Clamp; A Method for Resolving Currents through Individual Open Channels in Biological Membranes", *Pflug. Arch.*, (1978), **375**, 219-228.
  14. Hamill, O. P., Marty, A., Neher, E., Sakmann, B. and Sigworth, F. J., "Improved patch-clamp techniques for high-resolution current recording from cells and cell-free membrane patches", *Pflug. Arch.*, (1981), **391**, 85-100.
  15. Horn, R. and Marty, A., "Muscarinic activation of ionic currents measured by a new whole-cell recording method", *J. Gen. Physiol.*, (1988), **92**, 145-159.
  16. Abe, Y., Furukawa, K., Itoyama, Y. and Akaike, N., "Glycine response in acutely dissociated ventromedial hypothalamic neuron of the rat – new approach with gramicidin perforated patch-clamp technique", *J. Neurophysiol.*, (1994), **72**, 1530-1537.
  17. Xu, J., Wang, X. B., Ensign, B., Li, M., Wu, L., Guia, A. and Xu, J. Q., "Ion-channel assay technologies: quo vadis?", *Drug Discov. Today*, (2001), **6**, 1278-1287.
  18. Quist, A. P., Chand, A., Ramachandran, S., Daraio, C., Jin, S. and Lal, R., "Atomic force microscopy imaging and electrical recording of lipid bilayers supported over

- microfabricated silicon chip nanopores: Lab-on-a-chip system for lipid membranes and ion channels", *Langmuir*, (2007), **23**, 1375-1380.
19. Fertig, N., Tilke, A., Blick, R. H., Kotthaus, J. P., Behrends, J. C. and ten Bruggencate, G., "Stable integration of isolated cell membrane patches in a nanomachined aperture", *Appl. Phys. Lett.*, (2000), **77**, 1218-1220.
  20. Ide, T. and Yanagida, T., "An artificial lipid bilayer formed on an agarose-coated glass for simultaneous electrical and optical measurement of single ion channels", *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, (1999), **265**, 595-599.
  21. Macdonald, A. G. and Wraight, P. C., "Combined spectroscopic and electrical recording techniques in membrane research Prospects for single channel studies", *Prog. Biophys. Mol. Biol.*, (1995), **63**, 1-29.
  22. Ligenza, J. R. and Spitzer, W. G., "The mechanisms for silicon oxidation in steam and oxygen", *J. Phys. Chem. Solids*, (1960), **14**, 131-136.
  23. Law, J. T., "The high temperature oxidation of silicon", *J. Phys. Chem.*, (1957), **61**, 1200-1205.
  24. Deal, B. E. and Grove, A. S., "General Relationship for the Thermal Oxidation of Silicon", *J. Appl. Phys.*, (1965), **36**, 3770-3778.
  25. Tabata, O., Asahi, R., Funabashi, H., Shimaoka, K. and Sugiyama, S., "Anisotropic etching of silicon in TMAH solutions", *Sens. Actuators A Phys.*, (1992), **34**, 51-57.
  26. Sakaino, K. and Adachi, S., "Study of Si(100) surfaces etched in TMAH solution", *Sens. Actuators A Phys.*, (2001), **88**, 71-78.
  27. Chen, P. H., Peng, H. Y., Hsieh, C. M. and Chyu, M. K., "The characteristic behavior of TMAH water solution for anisotropic etching on both silicon substrate and SiO<sub>2</sub> layer", *Sens. Actuators A Phys.*, (2001), **93**, 132-137.

28. Vasile, M. J., Niu, Z., Nassar, R., Zhang, W. and Liu, S., "Focused ion beam milling: Depth control for three-dimensional microfabrication", *J. Vac. Sci. Technol. B*, (1997), **15**, 2350-2354.
29. Michael, J. V., Raja, N. and Jushan, X., "Focused ion beam technology applied to microstructure fabrication", *Journal of Vacuum Science & Technology B*, (1998), **16**, 2499-2505.
30. Sakmann, B. and Neher, E. "*Single-channel recording, 2nd edition*"; Plenum Press, (1995).
31. Wonderlin, W. F., Finkel, A. and French, R. J., "Optimizing planar lipid bilayer single-channel recordings for high resolution with rapid voltage steps", *Biophys. J.*, (1990), **58**, 289-297.
32. Matthews, B. and Judy, J. W., "Design and fabrication of a micromachined planar patch-clamp substrate with integrated microfluidics for single-cell measurements", *J. Microelectromech. Syst.*, (2006), **15**, 214-222.

## 第3章

# プレーナーイオンチャネルバイオセンサー の特性評価

原著論文: *表面科学*, (2007), **28**, 385-390

*Trans. MRS-J.*, (2008), **33**, 767-770

*Jpn. J. Appl. Phys.*, (2009), **48**, 27001 1-4

### 3.1 緒言

### 3.2 実験方法

#### 3.2.1 細胞培養及びリガンド作動型イオンチャネル—TRPV1

#### 3.2.2 電気測定システム

#### 3.2.3 プレーナーパッチクランプモード

#### 3.2.4 穿孔パッチ法

#### 3.2.5 培養モード

#### 3.2.6 電気ノイズ解析

### 3.3 実験結果及び考察

#### 3.3.1 TRPV1 チャネル電流記録—プレーナーパッチクランプモード

#### 3.3.2 システム内における細胞培養

#### 3.3.3 TRPV1 チャネル電流記録—培養モード

#### 3.3.4 電気ノイズ特性評価

### 3.4 結言

### 参考文献

## 3.1 緒言

本章では作製したイオンチャネルバイオセンサーの動作実証として、生細胞を用いた二つの測定モード、従来法のプレーナーパッチクランプモード及び本研究提案の培養モードによる全細胞膜電流記録、並びにシステムの電気特性解析結果について述べる。プレーナーパッチクランプモードは電極となる微細孔のアレイ化による多点計測が可能となることからスクリーニングへの応用が期待できる。新しく開発する培養モードは細胞間におけるシグナル伝達や相互作用の解析が可能となる測定法である。培養モードは素子内のセンサーチップ上で培養を行うために、微細孔が形成されたシリコン基板表面に細胞膜の足場となる細胞外基質(ECM; extracellular matrix)をコーティングした。ECMは細胞接着や神経突起伸張、細胞移動、細胞極性など個体発生と分化の基礎となる事象全てに対し、足場として働くタンパク質である[1-5]。また、電気測定は長時間計測やタイムラプス計測を実現するために低侵襲性のパッチ膜離断法である穿孔パッチ法を適用し電流記録を行った。素子の電气的特性評価として基板－細胞間を流れる電流波形解析からシステムの電気ノイズ特性を検証した。

## 3.2 実験方法

### 3.2.1 細胞培養及びリガンド作動型イオンチャネル－TRPV1

生体膜に貫通するイオンチャネルは、細胞内外のイオンの出入りを調節して細胞に電

気信号やカルシウム信号を発生させる輸送タンパク質としての機能を担っている[6,7]。Ca<sup>2+</sup>のような特定の物質に対して選択的且つ効果的に輸送し、外部からの刺激に応じて活性化してイオン輸送率を変化させている[8,9]。イオンチャネルの種類として開閉機構で分類すると、膜電位に依存する電位作動型、一定の物質との結合によるリガンド作動型、膜の伸張や容積変化などの刺激による機械刺激作動型、光を受容する光感受性型の4種類に大別される。活性時の大きなイオンコンダクタンス、刺激に対する速い応答性、創薬スクリーニングへの応用を考慮して、リガンド作動型である transient receptor potential vanilloid type 1 (TRPV1)を用いた。

TRPV1 は、感覚神経に特異的に発現して刺激受容に関わるイオンチャネル型受容体で[10,11]、カプサイシン(CAP; capsaicin)、プロトン(pH<6)、熱(>43°C)という複数の刺激によって活性化し、外向き整流性を有する Ca<sup>2+</sup>透過性の高い非選択性陽イオンチャネルである[12-14]。分子構造は6回膜貫通型で、アミノ基末端とカルボキシル基末端を細胞質内に向け、5番目と6番目の膜貫通領域にチャネルポアとなるループを作っている(図3.1)[15]。これまでの研究でパッチ膜を細胞から切り取った excised patch による単一チャネル電流の観察から、セカンドメッセンジャーを介さずにカプサイシンによって直接活性化することが確認されている[10]。カプサイシンとは唐辛子に含まれるアルカロイドと呼ばれる辛味成分の一つである。脂溶性の無色無臭の結晶で、アルコールには溶けやすく、冷水にはほとんど溶けず、痛覚神経を刺激し局所刺激作用あるいは辛味を感じさせる[15]。カプサイシンは体内に吸収されると脳に運ばれ内臓感覚神経に働き、副腎のアドレナリンの分泌を活発化し発汗を促す。本章では TRPV1 を発現させたヒト腎臓由来の細胞株である Human embryonic kidney 293 (HEK293)細胞を用いて、リガンド物質としてカプサイシン刺激による活性記録を行った。

細胞は培養ディッシュを用いて培養液中にて 37°C, 5% CO<sub>2</sub> で培養する。培地は Doubecco's modified Eagle's medium (DMEM, Sigma)に、10% (v/v) fetal bovine serum (FBS,

Biological industries)と 1% (v/v) glutamax (Gibco)、0.5% (v/v) penicillin / streptomycin (Gibco)、50 µg/ml geneticin (G418, Gibco)を加えたものを使用した。細胞密度が 70 - 80% まで達したらクリーベンチ内の滅菌下にて以下の方法で継代培養を行う。

1. ディッシュの培地をアスピレータで吸引・廃棄し、phosphate buffered saline (PBS; Wako pure chemical)で洗浄する。
2. Trypsin-EDTA (TE, Gibco)を加えて 37°Cで 1-2 min インキュベートし、細胞をディッシュから剥離させる。
3. 剥離後、TE と同量以上の培地を加えて酵素の活性を停止させ、遠心機により (1000 rpm, 5 min)細胞を分離する。
4. 遠心分離した上清をアスピレータで廃棄し、培地を加えてピペッティングし、新しいディッシュに播種する。

なお、TRPV1 発現 HEK293 細胞は総合研究大学院大学／自然科学研究機構 生理学研究所 富永真琴教授／柴崎貢志助教 研究室より御供与戴いた。

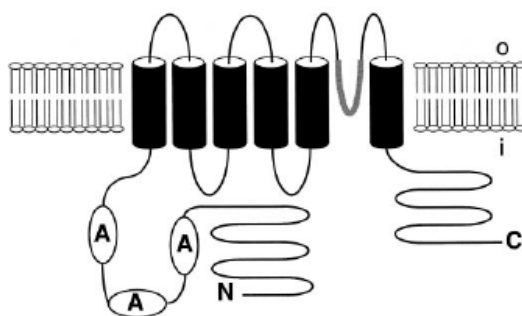


図 3.1 TRPV1 の膜のトポロジーとドメイン構造

6 回膜貫通領域を有しており、アミノ基末端とカルボキシル基末端の 25 アミノ残基から構成され、5-6 番目の膜貫通領域にチャネルポアを形成している。(文献[15]より引用)



### 3.2.2 電気測定システム

電気測定システムは従来のピペットパッチクランプ法で用いられるパッチクランプアンプ装置(Axonpatch 200B)並びに解析ソフト(pCLAMP9.2)を使用する。全ての測定データはカットオフ周波数 2 kHz のローパスフィルターを介し、出力ゲイン 5 mV/nA、サンプリング周波数 10 kHz、室温(25°C)下で測定する。実験に用いる電解液の基本組成は等張の KCl 溶液である。細胞内の生理的条件である pH 7 付近、約 10 - 100 nM の  $\text{Ca}^{2+}$  濃度に合わせるように、HEPES などの pH バッファや EGTA などの  $\text{Ca}^{2+}$ キレートにより調整、作製する。細胞外液(bath solution)は 140 NaCl、5 KCl、10 HEPES、2  $\text{MgCl}_2$ 、2  $\text{CaCl}_2$ 、10 Glucose、pH7.4 (NaOH で調整) [in mM]、細胞内液(本稿では電極溶液(electrode solution)と記述する)は 140 KCl、5 EGTA、10 HEPES、pH7.4 (KOH で調整) [in mM]と調製した。細胞外液及び電極溶液は 0.2  $\mu\text{m}$  のシリンジフィルターを介してゴミ等のシールの障害となる不純物を除去した後、本素子では上側チャンバーに細胞外液、下側チャンバーに電極溶液を充填する。電極は Ag 線及び Ag 管を市販の漂白剤(次亜塩素酸ナトリウムを主成分とする)に 5 - 6 h 浸漬して非分極性電極 Ag/AgCl とし、それぞれを上・下のチャンバーとアンプ装置に接続する。

### 3.2.3 プレーナーパッチクランプモード

開発した本素子は上下 2 層のチャンバーから構成されており、洗浄したセンサー基板をシステム内に組み込み測定を行う(図 2.1)。第 3.2.1 節の手順で培養した細胞を以下の方法でプレーナーパッチクランプ記録実験の準備を行う。ディッシュの培地をアスピレータで吸引・廃棄し、PBS で洗浄する。培地を加え、ピペッティングによりディッシュ底に

接着している細胞を剥離させる。TE 処理による剥離を行うとイオンチャネルを含む細胞膜表面のタンパク質を消化してしまうため、電流記録実験の際にはピペッティングによる剥離を行う。剥離後、遠心分離を行い細胞外液により  $1 - 5 \times 10^4$  cells/ml の細胞懸濁液を作製する。この時、懸濁液中に Accumax (Innovative Cell Technologies, 50% [v/v]) を加えることで細胞塊を減らし、懸濁液を均一にすることができる。以上のように準備した細胞を用いて、下記の手順でプレーナーパッチクランプモードによるチャネル電流計測を行う(図 3.2)。

1. 上下のチャンバーをそれぞれ細胞外液、電極溶液で満たす。
2. 上チャンバーに細胞懸濁液( $5 - 7 \times 10^2$  cell/mm<sup>2</sup>)を注入した後、陰圧(2 - 5 kPa)を印加して微細孔周辺に近づいた細胞をランダムに吸引し、シールを形成する。
3. さらに強い陰圧(20 - 30 kPa)を印加して、パッチ膜を破りホールセルモードとする。
4. CAP ( $\sim 2 \mu\text{M}$ )刺激による活性記録を行う。

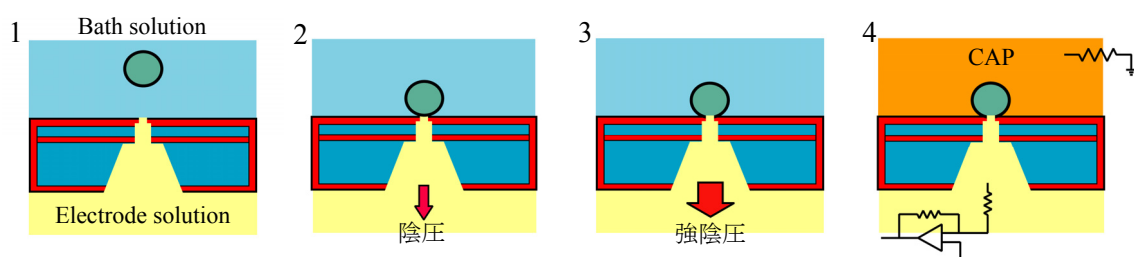


図 3.2 プレーナーパッチクランプモードの測定手順模式図

細胞の吸引及びパッチ膜離断の際の圧力は下チャンバーに接続した圧力センサーでモニターする。また、細胞－基板間のシール抵抗並びにホールセルモードの形成は Axopatch 200B の電流応答出力波形より確認する。

### 3.2.4 穿孔パッチ法

細胞内におけるイオンチャネルが担う機能や現象を観測する場合、ホールセルモードによる測定法では細胞内分子の流出が問題となる。陰圧によって機械的にパッチ膜を破り細胞膜に穴を開けた状態にすると、細胞内液は人工的に作製された電極溶液と交通し細胞内分子の流失が起こる(washout)。特に小細胞においては顕著に影響を受けてしまう。これはチャネル活動の維持や細胞内の情報伝達機構を担っている可溶性の機能性分子などの消失により、rundown が生じるからである(代表的なものに  $\text{Ca}^{2+}$ チャネルのrundown が挙げられる) [16-18]。ホールセルパッチ法は細胞内液を実験的にコントロールすることができる反面、細胞の正常な機能を損なってしまう欠点を持っている。電極溶液に失われる物質をあらかじめ補うことである程度は解消することはできるが、その物質のほとんどが未知であることが多い。正常な細胞では機能性分子のダイナミックな量的・質的変動が機能を担っているため、人工的に同環境を作り出すことは難しい。この問題を解決する有効な手段として穿孔パッチ法(perforated patch mode または slow whole-cell mode) [19,20]がある。物理的な膜離断の代わりにポリエーテル抗生物質を用いてパッチ膜に対してイオノフォアと呼ばれるイオン透過性の高い小孔を形成させることで、細胞内への電氣的アクセスを行うものである。脂質二重層内に形成された電気伝導性ポアは分子量の小さいイオンのみを通し、大きな分子は通さないために細胞内環境が損なわれ難く、細胞内の有効機能性分子を失わずに電流記録や長時間の測定を可能にする。

そこで、細胞内の機能を可能な限り保持した状態で、細胞間の相互作用やシグナル伝達の長時間観察を行うために、培養モード測定では穿孔法による膜離断を行う。また、従来法のピペットを用いた系ではピペット内径が数  $\mu\text{m}$  と非常に小さいためにイオノフ

フォアを含んだ溶液を還流させることが技術的に容易ではなかった。しかし、本研究のプレーナー型素子では溶液を充填させる下チャンバーが大きく開いた流路構造となっているために溶液の交換が容易に行うことができる。

イオノフォアとして、ポリエーテル抗生物質の一つである nystatin[21-23]を用いた。以下に nystatin 溶液の調整方法について記述する。nystatin 10 mg (Sigma)を 1 ml メタノールに溶解し、超音波攪拌(1 - 2 min)する。45  $\mu$ l 塩酸(1 M)及び 45  $\mu$ l 塩化ナトリウム(1 M)を順に加え、ボルテックスによって振動攪拌(15 - 30 s)する。 $-20^{\circ}\text{C}$ で静置後( $\geq 1$  h)、上澄み液を回収し電極溶液にて 100 - 200  $\mu\text{g/ml}$  に調整する。抗生物質の活性が時間とともに低下するために電極溶液で調整した nystatin 溶液は 2 - 3 h で新しいものと交換する。調整済み nystatin 溶液は実験直前まで氷上で保管し、不溶物や塵の混入を防ぐために 0.45  $\mu\text{m}$  フィルターで濾過後、下チャンバーに注入し、nystatin イオノフォアによる穿孔パッチ膜を形成させる。

### 3.2.5 培養モード

培養モードでは電極である測定基板の微細孔上で細胞培養を行った後に電流記録を行う。基板表面上での安定した細胞培養を実現するために ECM タンパク質による基板修飾を行う。人工材料表面上での細胞培養において、細胞は材料(接着)表面に形成された吸着タンパク質層を介することで接着しており(足場依存性)、直接材料表面と相互作用していない[24-26]。吸着タンパク質層内の細胞接着に関与しているのが ECM である。ECM とは、生体内で細胞を取り巻き、細胞を物理的に支持する役割を担っている物質の総称であり、生物学的には細胞や組織、器官、生体の物理的支持及び細胞の形態や増

殖、機能、組織や器官の構築に重要な役割を果たす一群の分子を指す[1-5]。その成分はコラーゲンファミリー(コラーゲン I やIVなどの繊維成分)や糖タンパク質(フィブロネクチン、ラミニン、エラスチンなどの接着物質)、プロテオグリカン(ヒアルロン酸、コンドロイチン硫酸、ヘパリンなど非繊維成分)などから構成され、細胞種や組織ごとに極めて多様性に富むことが知られている[27]。ECM を材料表面に吸着させることで目的の人工材料上で細胞培養を可能にすることができる[28-30]。

そこで細胞接着、増殖促進に関与する ECM の一つであるフィブロネクチン(FN; fibronectin)を基板表面に吸着させ、安定した細胞培養を実現させる。FN は血液、体液、組織基底膜に存在し、遊離されたものが血液中に比較的高濃度(0.3 mg/ml)に含まれ、形態形成の調節や正常化、細胞の接着、伸展、移動の促進に関与する細胞接着性糖タンパク質である[31-35]。細胞接着に関与するアミノ酸配列のアルギニン-グリシン-アスパラギン酸(RGD)が細胞側の接着分子のインテグリンと相互作用することで細胞-ECM 間の接着が行われている[32,36]。図 3.3 に培養モードの測定手順を示す。下記の作業は全てクリーベンチ内の滅菌下にて行う。FN のシリコン基板表面へのコーティング方法は、FN (Sigma)を脱イオン水に 1 mg/ml で溶解し、さらに使用前に PBS を加えて 100 - 200  $\mu\text{g/ml}$  に調整する。調整した FN 溶液を基板表面に滴下し(5 - 10  $\mu\text{g/cm}^2$ )、室温にて 1 h 静置した後、脱イオン水にてリンスを行い自然乾燥させ、測定に使用するまで無菌状態を保つ。細胞の準備方法はプレーナーパッチクランプモードと同様の方法で細胞を剥離、遠心分離した後、培地にて  $1 - 5 \times 10^4$  cells/ml の細胞懸濁液を作製する。

1. FN コーティングした基板をシステム内に組み込み、上下のチャンバーに培地を満たした後、上チャンバーに細胞懸濁液( $2 - 5 \times 10^2$  cells/ $\text{mm}^2$ )を注入する。
2. インキュベータ内(37°C, 5% CO<sub>2</sub>)にて 6 - 12 h 培養する。
3. 基板の微細孔を細胞膜が覆っていることを確認した後、nystatin による穿孔法を

適用する。

4. CAP ( $\sim 2 \mu\text{M}$ )刺激による活性記録を行う。

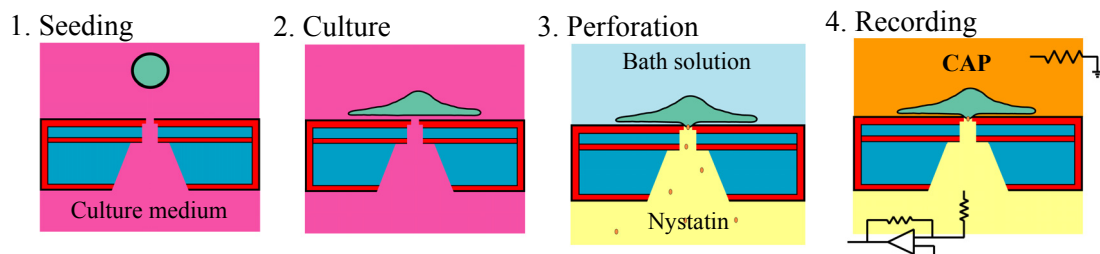


図 3.3 培養モード測定法の測定手順模式図

### 3.2.6 電気ノイズ解析

本研究で開発した素子の問題点は、ピペットパッチクランプと比較して、シール抵抗が小さいために雑音電流が増大することによる S/N 比(signal-to-noise ratio)の低下が挙げられる。素子の電気的特性を評価するためにシステムの等価回路モデルを立て、培養モードにおける細胞－基板(微細孔)間接着部を流れる電流波形から解析を行う。ノイズ解析による雑音特性及び雑音源を明らかにすることは素子の電気的特性を決定付ける重要な要素となる。第 3.2.4 節にて述べた方法で ECM 修飾した基板上で細胞を培養し、細胞接着によって微細孔が細胞膜で覆われた状況下で測定を行う。

素子及び細胞の電気的特性は抵抗成分と容量性成分の並列の等価回路として表現でき、それぞれが電氣的な雑音を発生して全体の雑音(背景雑音)となっている。雑音として考慮すべきものは、ショット雑音(shot noise) [37]、熱雑音(thermal noise または Johnson noise) [38,39]、前置増幅器の電圧雑音[40]、過剰雑音(1/f ノイズ) [41,42]である。この中

でショット雑音は測定の取得周波数に対して十分に高い周波数領域での現象であり、その影響は無視できるものと考えられる。熱雑音は電子のブラウン運動により抵抗体の端子間電位差が統計的に変動することにより発生し、抵抗値、絶対温度、周波数帯域幅によって論理的に決まる雑音であり、周波数ドメインで一様に分布する。電圧雑音は測定機器類(パッチクランプアンプなど)から発生する雑音である。過剰雑音はピンクノイズとも呼ばれ、様々な自然現象において観察されるが、その発生機序は明らかになっていない[43]。過剰雑音は材質に大きく依存し、周波数が低いほど大きくなる雑音であり[44]、本研究で行う微小なイオン電流を計測するような実験系では測定特性を非常に大きく左右する雑音源であることが考えられる。

### 3.3 実験結果及び考察

#### 3.3.1 TRPV1 チャネル電流記録—プレーナーパッチクランプモード

プレーナーパッチクランプモードによる TRPV1 発現 HEK293 細胞を用いた電流記録結果について述べる。電解液で満たされた上チャンバーに細胞懸濁液を加え、下側チャンバーに陰圧を加えることによって細胞を微細孔上にトラップさせた(図 3.2 手順 2)。微細孔上にトラップした HEK293 細胞の顕微鏡像を図 3.4 に示す。Axopatch 200B より 10 - 50 ms の短形波のパルス入力を与え、電流波形から電極抵抗( $R_s$ )及びシステムの電気容量( $C_s$ )を測定した。図 3.2 に示したそれぞれの手順に対応するオシロスコープの電流応答波形を図 3.5 (a)に示す。本実験ではホールセルモードの形成(細胞膜離断)は下側チ

チャンバーに接続したシリンジにより強い陰圧を加えることで行った(図 3.2 手順 3)。また、Axopatch 200B よりパッチ膜に大電流(20 nA 以下)あるいは高電圧をかけて電氣的膜離断(zap)を行うことでホールセルモードを得ることもできる。

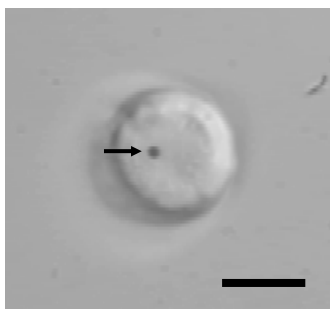


図 3.4 基板微細孔上にトラップされた HEK293 細胞  
微細貫通孔上にトラップされた細胞及び矢印は電極部となるシリコン基板に形成された貫通孔を示す。(Scale bar : 10  $\mu$  m)

電流記録は保持電位 -30 - -50 mV の電位固定(voltage-clamp)下で行った。細胞外液で調整した CAP 溶液を上チャンバーに注入し刺激を加え(図 3.2 手順 4)、刺激間には細胞外液を灌流させ、CAP の排液ならびに洗浄を繰り返し行った。図 3.5 (b)に電流記録結果を示す。CAP 刺激に応じたイオンチャネルの開閉によるイオン電流を観察することができ、開発したプレーナー素子がイオンチャネルセンサーとして機能することを示した。第2章 2.5 節にて行った熱酸化膜を堆積させた SOI 基板を用いることでバックグラウンドノイズが抑えられ、十分に高い S/N 比で電流記録が実現できている。また、CAP の繰り返し投与による TRPV1 の脱感作を確認することができる。これは CAP 刺激によって TRPV1 が活性化されチャネルが開き、細胞内に  $\text{Ca}^{2+}$  が流れ込むと、流入した  $\text{Ca}^{2+}$  がカルモジュリン(Calmodulin; CaM)を活性化することで構造変化を起こし、TRPV1 に対して水素結合による特異的な結合が起こる。CaM が TRPV1 に結合することでチャネルの不活性化がもたらされ、脱感作が生じている[45-48]。



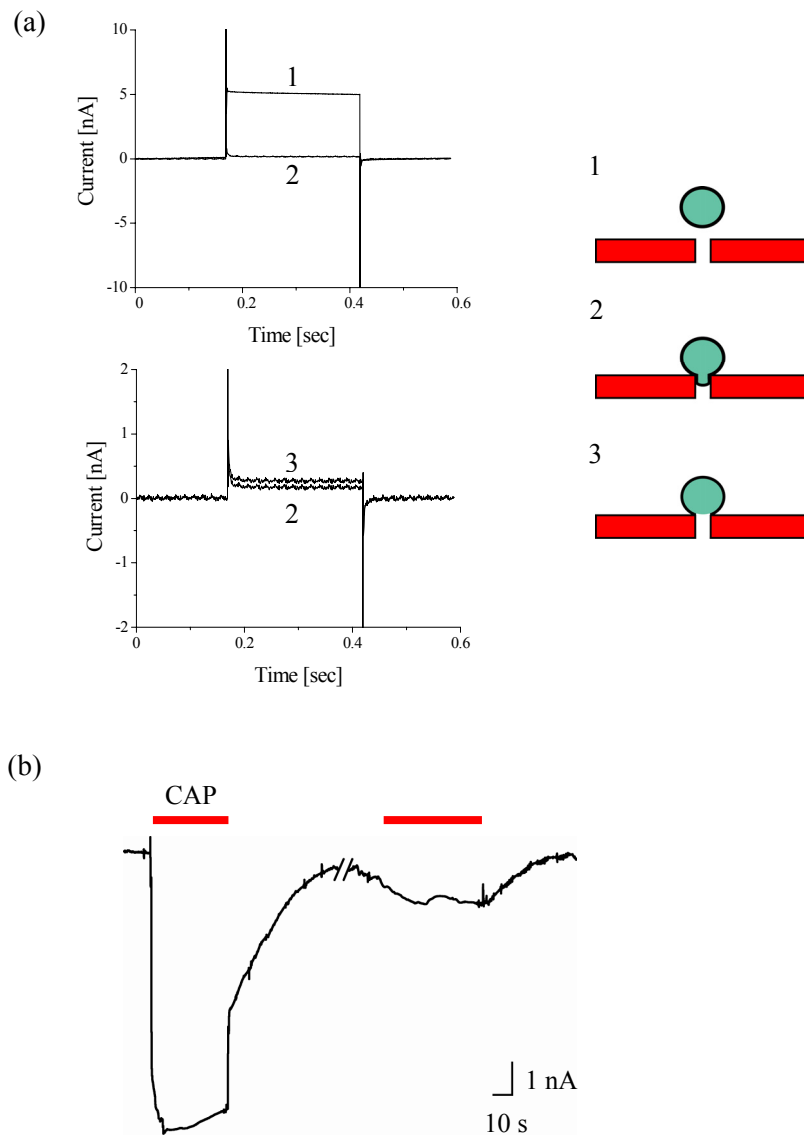


図 3.5 TRPV1 発現 HEK293 のプレーナーパッチクランプモードによる whole-cell 電流記録

(a) 図 3.2 の計測手順に対応した電流応答波形を示す。1. 微細貫通孔を流れるリーク電流波形(手順 1)、2. 細胞-貫通孔部におけるシール形成時の波形(手順 2)、3. 微細孔上の細胞膜を破り、電極溶液と細胞内液が導通した際の波形(手順 3)。(b) プレーナーパッチクランプモードでの CAP 刺激による TRPV1 の活性記録 (holding potential: -30 mV, CAP: 7.1  $\mu$ M)。

### 3.3.2 システム内における細胞培養

培養モードによる測定を実現するために ECM 修飾したシリコン基板上での細胞培養の評価を行った。FN コート( $20 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ , RT, 1h)したシリコン基板表面を AFM (タッピングモード, RT, 大気中)で観察すると、基板表面には高さ 1.7 - 2.9 nm の分子が表面全域にほぼ均一に吸着していた(図 3.6)。これは報告されている FN 分子のサイズ[49]と一致し、piranha 洗浄によって親水化されたシリコン基板表面上に細胞接着面となる FN の吸着層が形成できていることを確認した。また、コーティング前の基板表面  $\text{SiO}_2$  とコーティング後の表面粗さは 0.09 nm 及び 1.91 nm であった。

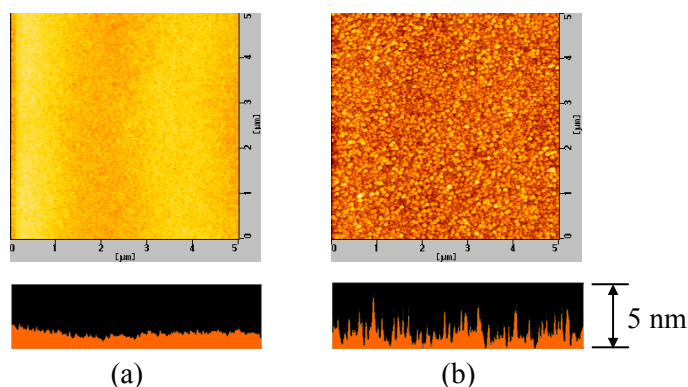


図3.6 シリコン基板表面へのFNコーティング評価  
 FN ( $20 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ )コート前後のシリコン基板表面のAFM像( $5 \mu\text{m} \times 5 \mu\text{m}$ )。  
 (a) non-coated Si、(b) FN-coated Si ( $20 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ )の表面。

FN コートした基板をシステムに組み込み、細胞培養を行った。FN コート処理と未処理の基板上での細胞接着の様子及び 24 h 培養後の接着している細胞数を測定した結果を図 3.7 に示す。評価対象として通常の細胞培養に用いる培養ディッシュ(polystyrene)と比較を行った。図 3.7 (a)より FN 処理を施すことで接着性及び増殖性を促進させていることを確認できる。また、図 3.7 (b)より FN コートしたシリコン基板上での 24 h 培養後の細

胞数は培養ディッシュと同程度であることがわかり、システム内での安定した細胞培養を実現していることが示された。すなわち細胞接着が困難なシリコン表面に細胞膜の足場となる ECM をコートすることで、培養ディッシュと同等の培養環境をセンサー基板上に構築することができた。

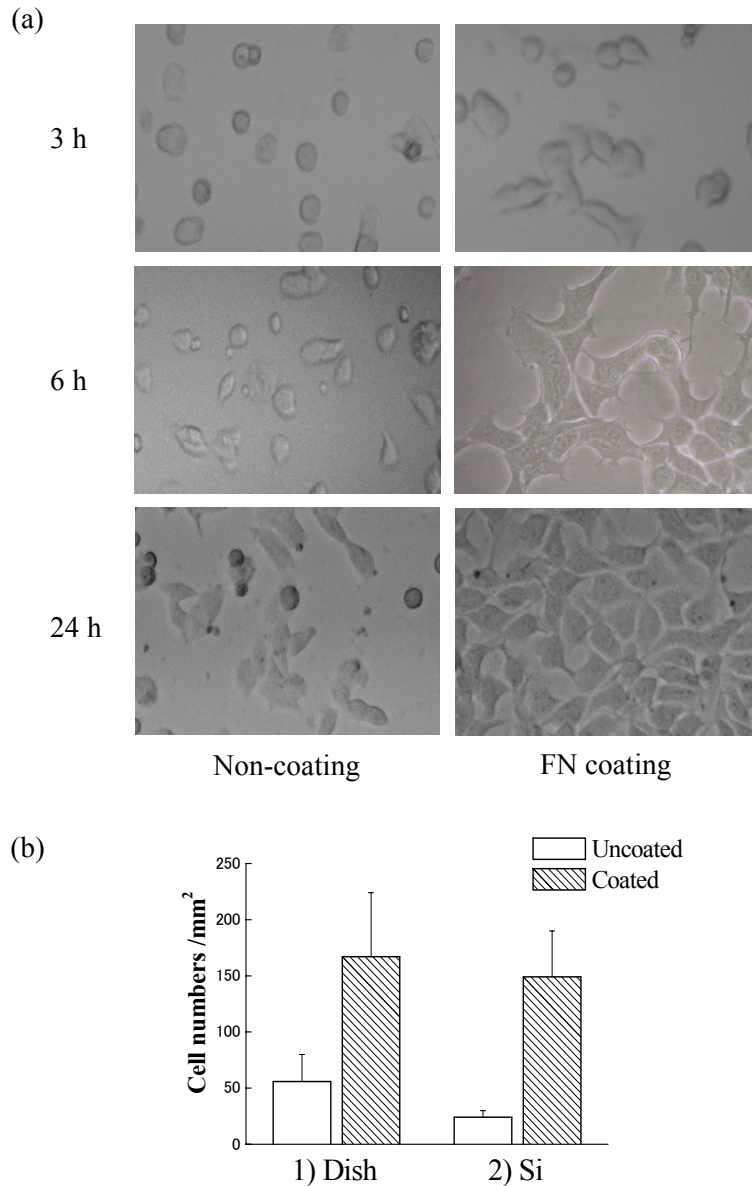


図3.7 シリコン基板上で培養したHEK293細胞

(a) 左: 未処理、右: FNコート処理したシリコン基板上での培養結果。(b) 24 h培養後の1 mm<sup>2</sup>当たりの接着細胞数(1: polystyrene製ディッシュ, 2: シリコン基板)

### 3.3.3 TRPV1 チャネル電流記録—培養モード

イオノフォアを用いた穿孔パッチ法による培養モードの電流記録結果について述べる。第3.2.3節で示した手順により、FN コートした基板をシステムに組み込み、基板上での細胞培養を行い、細胞接着及び細胞膜の伸展によって微細孔を細胞自身により覆わせた。基板微細孔上での培養経過を図3.8に示す。貫通孔直径は1 - 1.5  $\mu\text{m}$  と非常に微細であることと、図3.6で示したようにFN修飾後の基板の表面粗さは非常に滑らかであるために、細胞膜の接着及び伸展に影響を及ぼすことなく成長した。

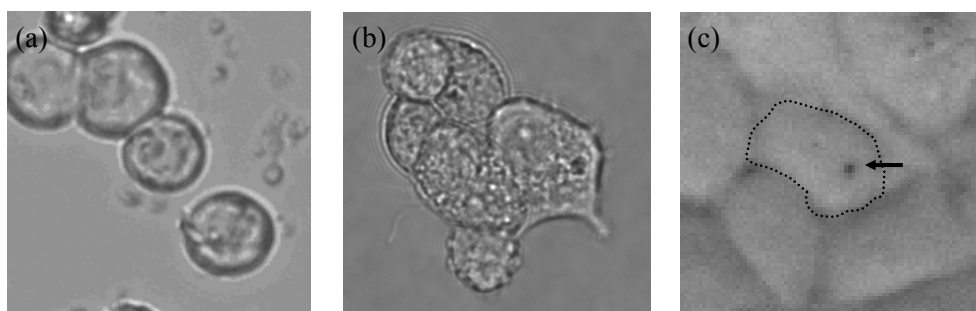


図3.8 培養モード測定における電極 - 微細貫通孔上での培養結果  
(a) 細胞播種直後、(b) 6 h 培養後、(c) 12 h 培養後の観察像。細胞接着及び細胞膜伸展によって電極部である微細孔が覆われることが確認できる。

細胞膜によって微細孔が覆われたのを確認した後、孔上に接着している細胞を剥離させないように弱い陰圧(>3 kPa)の下で nystatin 溶液を下側チャンバー(lower chamber)にシリンジにより注入し、細胞膜穿孔を行った。この時、10 - 50 ms の短形波パルスを与え電気容量変化をモニターした。図3.9 (a)は nystatin による導電性ポアの形成過程における容量の経時変化を示す。時間とともに nystatin チャネルの形成数が増加し細胞膜容量分の 3 - 6 pF の電気容量が増加した。この容量成分は細胞膜の脂質二重層が膜内外と

の間にコンデンサを形成することに起因し、細胞膜面積に比例する。細胞を直径 10 - 15  $\mu\text{m}$  の球状と仮定し、その面積から求めた細胞膜容量(比例定数:  $1 \mu\text{F}/\text{cm}^2$  [50])は 3 - 7 pF であり、実験結果と一致した。

保持電位 -30 - -50 mV の膜電位固定下において穿孔 - 培養モードによるホールセル電流記録の結果を図 3.9 (b)に示す。CAP 刺激及び細胞外液による灌流、洗浄をそれぞれ 2 回行った。図 3.5 で示したプレーナーパッチクランプモードの測定結果と同様、TRPV1 のカプサイシン応答及び脱感作の挙動を観察することができた。図 3.5 (b)の結果とは異なり、CAP 刺激中にイオン電流の減衰が見られるのは protein kinase C(PKC)によるリン酸化が関係している[51]。これは CAP 刺激により細胞内で CaM による脱感作と同時に PKC の活性化によるチャネルのリン酸化が起こり、脱感作を抑制させる作用が競争的にチャネルに働くからである。細胞内に内在する CaM 量には個体差があるため、CaM による脱感作が大きければ減衰し、PKC による活性化が強ければ減衰せずにイオン流入が続く現象が見られる。

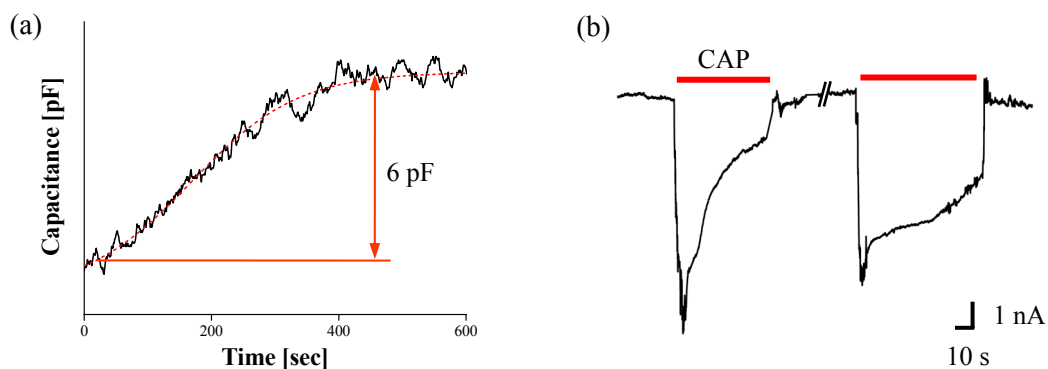


図3.9 TRPV1の穿孔 - 培養モードによるwhole-cell 電流記録

(a) Nystatin (200  $\mu\text{g}/\text{ml}$ )穿孔による電気容量の経時変化。(b) 穿孔 - 培養モードによるTRPV1の活性記録。(holding potential: -30 mV, CAP:  $1 \mu\text{M}$ )

### 3.3.4 電気ノイズ特性評価

本素子の等価回路モデル(図 3.10)を立て、細胞接着によって形成される細胞-基板間の微小間隙領域を含めたシステム全体のノイズ特性の評価を行った。ノイズ特性は測定スペクトル領域( $f = f_0 - f_1$ )における電力スペクトル密度(power spectral density)及び雑音変動 (noise variance)により表すことができる。培養モード測定時におけるノイズ源は主に(I)素子の寄生容量に起因するアンプ計測器の電圧雑音及び(II)抵抗成分に起因する熱雑音 (Johnson noise)、(III)素子固有の過剰雑音の3つの要素が挙げられる。

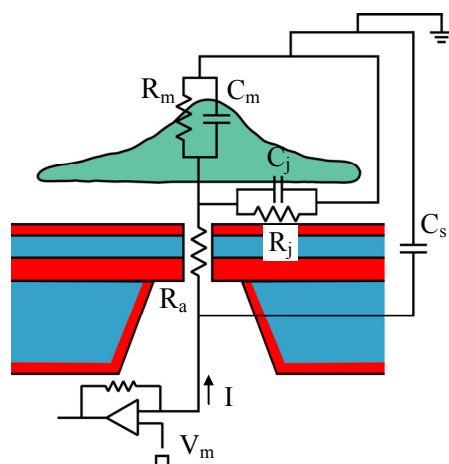


図 3.10 微細孔上に接着している細胞及びシステム全体の電氣的等価回路  
 培養モード測定時における基板微細孔上に細胞が接着している際のモデル。  
 $R_m$ : 細胞膜抵抗,  $C_m$ : 細胞膜容量,  $R_j$ : クレフト抵抗,  $C_j$ : クレフト容量,  $R_a$ :  
 基板微細孔のアクセス抵抗,  $C_s$ : 基板容量

素子と細胞膜をインピーダンスとして捉えると抵抗を流れる電流はオームの法則に従う。一方、容量を流れる容量性電流は周波数(時間)依存性があるため、 $C \frac{dV}{dt}$  となる。抵抗、容量成分を周波数応答特性を含めてシステム全体のインピーダン

ス( $Z_t$ )を表すと(3.1)式のようになる。

$$Z_t = (R_j - \omega^2 R_j^3 C_j C_s) - j(\omega R_j^2 C_s + \omega R_j^2 C_j) / (1 + \omega^2 R_j^2 C_s^2) \dots\dots\dots (3.1)$$

ここで、 $j^2 = -1$ 、角周波数  $\omega = 2\pi f$  である。また  $C_s$  は基板の容量を表し、細胞膜で覆われる前に予め測定した容量である。クレフト抵抗( $R_j$ )は細胞膜 - 基板間ギャップに発生する抵抗、クレフト容量( $C_j$ )は  $R_j$  に由来する容量を示す。 $R_m$  は細胞膜におけるイオン透過性に由来する抵抗で  $10^9 \Omega$  以上である[52]。下記の実測値及び報告されている文献の参考値を(3.1)式に導入し  $Z_t$  を概算すると、(3.2)式のようなインピーダンス式が求められた。

実験値 :  $R_j = 6 - 25 \times 10^6 \Omega$ ,  $R_a = 1 - 2 \times 10^6 \Omega$ ,  $C_s = 4 - 6 \times 10^{-11} \text{ F}$ ,  $\omega = 10^1 - 10^3 \text{ Hz}$ ,

$$C_m = 3 - 6 \times 10^{-12} \text{ F}$$

参考値 :  $C_j \leq 8.5 \times 10^{-13} \text{ F}$ ,  $R_m > 10^9 \Omega$  [52]

$$Z_t \cong (R_j - j\omega R_j^2 C_s) / (1 + \omega^2 R_j^2 C_s^2) \dots\dots\dots (3.2)$$

(3.2)式を用いて各雑音の電力スペクトル密度及び雑音変動を求めた。

### (I) 電圧雑音

パッチクランプ増幅器が発生する電圧雑音は素子の寄生容量に由来し、電圧ノイズ係数  $V_i (\text{V}^2 \text{ Hz}^{-1})$  により求められる。ノイズスペクトル密度  $S_{hv}^2 (\text{A}^2 \text{ Hz}^{-1})$  と全周波数領域において  $S_{hv}^2$  を積分した電圧雑音電流  $i_{hv}^2 (\text{A}^2)$  はそれぞれ(3.3)、(3.4)式より求められる[40]。

$$S_{hv}^2 = \overline{v_i}^2 |Z_t|^2 \dots\dots\dots (3.3)$$

$$= \overline{v_i}^2 (1 + \omega^2 R_j^2 C_s^2) / R_j^2$$

$$\overline{i_{hv}}^2 = \overline{v_i}^2 [B/R_j^2 + (4\pi^2/3)C_s^2 B^3] \dots\dots\dots (3.4)$$

(II) 熱雑音

インピーダンスに起因する熱雑音  $S_{th}^2$  ( $A^2 Hz^{-1}$ )、 $\overline{i_{th}}^2$  ( $A^2$ )は以下より求められる[40]。

$$S_{th}^2 = 4kTR_e Z_t / |Z_t|^2 \cong 4kT/R_j \dots\dots\dots (3.5)$$

$$\overline{i_{th}}^2 \cong 4kTB/R_j \dots\dots\dots (3.6)$$

ここで、k, T はそれぞれ Boltzmann 定数及び絶対温度、 $R_e Z_t$  はインピーダンス  $Z_t$  の実数成分である。

(III) 過剰雑音

材質に大きく依存する過剰雑音  $\overline{v_{ex}}^2$  ( $V^2 Hz^{-1}$ )は、低周波数ほど大きくなる雑音であり、以下より求められる[41,42,44]。

$$\overline{v_{ex}}^2 = KI^2 / f \dots\dots\dots (3.7)$$

また、過剰雑音のスペクトル密度  $S_{ex}^2$  ( $A^2 Hz^{-1}$ )及び平均雑音電流  $\overline{i_{ex}}^2$  ( $A^2$ )は



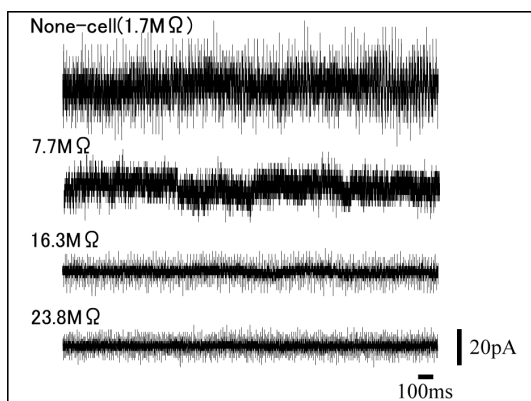
$$S_{ex}^2 = KI^2 / [f \cdot |Z_i|^2] \cong KI^2 (1 + \omega^2 R_j^2 C_s^2) / [f \cdot R_j^2] \quad \dots\dots\dots (3.8)$$

$$i_{ex}^{-2} \cong \left( \frac{KI^2}{R_j^2} \right) \left( \ln(f_u / f_l) + 2\pi^2 C_s^2 R_j^2 f_u^2 \right) \quad \dots\dots\dots (3.9)$$

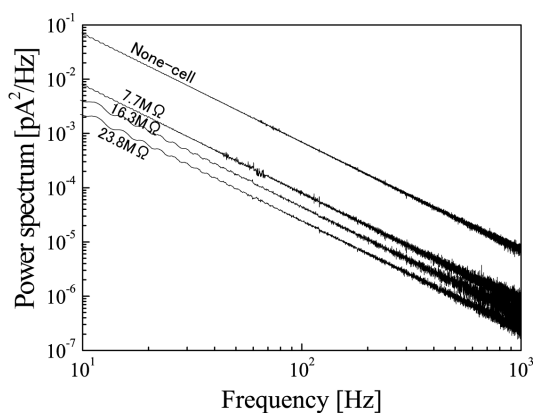
となった。ここで、Iは過剰雑音発生部(細胞膜 - 基板間)を流れる電流(図3.10)、 $f_l$ と $f_u$ はそれぞれアンプのローパス/ハイパスフィルタのカットオフ周波数を示す。Kはキャリアの種類、抵抗材料や形状、構造によって決まる素子固有の定数である[41,42,44]。

(3.4)、(3.6)式に対して $R_j = 6 \times 10^6$  ( $\Omega$ )、 $C_s = 4.3 \times 10^{-11}$  (F)、 $B = 2 \times 10^3$  (Hz)、 $v_i = 2.3 \times 10^{-9}$  (VHz<sup>0.5</sup>) (パッチクランプアンプAxopatch 200Bの冷却タイプフィードバックコンデンサの係数[40])、 $k = 1.38 \times 10^{-23}$  (JK<sup>-1</sup>)、 $T = 298$  (K)を挿入し、 $\sqrt{i_{hv}^{-2}}$ と $\sqrt{i_{th}^{-2}}$ を求めた。得られた雑音電流値はそれぞれ $\sqrt{i_{hv}^{-2}} = 1.7 \times 10^{-14}$  (A)、 $\sqrt{i_{th}^{-2}} = 2.3 \times 10^{-12}$  (A)となり、測定したノイズ電流  $1.2 \times 10^{-11}$  -  $2.8 \times 10^{-11}$  (A)より非常に小さい値を示した。図3.11 (a)に測定したノイズ電流波形のシール抵抗( $R_s + R_j$ )依存性の結果を示す。抵抗値の増加(電流値Iの減少)に伴い、ノイズ電流(ベース電流の振れ幅)が減少している。また、記録した電流波形からフーリエ変換(FFT; fast Fourier transform)によってノイズスペクトルを求めると、スペクトルは1 - 1000 (Hz)の低周波領域において1/fに比例するスペクトル強度を示した(図3.11 (b))。求めた電圧雑音(I)及び熱雑音電流(II)は非常に小さく、全バックグラウンドノイズに寄与する割合は小さい。よって、本素子における主要なノイズ源は過剰雑音(III)であることが示された。(3.9)式より過剰雑音ノイズは抵抗 $R_j$ に対して反比例し、 $C_s$ に対して比例する関係を示しており、これは熱酸化処理によって基板固有の容量を抑制させることでバックグラウンドノイズを下げ、S/N比を向上させた実験データと一致している。よって、クレフト抵抗 $R_j$ (シール抵抗)を上げ、基板容量 $C_s$ を下げることで過剰雑音が抑制できることを示した。また、測定したノイズレベル( $\leq 3.0 \times 10^{-11}$  A)は、ホール

セル電位固定記録で観察される電流値( $\sim 1 \times 10^{-9}$  A) [53,54]と比べて2桁程度小さく、非常に良好なS/N比で電流記録が可能であることを示した。



(a)



(b)

図 3.11 培養モード測定時におけるノイズ特性

(a) ノイズ電流波形のクレフト抵抗(シール抵抗)依存性と(b) そのノイズスペクトル密度。

### 3.4 結言

本章では作製したセンサー素子の特性評価として、TRPV1 発現 HEK293 細胞を用いた全細胞膜電流記録及びノイズ解析を行った。従来のプレーナーパッチクランプモード及び新たに提案した培養モードの両モードにおいてリガンド分子刺激によるリガンド作動型イオンチャネルの活性記録を高い S/N 比で実現することができた。培養モードではシリコン基板表面の細胞外基質修飾を行うことで素子内での細胞培養からイオンチャネル電流計測までの一連の操作を測定基板上で行い、nystatin を用いたイオノフォア穿孔法による電流記録に成功した。また、ピペットパッチクランプ法では比較的困難とされている穿孔法を、素子内に流路構造を持たせることで、還流による溶液交換が容易となり再現性良く行うことができた。開発した培養モード測定法はタイムラプス計測、細胞間のシグナリングや相互作用の観察に応用可能であることを示した。さらに素子の電气的特性評価として電気等価回路モデルを立て、培養モード測定時における細胞-基板(微細孔)間接着部を流れる電流波形を解析し、本素子の主要なノイズ源が過剰雑音であることを明らかにした。基板-細胞膜間の抵抗(シール抵抗)を上げ、熱酸化処理によって基板容量を下げることにより、バックグラウンドノイズが抑制されることを数値理論と実証実験で証明し、雑音低減の指針を示した。

## 参考文献

1. Gumbiner, B. M., "Cell adhesion: the molecular basis of tissue architecture and morphogenesis", *Cell*, (1996), **84**, 345-357.
2. Luckenbill-Edds, L., "Laminin and the mechanism of neuronal outgrowth", *Brain Res. Rev.*, (1997), **23**, 1-27.
3. Lauffenburger, D. A. and Horwitz, A. F., "Cell migration: A physically integrated molecular process", *Cell*, (1996), **84**, 359-369.
4. Drubin, D. G. and Nelson, W. J., "Origins of cell polarity", *Cell*, (1996), **84**, 335-344.
5. Adams, J. C. and Watt, F. M., "Regulation of development and differentiation by the extracellular-matrix", *Development*, (1993), **117**, 1183-1198.
6. Hodgkin, A. L. and Katz, B., "The effect of sodium ions on the electrical activity of the giant axon of the squid", *J. Physiol.*, (1949), **108**, 37-77.
7. Hodgkin, A. L. and Huxley, A. F., "Action potentials recorded from Inside a nerve fibre", *Nature*, (1939), **144**, 710-711.
8. Hille, B. "*Ion channels of excitable membranes (3rd edition)*"; Sinauer, (2001).
9. Sakmann, B. and Neher, E. "*Single-channel recording, 2nd edition*"; Plenum Press, (1995).
10. Caterina, M. J., Schumacher, M. A., Tominaga, M., Rosen, T. A., Levine, J. D. and Julius, D., "The capsaicin receptor: a heat-activated ion channel in the pain pathway", *Nature*, (1997), **389**, 816-824.
11. Szallasi, A., Nilsson, S., Farkas-Szallasi, T., Blumberg, P. M., H • felt, T. and Lundberg,

- J. M., "Vanilloid (capsaicin) receptors in the rat: distribution in the brain, regional differences in the spinal cord, axonal transport to the periphery, and depletion by systemic vanilloid treatment", *Brain Res.*, (1995), **703**, 175-183.
12. Tominaga, M., Caterina, M. J., Malmberg, A. B., Rosen, T. A., Gilbert, H., Skinner, K., Raumann, B. E., Basbaum, A. I. and Julius, D., "The cloned capsaicin receptor integrates multiple pain-producing stimuli", *Neuron*, (1998), **21**, 531-543.
  13. Zygmunt, P. M., Petersson, J., Andersson, D. A., Chuang, H. H., Sorgard, M., Di Marzo, V., Julius, D. and Hogestatt, E. D., "Vanilloid receptors on sensory nerves mediate the vasodilator action of anandamide", *Nature*, (1999), **400**, 452-457.
  14. Hwang, S. W., Cho, H., Kwak, J., Lee, S. Y., Kang, C. J., Jung, J., Cho, S., Min, K. H., Suh, Y. G., Kim, D. and Oh, U., "Direct activation of capsaicin receptors by products of lipoxygenases: Endogenous capsaicin-like substances", *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, (2000), **97**, 6155-6160.
  15. Szallasi, A. and Blumberg, P. M., "Vanilloid (capsaicin) receptors and mechanisms", *Pharmacol. Rev.*, (1999), **51**, 159-211.
  16. Belles, B., Malecot, C. O., Hescheler, J. and Trautwein, W., "'Run-down' of the Ca current during long whole-cell recordings in guinea pig heart cells: role of phosphorylation and intracellular calcium", *Pflug. Arch.*, (1988), **411**, 353-360.
  17. Kameyama, M., Hescheler, J., Hofmann, F. and Trautwein, W., "Modulation of Ca current during the phosphorylation cycle in the guinea pig heart", *Pflug. Arch.*, (1986), **407**, 123-128.
  18. Shuba, Y. M., Hesslinger, B., Trautwein, W., McDonald, T. F. and Pelzer, D., "Whole-cell calcium current in guinea-pig ventricular myocytes dialyzed with guanine-nucleotides", *J. Physiol.*, (1990), **424**, 205-228.

19. Levitan, E. S. and Kramer, R. H., "Neuropeptide modulation of single calcium and potassium channels detected with a new patch clamp configuration", *Nature*, (1990), **348**, 545-547.
20. Gillis, K. D., Pun, R. Y. K. and Mislser, S., "Single cell assay of exocytosis from adrenal chromaffin cells using "perforated patch recording"", *Pflug. Arch.*, (1991), **418**, 611-613.
21. Horn, R. and Marty, A., "Muscarinic activation of ionic currents measured by a new whole-cell recording method", *J. Gen. Physiol.*, (1988), **92**, 145-159.
22. Holz, R., "The water and nonelectrolyte permeability induced in thin lipid membranes by the polyene antibiotics nystatin and amphotericin B", *J. Gen. Physiol.*, (1970), **56**, 125-145.
23. Marty, A. and Finkelstein, A., "Pores formed in lipid bilayer membranes by nystatin, Differences in its one-sided and two-sided action", *J. Gen. Physiol.*, (1975), **65**, 515-526.
24. Roberts, C., Chen, C. S., Mrksich, M., Martichonok, V., Ingber, D. E. and Whitesides, G. M., "Using mixed self-assembled monolayers presenting RGD and (EG)(3)OH groups to characterize long-term attachment of bovine capillary endothelial cells to surfaces", *J. Am. Chem. Soc.*, (1998), **120**, 6548-6555.
25. Arnold, M., Cavalcanti-Adam, E. A., Glass, R., Blummel, J., Eck, W., Kantelehner, M., Kessler, H. and Spatz, J. P., "Activation of integrin function by nanopatterned adhesive interfaces", *Chemphyschem*, (2004), **5**, 383-388.
26. Michael, K. E., Vernekar, V. N., Keselowsky, B. G., Meredith, J. C., Latour, R. A. and Garcia, A. J., "Adsorption-induced conformational changes in fibronectin due to interactions with well-defined surface chemistries", *Langmuir*, (2003), **19**, 8033-8040.
27. Alberts, B., Bray, D., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K. and Watson, J. D. "*Molecular biology of the cell 5th ed.*"; Garland Publishing, Inc., (2008).

28. Ma, Z. W., Mao, Z. W. and Gao, C. Y., "Surface modification and property analysis of biomedical polymers used for tissue engineering", *Colloids Surf. B Biointerfaces*, (2007), **60**, 137-157.
29. Shin, H., Jo, S. and Mikos, A. G., "Biomimetic materials for tissue engineering", *Biomaterials*, (2003), **24**, 4353-4364.
30. Wittmer, C. R., Phelps, J. A., Saltzman, W. M. and Van Tassel, P. R., "Fibronectin terminated multilayer films: Protein adsorption and cell attachment studies", *Biomaterials*, (2007), **28**, 851-860.
31. Potts, J. R. and Campbell, I. D., "Structure and function of fibronectin modules", *Matrix Biol.*, (1996), **15**, 313-320.
32. Ruoslahti, E. and Pierschbacher, M. D., "New perspectives in cell-adhesion - RGD and integrins", *Science*, (1987), **238**, 491-497.
33. Zhang, Y., Chai, C., Jiang, X. S., Teoh, S. H. and Leong, K. W., "Fibronectin immobilized by covalent conjugation or physical adsorption shows different bioactivity on aminated-PET", *Mater. Sci. Eng. C*, (2007), **27**, 213-219.
34. Koenig, A. L., Gambillara, V. and Grainger, D. W., "Correlating fibronectin adsorption with endothelial cell adhesion and signaling on polymer substrates", *J. Biomed. Mater. Res. A*, (2003), **64A**, 20-37.
35. Miller, T. and Boettiger, D., "Control of intracellular signaling by modulation of fibronectin conformation at the cell-materials interface", *Langmuir*, (2003), **19**, 1723-1729.
36. Pierschbacher, M. D. and Ruoslahti, E., "Cell attachment activity of fibronectin can be duplicated by small synthetic fragments of the molecule", *Nature*, (1984), **309**, 30-33.
37. Stevens, C. F., "Inferences about membrane properties from electrical noise

- measurements", *Biophys. J.*, (1972), **12**, 1028-1047.
38. Johnson, J. B., "Thermal agitation of electricity in conductors", *Phys. Rev.*, (1928), **32**, 97-109.
39. Nyquist, H., "Thermal agitation of electric charge in conductors", *Phys. Rev.*, (1928), **32**, 110-113.
40. Mayer, M., Kriebel, J. K., Tosteson, M. T. and Whitesides, G. M., "Microfabricated teflon membranes for low-noise recordings of ion channels in planar lipid bilayers", *Biophys. J.*, (2003), **85**, 2684-2695.
41. Hooge, F. N., "1/f noise is no surface effect", *Phys. Lett. A*, (1969), **29**, 139-140.
42. Hooge, F. N., "1/f noise in the conductance of ions in aqueous solutions", *Phys. Lett. A*, (1970), **33A**, 169-170.
43. Poussart, D. J., "Membrane current noise in lobster axon under voltage clamp", *Biophys. J.*, (1971), **11**, 211-234.
44. Douglas, L. D. and Harvey, M. F., "Excess electrical noise during current flow through porous membranes separating ionic solutions", *J. Membr. Biol.*, (1975), **21**, 291-309.
45. Numazaki, M., Tominaga, T., Takeuchi, K., Murayama, N., Toyooka, H. and Tominaga, M., "Structural determinant of TRPV1 desensitization interacts with calmodulin", *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, (2003), **100**, 8002-8006.
46. Koplak, P. A., Rosenberg, R. L. and Oxford, G. S., "The role of calcium in the desensitization of capsaicin responses in rat dorsal root ganglion neurons", *J. Neurosci.*, (1997), **17**, 3525-3537.
47. Docherty, R. J., Yeats, J. C., Bevan, S. and Boddeke, H., "Inhibition of calcineurin inhibits the desensitization of capsaicin evoked currents in cultured dorsal root ganglion neurones from adult rats", *Pflug. Arch.*, (1996), **431**, 828-837.



48. Bhawe, G., Zhu, W. G., Wang, H. B., Brasier, D. J., Oxford, G. S. and Gereau, R. W., "cAMP-dependent protein kinase regulates desensitization of the capsaicin receptor (VR1) by direct phosphorylation", *Neuron*, (2002), **35**, 721-731.
49. Engel, J., Odermatt, E., Engel, A., Madri, J. A., Furthmayr, H., Rohde, H. and Timpl, R., "Shapes, domain organizations and flexibility of laminin and fibronectin, two multifunctional proteins of the extracellular matrix", *J. Mol. Biol.*, (1981), **150**, 97-120.
50. Hamill, O. P., Marty, A., Neher, E., Sakmann, B. and Sigworth, F. J., "Improved patch-clamp techniques for high-resolution current recording from cells and cell-free membrane patches", *Pflug. Arch.*, (1981), **391**, 85-100.
51. Mandadi, S., Numazaki, M., Tominaga, M., Bhat, M. B., Armati, P. J. and Roufogalis, B. D., "Activation of protein kinase C reverses capsaicin-induced calcium-dependent desensitization of TRPV1 ion channels", *Cell Calcium*, (2004), **35**, 471-478.
52. Lindau, M. and Neher, E., "Patch-clamp techniques for time-resolved capacitance measurements in single cells", *Pflug. Arch.*, (1988), **411**, 137-146.
53. Ren, M., Yoshimura, Y., Takada, N., Horibe, S. and Komatsu, Y., "Specialized inhibitory synaptic actions between nearby neocortical pyramidal neurons", *Science*, (2007), **316**, 758-761.
54. Zhang, F., Wang, L. P., Brauner, M., Liewald, J. F., Kay, K., Watzke, N., Wood, P. G., Bamberg, E., Nagel, G., Gottschalk, A. and Deisseroth, K., "Multimodal fast optical interrogation of neural circuitry", *Nature*, (2007), **446**, 633-639.

## 第4章

# 神経細胞ネットワーク機能解析への展開 —要素技術の開発—

### 4.1 緒言

### 4.2 実験方法

#### 4.2.1 神経細胞ネットワークアレイパターン設計

#### 4.2.2 $\mu$ CP法を用いた細胞マイクロパターンニング

#### 4.2.3 光感受性イオンチャネルの遺伝子導入

### 4.3 実験結果及び考察

#### 4.3.1 ネットワークスタンプの作製とECMパターンニング

#### 4.3.2 神経細胞ネットワークの構築と評価

#### 4.3.3 光感受性PC12細胞を用いた光刺激法

### 4.4 結言

### 参考文献

## 4.1 緒言

生体機構を理解する上で、細胞内のみならず細胞間の相互作用やシグナルの授受メカニズムを明らかにすることは必須であると考えられる。神経ネットワークに代表されるように無数の細胞から構成される細胞集団において、単一細胞あるいは複数細胞間の活動や応答を解析する手法及びシステムの開発が急務である。生体内において、神経細胞は感覚器や効果器(手や足などの筋肉)との間に複雑なネットワークを形成することで、

情報伝達の処理機能を発揮しているため[1,2]、シグナル解析が複雑困難である。一方、現在主に細胞の刺激に用いられているのは電気刺激法であるが、時間・空間またはその両方において高い分解能が得られないという問題がある。細胞間のシグナル解析を精密に行うためには細胞体や軸索、シナプスといった部分を局所的、選択的に直接刺激することが必要となる。そこで、本章では神経細胞のネットワークをアレイ状に形成させる細胞マイクロパターンニング法及び光を利用した刺激法を開発し、神経細胞ネットワークの機能解析応用を検討した結果について述べる。

## 4.2 実験方法

### 4.2.1 神経ネットワークアレイパターンニングの設計

生体試料を基板表面の任意の部位に吸着・固定化させ、細胞接着や配列固定を行う手法はバイオセンサーやバイオキャタリシス分野で盛んに研究されており、学問的、技術的蓄積を有している[3-11]。生体分子パターンニングの一つにフォトリソグラフィを利用した $\mu$ CP法が挙げられる[12-15]。小分子や生体高分子をインクとしてモノレイヤーを形成し、固体から固体への転写を行う手法である。アルカンチオール[16]、シラン[17]、タンパク質[18,19]、DNA [20]、 dendrimer [21]などの局所パターンニングに応用され、転写効率の高さ、容易さ、安価さ、巨大分子の転写が可能なが特徴として挙げられる。この手法を用いてマイクロメートルオーダーのタンパク質パターンを形成し、細胞のマイクロパターンニングによる神経細胞ネットワークアレイを検討する。

哺乳類中枢神経の神経細胞は様々な形と大きさを持っているが、その多くは主に3つの部位に分けられ、細胞核のある細胞体、他の細胞に出力する軸索、他の細胞からの入力を受ける樹状突起に分けられる[22]。神経細胞間の情報伝達は細胞同士の結合部位であるシナプスを介して行われ、信号の送り手であるシナプス前細胞の軸索終末と信号の受け手であるシナプス後細胞の樹状突起との間で電氣的・化学的に情報伝達が行われている[23,24]。そこで、細胞体と突起部を空間的に分離し、整列固定したアレイ状の神経ネットワークを形成させるための幾何学的パターンを設計した。パターン形状と大きさが細胞のパターニング特性を決定付ける重要な要素となるため[25,26]、パターンは細胞体を接着させる円形ノード(直径  $D = 10 - 20 \mu\text{m}$ )と、軸索を誘導・伸張させるライン部(幅  $W = 4 - 8 \mu\text{m}$ )からなるグリッド形状(ピッチ  $P = 100 \mu\text{m}$ )とし(図 4.1)、パターン形状による細胞パターニングの特性を検証する。

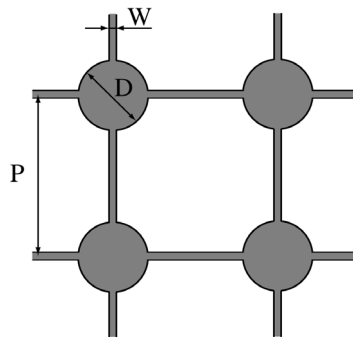


図 4.1 神経細胞ネットワークアレイパターンの設計図  
細胞体を配置するノード(直径  $D : 10 - 20 [\mu\text{m}]$ )、軸索を誘導するライン(幅  $W : 4 - 8 [\mu\text{m}]$ )がピッチ間隔  $100 [\mu\text{m}]$  で連続したグリッドアレイパターン。

## 4.2.2 $\mu$ CP法を用いた細胞マイクロパターンニング

$\mu$ CP法はソフトリソグラフィとも呼ばれる技術で、ハンコの要領で目的の生体高分子や小分子を基板表面に転写させる手法である。図4.2に作製手順の模式図を示す。紫外線(UV)や電子線(EB)を用いたフォトリソグラフィによってマイクロメートルオーダーのパターンを有する鋳型(マスター)を作製する(A)。この鋳型にPDMSを流し込み、マスターのパターンを転写したリコーン製のスタンプを作製する(B)。この凹凸のパターンを持つスタンプ表面にタンパク質分子を塗布し、基板に密着させることで、パターン分子膜を基板上に形成させる(C)。

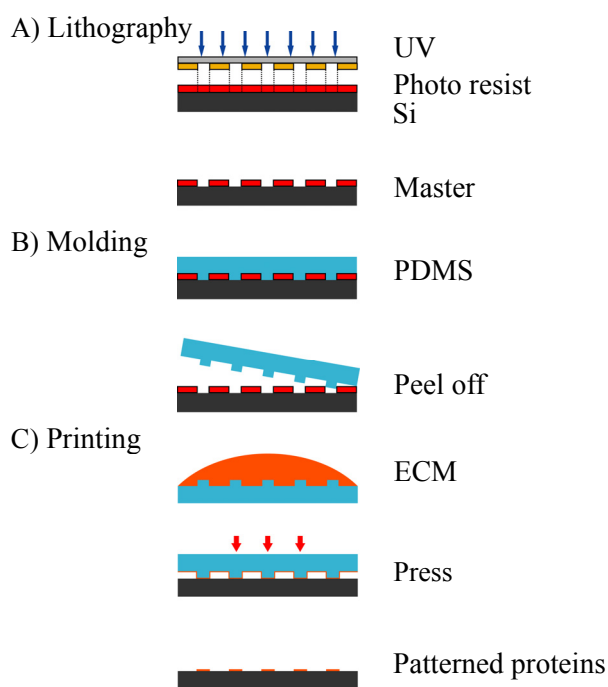


図4.2  $\mu$ CP法を用いたタンパク質マイクロパターンニング模式図  
 (A) リソグラフィによって微細構造パターンを有する鋳型を作製する。(B) 鋳型からPDMSスタンプを転写・作製する。(C) スタンプ表面にタンパク質分子を充填し基板にコンタクトすることでパターン分子膜を形成させる。

以下に各工程の実験方法について述べる。

#### A) Lithography

神経ネットワークパターンとなる鋳型はUVリソグラフィによってネガ型感光性レジスト(SU-8 3010, Kayaku Microchem Co., Ltd.)を用いて作製する。露光方法はマスクアライナー(MA-10, Mikasa Co., Ltd.)を用いて、微細パターンが形成されたガラスマスクとレジストを塗布したシリコン基板を密着させ、コンタクト露光にて行う。フォトレジストの粘度が膜厚に大きく影響するため、予め冷蔵庫から取り出し室温まで戻した後を使用する。また、シリコンウェハは第 2.6 節の強酸化洗浄プロセスによって洗浄後、酸素プラズマ処理(PDC-32G, Harrick Plasma Inc.)を行い、レジストと基板の密着性を向上させる。

1. 洗浄・プラズマ処理したシリコンウェハに SU-8 を塗布し、500 rpm - 10 s、3000 rpm - 30 s でスピコートし膜厚 6 - 8  $\mu\text{m}$  のレジスト膜を形成する。
2. 95°C、3 min のソフトベークを行い、室温まで冷却させる。
3. 露光量 70 - 80  $\text{mJ}/\text{cm}^2$  にて露光する。
4. 65°C - 1 min、95°C - 2 min のポストベークを行い、室温まで冷却させる。
5. SU-8 現像液中にて 1 - 2 min 浸漬・攪拌し、IPA(isopropyl alcohol)にてリンスする。
6. 150 - 200°C、1 - 3 min のハードベークを行い、レジスト強度を上げる。

#### B) Molding

(A)で作製したマイクロメートルオーダーのパターンを有する鋳型に対して PDMS (主剤：硬化剤 = 10 : 1) (Sylgard 184, elastomer kit; Dow Corning Co., Ltd.)を流し込む。オーブンで加熱(60°C,  $\geq 3$  h)して硬化させ、鋳型から剥離するとパターンが転写された PDMS スタンプが作製される。一度作製した鋳型は繰り返し使用できるため、同じ形状

のスタンプを大量に作製することができる。

### C) Printing

パターンニングするタンパク質として、ECM の一つで神経突起の伸張にも誘導効果があるラミニン(LN; laminin)を用いる。LN は基底膜の細胞外に局在し、細胞接着や器官形成、神経網再生、血管新生などの様々な生命現象に深く関わっている多機能な巨大分子であり、多くのドメインを持った糖タンパク質である[27]。LN 溶液の調整方法と基板上へのパターンの転写手順を以下に示す。LN (BD Bioscience)バイアルを氷上で 12 h 程度かけて緩やかに溶解後、無血清培地にて 50  $\mu\text{g/ml}$  に希釈する。作製した PDMS スタンプ表面を LN 溶液(60 - 100  $\mu\text{l/cm}^2$ )に 1 h 浸漬した後、窒素ブローで余分な溶液を飛ばし、基板に対して 5 - 30  $\text{g/cm}^2$  (PDMS スタンプ上に与える圧力)の圧力をかけて 15 - 30 min スタンプすることで LN パターンを基板表面に形成する。ECM タンパク質の充填及びスタンプの操作は全てクリーンベンチ内で行い、無菌下で行う。PDMS は疎水性であるために ECM タンパク質溶液を塗布する際に水溶性分子を弾いてしまう。PDMS が疎水的なのは表面に存在する Si-CH<sub>3</sub> 基によるものだが、酸素プラズマを照射してシラノール基 Si-OH へと置換することで親水化する[28,29]。

### D) Patterning

ECMパターンニングによる神経細胞ネットワークの形成及びパターンニングの特性を評価するために、神経系のモデル細胞であるラット副腎髄質褐色細胞腫由来の pheochromocytoma-12 (PC12) [30]を用いる。PC12は上皮成長因子(EGF; epidermal growth factor)刺激により増殖を、神経成長因子(NGF; nerve growth factor)刺激により神経細胞様へと分化する機能を持っている[31]。NGF非存在下の培養では副腎髄質クロム親和細胞の形質を示すが、NGF存在下では長い神経線維を伸ばし交感神経節細胞様に分化する。

PC12細胞をECMパターンが形成された基板上で培養し、NGFによる分化誘導によりネットワークの形成・制御を行う。分化誘導時はPBSで5 µg/mlに調整したNGF (Sigma)を最終濃度50 - 100 ng/mlで添加した無血清培地で培養する。また、ローダミン標識ファロイジン(Cytoskeleton, Inc.)とDAPI (Vector Laboratories, Inc.)を用いてアクチンフィラメントと核をそれぞれ蛍光染色し、細胞形態を観察する。蛍光観察にはrhodamin phalloidinにはexcitation : 535 +/- 20 nm、emission : 585 +/- 20 nm、DAPIにはexcitation : 355 +/- 20 nm、emission : 460 +/- 20 nmの蛍光フィルターを用いる。染色手順を以下に示す。

1. 細胞を PBS にて 2 回洗浄する。
2. 3.7%パラホルムアルデヒド溶液中に室温で 30 min 浸漬・固定する。
3. PBS にて洗浄する。
4. 0.2 %Triton X 溶液中に室温で 5 min 浸漬する。
5. PBS にて 3 回洗浄する。
6. 70 nM ローダミン標識ファロイジン(rhodamin-phalloidin)溶液中に室温・遮光下で 30 min 浸漬する。
7. PBS にて 3 回洗浄する。
8. DAPI を加えてカバーガラスでマウントする。

#### 4.2.3 光感受性イオンチャネルの遺伝子導入

細胞を刺激し活動電位を発生させる手法として、これまでは主に電氣的な方法が用いられてきた。細胞間のシグナル伝達解析を精密に行うためには局所的に細胞を刺激する



ことと、発火のタイミングを厳密にコントロールし刺激と発火を同期させることが求められる[32-34]。そのため、従来の電気刺激法は分解能や制御性の点において十分ではない。また、電気刺激法では刺激を与える細胞やその周辺細胞に対しても侵襲的であることも欠点として挙げられる。その問題点に対して、高解像度の光を利用した刺激法を開発し、光照射によって細胞間の信号の送受信を制御する手法を構築する。細胞の刺激に光を用いることができれば、光学的計測法と同様に空間的・時間的に高い分解能で、より選択的且つ効率良く、目的の細胞もしくは特定の部位のみを刺激することができる。

そこで、遺伝子工学的手法を用いて生物由来の光受容体ロドプシンファミリータンパク質を利用する。ロドプシンファミリータンパク質は、単細胞緑藻類の一種コナミドリムシ(*chlamydomonas reinhardtii*)の眼点に分布し、可視光に応答してイオンを透過させることで膜電位を制御しており、単一の分子で光感受性と膜電位変化の機能を併せ持っている。クラミドモナスには2種類の光受容チャネル(channelrhodopsin-1; ChR1[35], channelrhodopsin-2; ChR2[36])が存在している。ChR1は、カエル(ゼノパス)の卵母細胞に発現させると、光に応答して $H^+$ を透過させる性質を持っている。ChR2は7回膜貫通型の構造を有しており[37]、全長737アミノ酸残基からなるチャネルオプシン(Chop2; channelopsin-2)と、発色団にall-trans レチナールを持つ複合タンパク質(ChR2 = Chop2 + retinal)であり、400 - 500 nmの青色光に応答して、all-trans型から13-cis型に光学異性体変換することにより、 $H^+$ や $Na^+$ 、 $Ca^{2+}$ などの陽イオン透過性を増大させる特徴を持っている。培養哺乳類細胞(HEK293やBHK)に発現させることで、青色光に応答した脱分極を引き起こすことがこれまでに報告されている[36,38-40]。また、ChR2の1-315アミノ酸残基の領域に全長と同じ光受容チャネルとしての機能が保存されていることが確認されている[36]。このChR2の光感受性とイオンチャネルの機能を利用して、細胞を刺激する光刺激法を構築する。イオンチャネルとしての機能を有する1-315アミノ酸残基に蛍光標識として黄色蛍光タンパク質のVenus[41]を結合させたChop2-Venusのコンス

トラクトを組み込んだレンチウイルスベクター法を用いて PC12 細胞に発現させ、光感受性機能を付加する。ウイルスベクター法はウイルスが元来持っている細胞侵入機構を利用して細胞内に遺伝子を導入する方法である[42]。細胞表面に特異的に結合する受容体を介して細胞に感染し、染色体に目的遺伝子断片を挿入するため、長期的な遺伝子発現を期待できる。Venus の蛍光観察によって ChR2 発現の有無を確認し、蛍光像を手がかりに発現率の高い細胞を同定してクローニングを行う。作製した光感受性 PC12 細胞を用いて、ホールセル電位固定下で青色光を照射させ、光受容チャネル電流の観察より光感受性の発現の有無及び光照射による信号の送受信制御の可能性を検証する。

ChR2 の基礎知識及び光励起システムの構築に関して東北大学大学院 八尾寛教授／石塚徹講師より御教授頂いた。また、レンチウイルスベクターは総合研究大学院大学／自然科学研究機構 生理学研究所 重本隆一教授／深澤有吾助教 研究室より御供与戴いた。

## 4.3 実験結果及び考察

### 4.3.1 ネットワークスタンプの作製と ECM パターニング

UV リソグラフィにより作製したフォトレジストの鋳型と、その鋳型より転写・作製した PDMS 製ネットワークスタンプを図 4.3 (a)、(b)にそれぞれを示す。フォトレジストによって形成されたモールドの形状を正確に反映し、微細アレイパターンを持った PDMS スタンプが確認できる。作製したスタンプはノード直径(D)  $9.2 \pm 0.5 \mu\text{m}$ 、ライン

幅(W)  $3.3 \pm 0.4 \mu\text{m}$ 、ピッチ(P)  $100.7 \pm 1.2 \mu\text{m}$ 、高さ(H)  $6.7 \pm 0.8 \mu\text{m}$  (設計値:  $D = 10$ ,  $W = 4$ ,  $P = 100$ ,  $H = 6 - 8 [\mu\text{m}]$ )であり( $N = 6$ )、設計値に対して高い精度で作製できている。

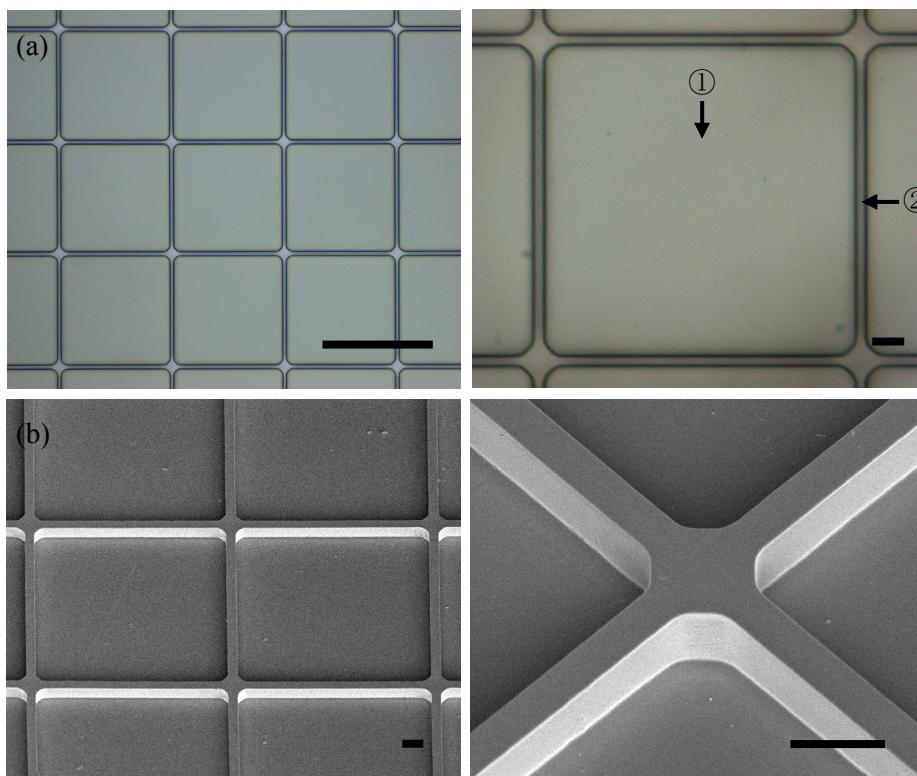


図 4.3 作製した神経細胞ネットワークスタンプ

(a) マイクロオーダーの微細パターンを有した SU-8 レジストマスターの光学顕微鏡像(矢印①はレジスト凸部、②は凹部を示す)。(b) PDMS 製ネットワークスタンプの SEM 像。Scale bar: (a) : (left)  $100 \mu\text{m}$ , (right)  $10 \mu\text{m}$ , (b) : (left, right)  $10 \mu\text{m}$

また、酸素ガスプラズマ処理による PDMS 表面の表面性状を調査するため接触角を測定した。図 4.4 に処理時間に対する水接触角の測定結果を示す。この結果より 10 - 20 s のプラズマ処理で疎水性表面が親水化されていることがわかる。しかし、親水化した PDMS 表面は時間経過によって、疎水性に戻ってしまうため[28,43]、親水化処理後は速やかに ECM の塗布を行う。

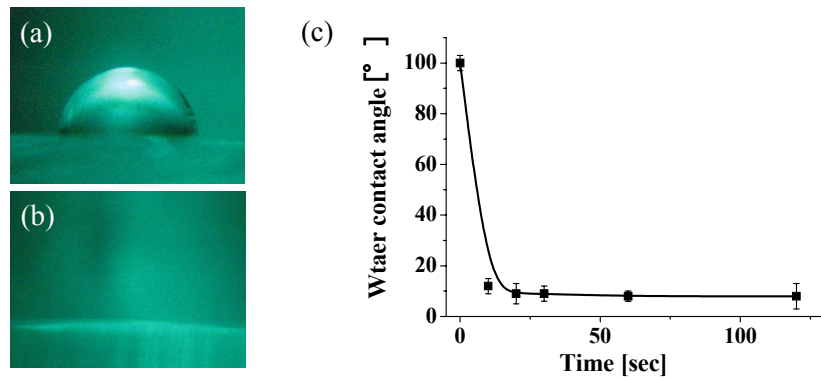


図4.4 O<sub>2</sub>ガスプラズマ処理によるPDMS表面改質  
 (a, b) プラズマ処理前後のPDMS上に滴下した水滴：(a) 処理前(WCA = 98°)、(b) 30sプラズマ処理後(WCA = 13°)。 (c) PDMS表面の水接触角のプラズマ照射時間依存性。

基板表面へのタンパク質転写を確認するため、FITC 蛍光標識した poly-L-lysine (PLL, Sigma)を基板上にパターンニングし、蛍光顕微鏡により転写精度と均一性を観察した。転写の際には PDMS スタンプ上に一様に圧力が作用するように 30 g/cm<sup>2</sup>で 30 min 圧力を加えた。図 4.5 に示す蛍光観察像よりスタンプした全範囲に渡り一様にパターンが形成されており、基板上にタンパク質分子のパターンが転写されていることを確認した。

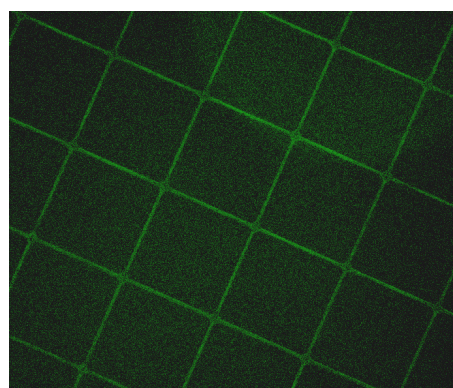


図 4.5 μCP 法によるマイクロパターンニングの蛍光像  
 FITC 標識された PLL (1 mg/ml)を 30 g/cm<sup>2</sup>、1 h スタンプした基板表面の蛍光観察像。

### 4.3.2 神経細胞ネットワークの構築と評価

モデルニューロンである PC12 細胞を ECM パターンが形成された基板上で培養し、NGF による分化誘導応答を観察した。図 4.6 に NGF (100 ng/ml) 添加無血清培地中にて 3 日間培養した PC12 を示す。ECM タンパク質の微細パターン形状に従い、グリッドパターンの交差部であるノード上に細胞体が接着し、ライン上に軸索が伸張し隣のノードの細胞と結合している(a)。パターンを形成していない基板上では四方八方へと神経突起を伸ばし、枝分かれした突起が無数の細胞と結合している(b)。また、アクチンフィラメントと核の二重蛍光染色より、ノード部分に核が配置され、ライン部分に軸索が誘導されている(c)ことが観察された。

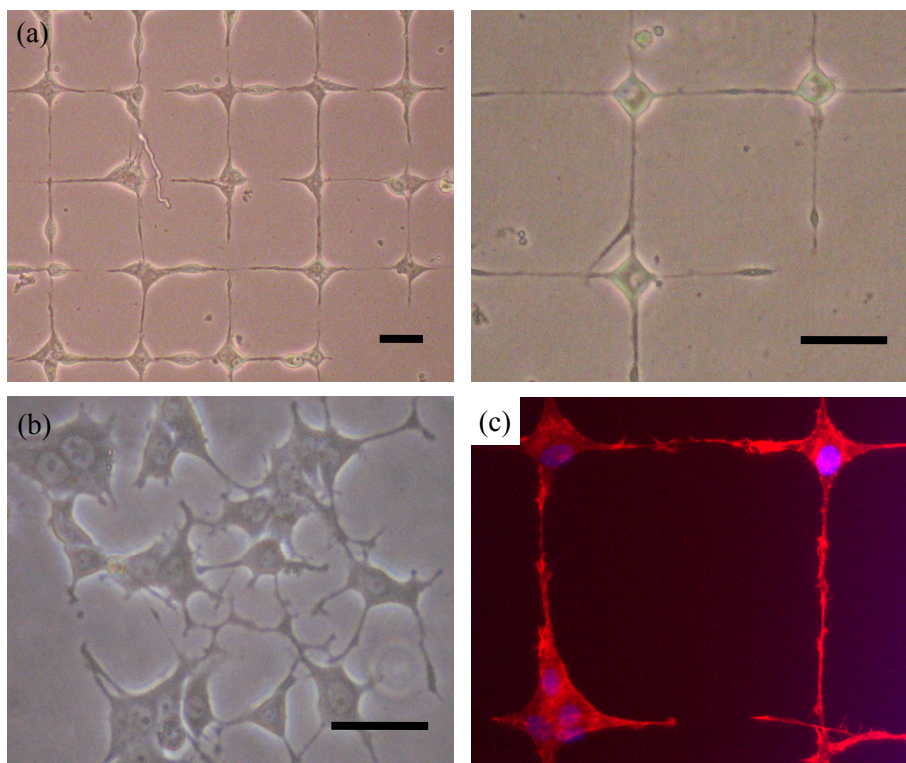


図 4.6 タンパク質パターンニングによって形成された神経細胞ネットワーク (a) LN グリッドパターン上で分化誘導を行った PC12 細胞。(b) 一様に LN コートされた部分での結果。(c) アクチンフィラメント(赤)と核(青)の二重染色の蛍光マージ像。

ECM パターン形状による細胞のパターニング特性について検討した。無作為に  $700 \times 900 \mu\text{m}$  / flame の観察画像 25 枚を抽出し、パターン上の全ての細胞に対するノード上に接着するシングルセルの割合及びライン上に接着する割合、播種する細胞密度に対する割合について特性を調べた(図 4.7)。ノード直径の増加に伴い、1 ノード上に 1 細胞が接着するシングルセルの割合が低くなる傾向が見られた(a)。これはノード直径が大きくなるにつれて接着面積が大きくなることで、1 つのノード上に複数の細胞が接着しやすくなるためである。また、ライン形状についても幅が大きくなることによってライン上に細胞体が接着する割合が増加し、パターニング特性を低下させている(b)。またパターン上に播種する細胞密度に関しては、 $250 \text{ cells}/\text{mm}^2$  以下では突起形成による細胞間の結合を形成する細胞数が減少し、 $500 \text{ cells}/\text{mm}^2$  以上になるとパターン部全体に細胞が高密度に接着した。以上より最適なグリッドパターンはノード直径  $\geq 10 \mu\text{m}$ 、ライン幅  $\geq 4 \mu\text{m}$ 、細胞密度  $250 - 500 \text{ cells}/\text{mm}^2$  を見出した。

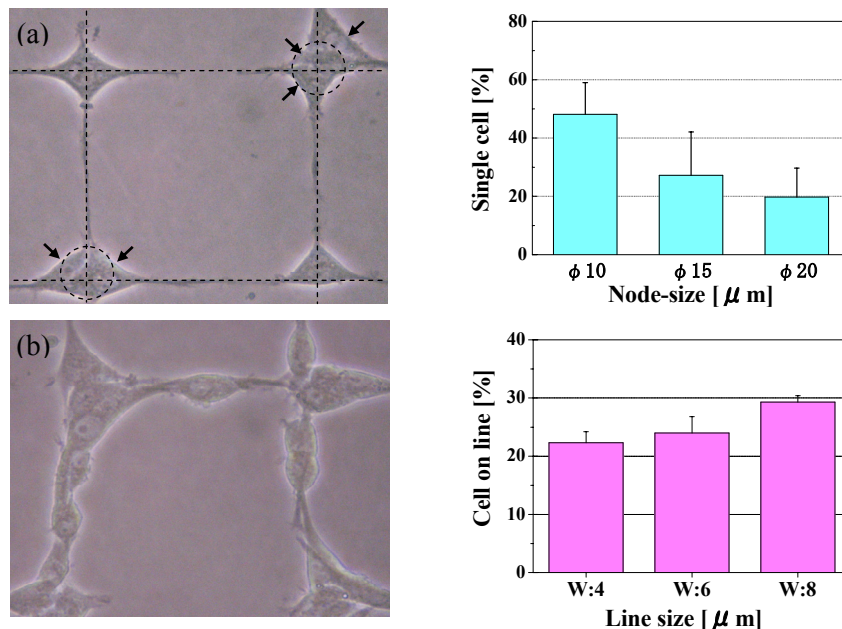


図 4.7 パターン形状に対する PC12 細胞のパターニング特性

(a) ライン幅を  $W = 4 \mu\text{m}$  一定とし、シングルセルを形成する割合のノード直径依存性(点線はタンパク質パターン位置を示す)。(b) ノード直径を  $D = 10 \mu\text{m}$  一定とし、ライン上に細胞体が接着する割合のライン幅依存性。

### 4.3.3 光感受性 PC12 細胞を用いた光刺激法

対数増殖期の PC12 細胞に対してレンチウイルスベクター法を用いて Chop2-Venus の遺伝子導入及びクローニングを行った。HIV-1 ベースのレンチウイルスベクターを用いてプラスミド DNA (pCL20c) に組み込んだ Chop2-Venus 遺伝子の PC12 細胞への導入を行い、導入効率及び発現量を Venus の蛍光顕微鏡観察により確認した。図 4.8 に同一領域の明視野像(a)及び蛍光像(b)を示す。蛍光発色している PC12 細胞を観察することができ、光感受性イオンチャンネル ChR2 が発現していることが示唆された。Venus の蛍光強度を手がかりに発現率の高い細胞を同定しクローニングを行った。

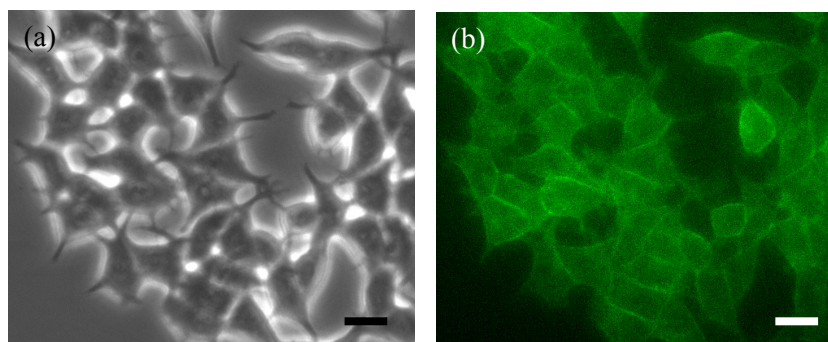


図 4.8 Venus 蛍光標識された光感受性イオンチャンネル ChR2 を発現した PC12 細胞

(a) 明視野位相差観察像及び(b) 蛍光観察像。Venus の蛍光発色により ChR2 が発現していることが予想される PC12 細胞。(scale bar : 10  $\mu$  m)

PC12 細胞への光感受性機能の付加を検証するために、ChR2 の電流記録を試みた。ChR2 の光刺激には青色発光ダイオード( $\lambda_{ex} = 470nm$ )を使用した。発光ダイオードは瞬時に光の on/off が可能であり、また光強度を再現性良くコントロールすることができる。基板の微細孔上に細胞体を接着させるため、図 4.9 (a)に示す治具を用いてタンパク質パ

ターニングの位置合わせを行った。基板の微細孔周辺は薄膜化されているために光が透過することを利用して、基板 - 微細孔とスタンプ - ノード部の位置を合わせて、LN のネットワークパターンを形成させた(図 4.9 b)。

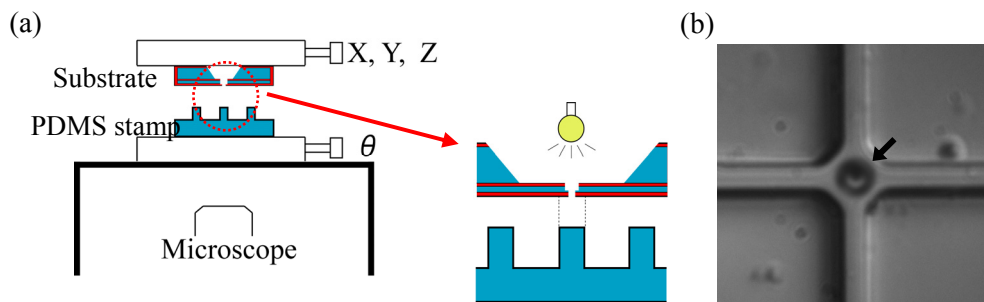


図 4.9 基板 - スタンプ位置合わせ治具

(a) 基板と PDMS スタンプの位置合わせ治具概略図。(b) 貫通孔上に張り合わせられたスタンプノード部(矢印は貫通孔を示す)。

$\mu$ CP によって基板微細孔上に形成させた ChR2-PC12 のネットワークより(図 4.10 a)ホールセル電位固定記録を行うと、光照射によって速やかに内向きの電流が発生し、光の消灯によって速やかに減衰する応答を観察することができた(図 4.10 b)。また、ChR2 の光電流にはピーク成分と定常成分の 2 成分が存在している。ピーク成分は光の強度にほぼ比例して増大し、定常成分は光強度が強くなるに従い、徐々に頭打ちになる傾向を示した(図 4.10 c)。両成分ともに光強度に依存して増加するが、それぞれ異なった光依存性を持つ ChR2 の特徴を示している[38-40]。また、光電流の活性化と脱活性化はともにミリ秒オーダーの時定数を示し、非常に早い応答であることがわかる。特に活性化の応答は興奮性シナプス後膜電流の立ち上がりの早さに匹敵することから、刺激と反応の同期性が十分取れており、ChR2 を用いた光刺激が非常に優れた細胞興奮法であることを示した。また、本結果は基板全面に対して光照射を行っているため、ネットワークを形成している複数の細胞を同時に刺激しているが、単一細胞あるいは突起部のみを照射で



きる光学系を構築すれば、光を用いた信号の送受信制御による細胞間のシグナル応答や相互作用の観察が実質的に可能であることを示した。

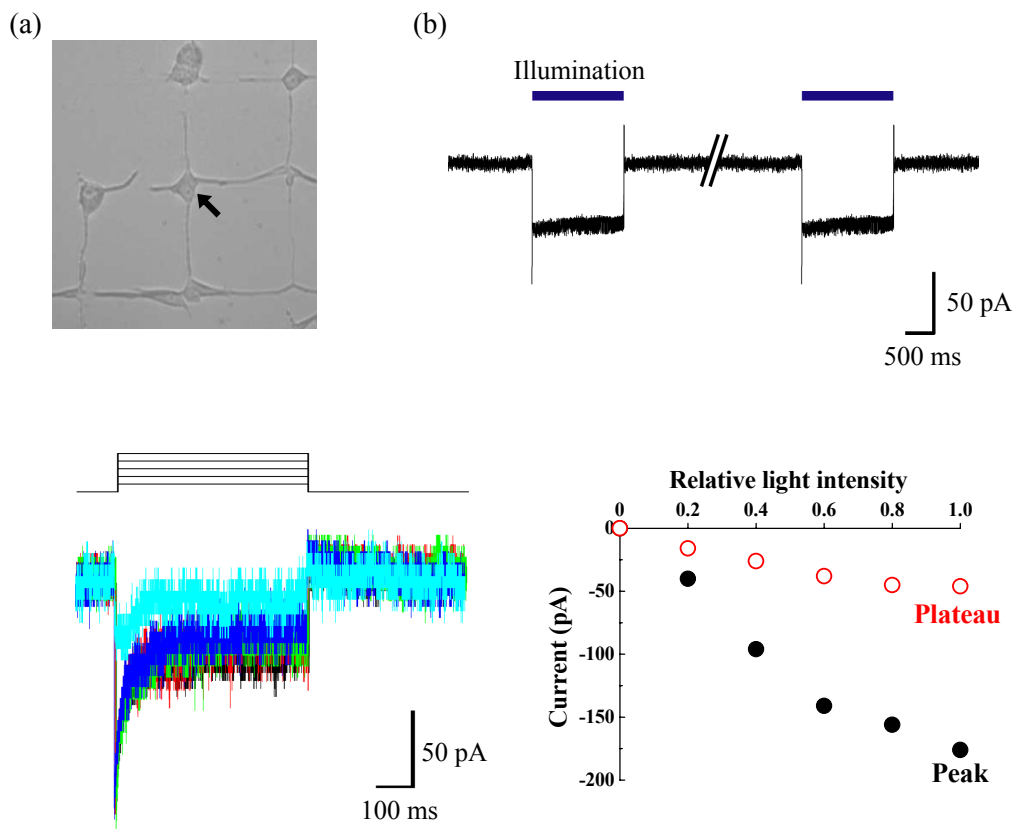


図 4.10 ChR2-PC12 細胞の光電流記録

- (a)  $\mu$ CP 法により基板微細孔上にパターンニングされた ChR2-PC12 ネットワーク(矢印は微細孔位置を示す)。(b) 青色発光ダイオードの光照射刺激による穿孔 - 培養モードによる whole-cell 電位固定記録(holding potential: -30 mV)。(c) 光パルス照射による光電流の強度依存性。

## 4.4 結言

本章では開発したバイオセンサーを細胞間のシグナル伝達や相互作用の観察に応用するために、 $\mu$ CP法を用いたタンパク質の固定化による神経ネットワークの構築法及び光感受性イオンチャネルを用いた光刺激法について要素技術の開発並びに基礎検討を行った。細胞体と突起部を空間的に分離した神経ネットワークアレイを形成させるために、細胞体を接着させるノード部と、軸索を誘導・伸張させるライン部が連続した形状のグリッドパターンを持つPDMSスタンプをフォトリソグラフィを用いて作製した。作製したスタンプにより基板上にECMタンパク質のパターンを形成し、神経系モデル細胞であるPC12を用いてNGFによる分化誘導を行うと、タンパク質の特定の微細パターン形状に従い、細胞体の配置及び軸索伸張が誘導され、測定基板上に細胞の形態、成長領域が制御された神経細胞のネットワークアレイを形成させることができた。さらに、パターン形状による細胞配列特性を検討すると、ノード直径 $\geq 10\ \mu\text{m}$ 、ライン幅 $\geq 4\ \mu\text{m}$ 、細胞密度 $50 - 100\ \text{cells}/\text{cm}^2$ の最適条件を見出した。また、遺伝子工学的手法を用いて生物由来の光受容体ChR2の光感受性とイオンチャネルの機能を利用した光刺激法を開発した。ChR2を用いた光刺激は、比較的小さな単一の遺伝子の導入で簡単に光感受性を細胞に付加することができる点、タンパク質発現後の化学的な修飾や化合物の添加が不要（哺乳動物では代謝によりレチナールが供給されるためレチナールの添加は不要）である点、光照射に同期させて細胞を刺激することができる点、電気刺激法に比べ細胞に機械的なダメージを与えない点で従来法の問題点を解決する優れた細胞刺激法であることを示した。

## 参考文献

1. Kandel, E. R., Schwartz, J. H. and Jessell, T. M. "*Principals of neural science*"; Appleton & Lange, (2000).
2. Nicholls, J. G., Martin, A. R., Wallace, B. G. and Fuchs, A. P. "*From Neuron to Brain*"; Sinauer Associates Inc., (2001).
3. Blawas, A. S. and Reichert, W. M., "Protein patterning", *Biomaterials*, (1998), **19**, 595-609.
4. Delamarche, E., Bernard, A., Schmid, H., Michel, B. and Biebuyck, H., "Patterned delivery of immunoglobulins to surfaces using microfluidic networks", *Science*, (1997), **276**, 779-781.
5. Morozov, V. N. and Morozova, T. Y., "Electrospray deposition as a method for mass fabrication of mono- and multicomponent microarrays of biological and biologically active substances", *Anal. Chem.*, (1999), **71**, 3110-3117.
6. Atsuta, K., Noji, H. and Takeuchi, S., "Micro patterning of active proteins with perforated PDMS sheets (PDMS sheets)", *Lab Chip*, (2004), **4**, 333-336.
7. Piner, R. D., Zhu, J., Xu, F., Hong, S. H. and Mirkin, C. A., "'Dip-pen' nanolithography", *Science*, (1999), **283**, 661-663.
8. Hayman, E. G., Pierschbacher, M. D., Suzuki, S. and Ruoslahti, E., "Vitronectin—A major cell attachment-promoting protein in fetal bovine serum", *Exp. Cell Res.*, (1985), **160**, 245-258.
9. Roberts, C., Chen, C. S., Mrksich, M., Martichonok, V., Ingber, D. E. and Whitesides, G.

- M., "Using mixed self-assembled monolayers presenting RGD and (EG)(3)OH groups to characterize long-term attachment of bovine capillary endothelial cells to surfaces", *J. Am. Chem. Soc.*, (1998), **120**, 6548-6555.
10. Arnold, M., Cavalcanti-Adam, E. A., Glass, R., Blummel, J., Eck, W., Kantelehner, M., Kessler, H. and Spatz, J. P., "Activation of integrin function by nanopatterned adhesive interfaces", *Chemphyschem*, (2004), **5**, 383-388.
  11. Spatz, J. P., Mossmer, S., Hartmann, C., Moller, M., Herzog, T., Krieger, M., Boyen, H. G., Ziemann, P. and Kabius, B., "Ordered deposition of inorganic clusters from micellar block copolymer films", *Langmuir*, (2000), **16**, 407-415.
  12. Kumar, A., Biebuyck, H. A. and Whitesides, G. M., "Patterning self - assembled monolayers applications in materials science", *Langmuir*, (1994), **10**, 1498-1511.
  13. Xia, Y. N. and Whitesides, G. M., "Soft lithography", *Annu. Rev. Mater. Sci.*, (1998), **28**, 153-184.
  14. Kane, R. S., Takayama, S., Ostuni, E., Ingber, D. E. and Whitesides, G. M., "Patterning proteins and cells using soft lithography", *Biomaterials*, (1999), **20**, 2363-2376.
  15. Takii, Y., Kaji, H., Matsue, T. and Nishizawa, M., "Microstamp-based micromachining for modulation of growth of cultured neuronal cells", *JSME International J. Ser. C*, (2004), **47**, 956-961.
  16. Balmer, T. E., Schmid, H., Stutz, R., Delamarche, E., Michel, B., Spencer, N. D. and Wolf, H., "Diffusion of alkanethiols in PDMS and its implications on microcontact printing ( $\mu$ CP)", *Langmuir*, (2005), **21**, 622-632.
  17. 水谷 亘 and 清美, 塚., "ソフト・マニユファクチャリング -マイクロコンタクト・プリンティングの展開-", *表面科学*, (2004), **25**, 612-617.
  18. Bernard, A., Renault, J. P., Michel, B., Bosshard, H. R. and Delamarche, E.,

- "Microcontact printing of proteins", *Adv. Mater.*, (2000), **12**, 1067-1070.
19. Bernard, A., Delamarche, E., Schmid, H., Michel, B., Bosshard, H. R. and Biebuyck, H., "Printing patterns of proteins", *Langmuir*, (1998), **14**, 2225-2229.
  20. Lange, S. A., Benes, V., Kern, D. P., Horber, J. K. H. and Bernard, A., "Microcontact printing of DNA molecules", *Anal. Chem.*, (2004), **76**, 1641-1647.
  21. Li, H. W., Kang, D. J., Blamire, M. G. and Huck, W. T. S., "High-resolution contact printing with dendrimers", *Nano Lett.*, (2002), **2**, 347-349.
  22. Walmsley, B., Alvarez, F. J. and Fyffe, R. E. W., "Diversity of structure and function at mammalian central synapses", *Trends Neurosci.*, (1998), **21**, 81-88.
  23. Buhl, E. H., Halasy, K. and Somogyi, P., "Diverse sources of hippocampal unitary inhibitory postsynaptic potentials and the number of synaptic release sites", *Nature*, (1994), **368**, 823-828.
  24. Sudhof, T. C., "The synaptic vesicle cycle a cascade of protein-protein interactions", *Nature*, (1995), **375**, 645-653.
  25. Lauer, L., Vogt, A., Yeung, C. K., Knoll, W. and Offenhausser, A., "Electrophysiological recordings of patterned rat brain stem slice neurons", *Biomaterials*, (2002), **23**, 3123-3130.
  26. Lauer, L., Klein, C. and Offenhausser, A., "Spot compliant neuronal networks by structure optimized micro-contact printing", *Biomaterials*, (2001), **22**, 1925-1932.
  27. Beck, K., Hunter, I. and Engel, J., "Structure and function of laminin - anatomy of a multidomain glycoprotein", *FASEB Journal*, (1990), **4**, 148-160.
  28. Delamarche, E., Geissler, M., Bernard, A., Wolf, H., Michel, B., Hilborn, J. and Donzel, C., "Hydrophilic poly (dimethylsiloxane) stamps for microcontact printing", *Adv. Mater.*, (2001), **13**, 1164-1167.

29. Bodas, D. and Khan-Malek, C., "Hydrophilization and hydrophobic recovery of PDMS by oxygen plasma and chemical treatment - An SEM investigation", *Sens. Actuators B Chem.*, (2007), **123**, 368-373.
30. Greene, L. A. and Tischler, A. S., "Establishment of a noradrenergic clonal line of rat adrenal pheochromocytoma cells which respond to nerve growth factor", *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, (1976), **73**, 2424-2428.
31. Vaudry, D., Stork, P. J. S., Lazarovici, P. and Eiden, L. E., "Signaling pathways for PC12 cell differentiation: Making the right connections", *Science*, (2002), **296**, 1648-1649.
32. Hutcheon, B. and Yarom, Y., "Resonance, oscillation and the intrinsic frequency preferences of neurons", *Trends Neurosci.*, (2000), **23**, 216-222.
33. Pike, F. G., Goddard, R. S., Suckling, J. M., Ganter, P., Kasthuri, N. and Paulsen, O., "Distinct frequency preferences of different types of rat hippocampal neurones in response to oscillatory input currents", *J. Physiol.*, (2000), **529**, 205-213.
34. Somogyi, P. and Klausberger, T., "Defined types of cortical interneurone structure space and spike timing in the hippocampus", *J. Physiol.*, (2005), **562**, 9-26.
35. Nagel, G., Ollig, D., Fuhrmann, M., Kateriya, S., Mustl, A. M., Bamberg, E. and Hegemann, P., "Channelrhodopsin-1: A light-gated proton channel in green algae", *Science*, (2002), **296**, 2395-2398.
36. Nagel, G., Szellas, T., Huhn, W., Kateriya, S., Adeishvili, N., Berthold, P., Ollig, D., Hegemann, P. and Bamberg, E., "Channelrhodopsin-2, a directly light-gated cation-selective membrane channel", *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, (2003), **100**, 13940-13945.
37. Suzuki, T., Yamasaki, K., Fujita, S., Oda, K., Iseki, M., Yoshida, K., Watanabe, M., Daiyasu, H., Toh, H., Asamizu, E., Tabata, S., Miura, K., Fukuzawa, H., Nakamura, S.

- and Takahashi, T., "Archaeal-type rhodopsins in Chlamydomonas: model structure and intracellular localization", *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, (2003), **301**, 711-717.
38. Ishizuka, T., Kakuda, M., Araki, R. and Yawo, H., "Kinetic evaluation of photosensitivity in genetically engineered neurons expressing green algae light-gated channels", *Neurosci. Res.*, (2006), **54**, 85-94.
39. Boyden, E. S., Zhang, F., Bamberg, E., Nagel, G. and Deisseroth, K., "Millisecond-timescale, genetically targeted optical control of neural activity", *Nat. Neurosci.*, (2005), **8**, 1263-1268.
40. Zhang, F., Wang, L. P., Boyden, E. S. and Deisseroth, K., "Channelrhodopsin-2 and optical control of excitable cells", *Nat. Methods*, (2006), **3**, 785-792.
41. Nagai, T., Ibata, K., Park, E. S., Kubota, M., Mikoshiba, K. and Miyawaki, A., "A variant of yellow fluorescent protein with fast and efficient maturation for cell-biological applications", *Nat. Biotechnol.*, (2002), **20**, 87-90.
42. Roth, M. G. "*Methods in cell biology: Protein expression in animal cells (methods in cell biology)*"; Academic Press, (1994).
43. Lee, H. S., Kim, K. H., Yu, J. K., Yoon, S. K. and Rhee, Y. W., "Effect of hydrophilicity on electrically driven flow in microchannels", *Colloids Surf. A Physicochem. Eng. Asp.*, (2007), **311**, 77-82.

## 第5章

### 総括

本論文は神経細胞ネットワークの機能解析応用を目指した新規プレーナーイオンチャネルバイオセンサーの作製並びに研究手法、要素技術の開発に関する研究成果をまとめたものである。現在、神経系の研究ではガラス微小電極などによる電気生理学的手法や電位感受性色素などを用いたイメージング法により個々のニューロンの電位変化を一細胞レベルで記録している。また、フローサイトメトリー法などにより単位時間あたりに多くの細胞を測定できる細胞分析技術により統計的な解析が行われている。しかし、本研究で対象とする神経細胞ネットワークのような細胞間あるいは細胞集団における外的刺激前後の応答や特定の細胞に対する応答など、多くの細胞を対象とした一細胞レベルの解析は困難である。本研究ではパッチクランプ法を応用したバイオセンサーを作製し、新しい測定法を確立したとともに、素子の有用性について理論、実験の両面から検証した。以下に本研究で得られた結果及び結論を各章ごとに示す。

第1章では研究背景として神経科学分野における研究手法と現状及び、近年盛んに研究が行われているバイオセンサーの研究動向について言及し、本研究の位置付けと目的について述べた。

第2章では本研究開発のプレーナーイオンチャネルバイオセンサーの概念及び作製方法について述べた。従来法では困難であった細胞間のシグナル伝達やタイムラプスの



計測を可能にする培養モードを開発した。素子の特性は基板の物性に大きく左右されるため、①低い寄生容量、②精密な微細加工、③多様な表面化学修飾、④電子回路の集積による微細化といった点から Si/SiO<sub>2</sub>/Si 構造を持った SOI を基板として用いた。電極部となる基板の微細貫通孔は Si/SiO<sub>2</sub> のエッチングレート比の差を利用した異方性ウェットエッチング及び FIB 加工を用いた三次元加工法を確立し、作製を行った。素子の特性を明らかにするために電極となる基板の等価回路モデルを立て電気的特性評価を行った。基板の抵抗は孔下側が大きく広がった構造となっているために、ピペットパッチクランプで使用されるピペット電極のアクセス抵抗(1 - 10 MΩ)と同等もしくは低い抵抗値を示した。またバックグラウンドノイズの最大の要因となる基板固有の浮遊容量は、ウェット熱酸化処理を用いた酸化膜の堆積及びプレーナー素子の利点であるシステムの微細化を行うことでさらに抑制が可能であることを明らかにした。

第3章では作製したセンサー素子を用いて、TRPV1 発現 HEK293 細胞を用いた全細胞膜電流記録及びノイズ解析を行った。作製したセンサー素子を用いて、従来法のプレーナーパッチクランプモード並びに本研究提案の培養モードの両測定モードにて、高い S/N 比で電流記録が可能であることを実証した。シリコン基板表面を細胞外基質で修飾することによって、細胞培養からイオンチャンネル電流計測までの一連の操作を素子基板上で行うことができる培養モードを確立した。流路構造を持たせたことで灌流による溶液交換が容易となり、ガラスピペットでは比較的困難とされる穿孔パッチを再現性良く行うことができた。また、素子の電気等価回路モデルを立て、培養モードにおける細胞-基板(微細孔)間接着部を流れる電流波形の解析を行い、本素子の主要なノイズ源が過剰電流ノイズであることを数値理論と実証実験で証明し、雑音低減の指針を示した。

第4章では神経ネットワークの機能解析に応用するために、細胞マイクロパターンニング及び光局所刺激法の要素技術の開発並びに基礎検討を行った。細胞体と突起部を空間的に分離させた神経ネットワークアレイを測定基板上に形成させるために、 $\mu$ CP法を用いたタンパク質の固定化による細胞マイクロパターンニングを行った。神経細胞をパターン配列させるための形状と大きさの幾何学的パターンを持ったPDMSスタンプをソフトリソグラフィにより作製し、基板上にECMタンパク質パターンを形成させた。モデル神経細胞PC12を用いてNGFによる分化誘導を行うと、タンパク質の特定の微細パターン形状に従い、細胞体の配置及び軸索伸張が誘導され、測定基板上に細胞の形態、成長領域が制御された神経細胞のネットワークアレイを形成させることができた。また、遺伝子工学的手法を用いて光受容体ChR2をPC12に発現させ、光感受性を付加させた。基板上に形成されたChR2-PC12細胞ネットワークより、光照射に同期した応答を観察することができ、ChR2を用いた光刺激によって細胞を刺激し、細胞から細胞への信号の送受信制御が可能であることを示した。

以上のように本研究にて提案、開発した培養機能集積型プレーナーイオンチャネルバイオセンサーはプレーナー素子の利点を網羅しつつ、システム内での培養から測定までの一連の操作を集約した新しい測定手法を確立した。これにより細胞間のシグナル伝達や相互作用の観察を可能にすることができる。さらに電極の集積化を行うことで、従来法では技術的に困難であった多数のニューロンの活動や応答を同時に記録することができ、神経回路全体のシグナル伝達機構の詳細な解析が可能となる。神経細胞ネットワークシステムの機能を明らかにすることは、神経変性疾患における神経細胞死の基礎過程との関係や発症機構の解明及び治療法の開発につながるものと期待できる。また、本研究開発素子は半導体材料であるシリコンを基板として用いていることから、半導体微細加工技術を用いて素子の微細化や後段のデータ処理回路の集積化を行うことで、小型

且つ可搬型の細胞機能解析システムや非常に簡便な薬剤スクリーニングシステムなどの応用も期待できる。

# 研究業績

## I. 発表論文リスト

### 【原著論文】

1. **T. Asano**, T. Nakamura, A. Wakahara and T. Urisu, "Noise Properties of Incubation-Type Planar Ion Channel Biosensor", *Japanese Journal of Applied Physics*, (2009), **48**, 27001-1-4.
2. **T. Asano**, H. Uno, K. Shibasaki, M. Tominaga and T. Urisu, "A Cell-Culture-Type Planar Ion Channel Biosensor", *Transactions of the Materials Research Society of Japan*, (2008), **33**, 767-770.
3. **浅野豪文**, 張振龍, 宇野秀隆, 手老龍吾, 鈴木光一, 中尾聡, 皆藤孝, 柴崎貢志, 富永真琴, 内海裕一, 宇理須恒雄, "SOI基板を用いたプレーナー型パッチクランプバイオセンサーの製作", *表面科学*, (2007), **28**, 385-390.

### 【和文総説】

4. **浅野豪文**, 柴崎貢志, 富永真琴, 宇理須恒雄, "プレーナー型イオンチャンネルバイオセンサーの開発と応用", *電気学会研究会会誌*, (2008), OQD-08-32, 9-12.

【関連論文】

5. T. Urisu, **T. Asano**, Z. L. Zhang, H. Uno, R. Tero, H. Junkyu, H. Isoda, Y. Arima, H. Iwata, K. Shibasaki, M. Tominaga, "Incubation type Si-based planar ion channel biosensor", *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, (2008), **391**, 2703-2709.
6. Z. L. Zhang, **T. Asano**, H. Uno, R. Tero, M. Suzui, S. Nakao, T. Kaito, K. Shibasaki, M. Tominaga, Y. Utsumi, Y. Gao, T. Urisu, "Fabrication of Si-based planar type patch clamp biosensor using silicon on insulator substrate", *Thin Solid Films*, (2008), **516**, 2813-2815.

## II. 学会発表リスト

### 【国際会議】

1. ○**T. Asano**, K. Shibasaki, Y. Fukazawa, R. Shigemoto, T. Ishizuka, H. Yawo, M. Tominaga and T. Urisu, "Development of planar biosensor combined with cell patterning and photostimulation for neural network analysis", *2<sup>nd</sup> International Symposium on Nanomedicine (ISNM2009) and Asian Core Symposium -Nano and Biomedical Molecular Science-*, Aichi, Japan, 5-7 February (2009).
2. ○**T. Asano**, K. Shibasaki, M. Tominaga and T. Urisu, "Development of Cell Culture Type Planar Ion Channel Biosensor for Nerve Cell Signaling Analysis", *Gordon Research Conference on Biointerface Science*, Aussois, France, 14-19 September (2008).
3. ○**T. Asano**, K. Shibasaki, M. Tominaga and T. Urisu, "Development of Cell Culture Type Planar Ion Channel Biosensor for Nerve Cell Signaling Analysis", *3<sup>rd</sup> International Workshop on Approaches to Single-cell Analysis*, Zurich, Switzerland, 11-12 September (2008).
4. ○**T. Asano**, H. Uno, K. Shibasaki, M. Tominaga and T. Urisu, "Fabrication of Planar Type Ion Channel Biosensor Using Silicon on Insulator Substrate", *Winter School of Sokendai/Asian CORE Program*, Aichi, Japan, 24 January (2008).
5. ○**T. Asano**, H. Uno, K. Shibasaki, M. Tominaga and T. Urisu, "Development of Planar Patch-clamp Biosensor with Cell Culture Function", *18<sup>th</sup> Symposium of the Materials Research Society of Japan*, Tokyo, Japan, 8 December (2007).
6. ○**T. Asano**, Z. L. Zhang, H. Uno, M. Suzui, T. Kaito, K. Shibasaki, M. Tominaga and T. Urisu, "Fabrication of Planar Type Patch-clamp Biosensor Using Silicon on Insulator

- Substrate", *2<sup>nd</sup> International Workshop on Approaches to Single-Cell Analysis*, Tokyo, Japan, 6-7 September (2007).
7. ○**T. Asano**, Z. L. Zhang, H. Uno, R. Tero, K. Suzui, S. Nakao, T. Kaito, K. Shibasaki, M. Tominaga, Y. Utsumi and T. Urisu, "Fabrication of Planar Type Patch-clamp Biosensor Using Silicon on Insulator Substrate", *International Symposium of Nanomedicine 2007 and 2<sup>nd</sup> Molecule-Based Information Transmission and Reception 2007*, Aichi, Japan, 20-22 April (2007).
  8. ○**T. Asano**, Z. L. Zhang, H. Uno, R. Tero, K. Suzui, S. Nakao, T. Kaito, K. Shibasaki, M. Tominaga, Y. Utsumi and T. Urisu, "Fabrication of Si-Based Planar Type Patch-Clamp Biosensor Using Silicon on Insulator Substrate", *Winter School of Sokendai/Asian CORE Program*, Aichi, Japan, 2 March (2007).
  9. **T. Asano**, ○Z. L. Zhang, H. Uno, R. Tero, M. Suzui, S. Nakao, T. Kaito, K. Shibasaki, M. Tominaga, Y. Utsumi and T. Urisu, "Fabrication of Si-based Planar Type Patch-Clamp Biosensor Using Silicon on Insulator Substrate". *7<sup>th</sup> International Conference on Nano-Molecular Electronics*, Kobe, Japan, 13-15 December (2006).

#### 【国内学会】

1. ○**浅野豪文**, 宇野秀隆, 深澤有吾, 重本隆一, 石塚徹, 八尾寛, 宇理須恒雄, "光受容イオンチャネル ChR2 を用いた光刺激の神経ネットワークへの応用検討", 第56 回応用物理学関係連合講演会, 筑波大学, 2009 年 3 月 31 日.
2. ○**浅野豪文**, 宇理須恒雄, "プレーナー型イオンチャネルバイオセンサーを用いた細胞間シグナル伝達解析への応用", 第 69 回応用物理学学会学術講演会, 中部大学, 2008 年 9 月 4 日.

3. ○浅野豪文, 柴崎貢志, 富永真琴, 宇理須恒雄, "プレーナー型イオンチャンネルバイオセンサーの開発と応用", 光・量子デバイス研究会, 京都大学, 2008年5月7日.
4. 浅野豪文, 柴崎貢志, 富永真琴, ○宇理須恒雄, "細胞シグナル伝達解析を目指したプレーナー型イオンチャンネルバイオセンサーの開発", ナノ学会第6回大会, 九州大学, 2008年5月7日.
5. ○浅野豪文, 宇野秀隆, 柴崎貢志, 富永真琴, 宇理須恒雄, "細胞培養機能を備えたプレーナー型イオンチャンネルバイオセンサーの開発", 第55回応用物理学関係連合講演会, 日本大学, 2008年3月29日.
6. ○浅野豪文, 宇野秀隆, 柴崎貢志, 富永真琴, 宇理須恒雄, "細胞培養型プレーナーイオンチャンネルバイオセンサーの開発", 第5回ライフサーベイヤシンポジウム, 名古屋大学, 2008年1月31 - 2月1日.
7. ○浅野豪文, 張振龍, 宇野秀隆, 鈴木光一, 皆藤孝, 柴崎貢志, 富永真琴, 宇理須恒雄, "SOI基板を用いたプレーナー型イオンチャンネルバイオセンサーの素子寄生容量の低減化", 第68回応用物理学学会学術講演会, 北海道工業大学, 2007年9月4日.
8. ○浅野豪文, 宇理須恒雄, "イオンチャンネルに着目したアルツハイマー発症初期過程の網羅的探索", 第4回ライフサーベイヤシンポジウム, 青山学院大学, 2007年6月4 - 5日.
9. ○浅野豪文, 張振龍, 宇野秀隆, 手老龍吾, 鈴木光一, 中尾聡, 皆藤孝, 柴崎貢志, 富永真琴, 内海裕一, 宇理須恒雄, "SOI基板を用いたプレーナー型パッチクランプバイオセンサーの製作", ナノ学会第5回大会, つくば国際会議場, 2007年5月23日.
10. ○浅野豪文, 張振龍, 宇野秀隆, 手老龍吾, 鈴木光一, 中尾聡, 皆藤孝, 宇理須恒雄, "SOI基板を用いたプレーナー型イオンチャンネルバイオセンサーの微細孔構造制御", 第54回応用物理学関係連合講演会, 青山学院大学, 2007年3月29日.



11. ○浅野豪文, 張振龍, 宇野秀隆, 手老龍吾, ガオヨンリー, 鈴木光一, 中尾聡, 皆藤孝, 柴崎貢志, 富永真琴, 内海裕一, 宇理須恒雄, "Si 基板を用いたプレーナー型パッチクランプバイオセンサーの製作", 第26回表面科学講演大会, 大阪大学, 2006年11月7日.

### III. 特許

1. 特願 2008-046145, 「パッチクランプ素子用基板、平面基板型パッチクランプ素子及び細胞イオンチャンネル活性測定方法」, 宇理須恒雄, 宇野秀隆, 浅野豪文, 出願 平成 20 年 2 月 27 日.

### IV. 受賞/その他の経歴

1. *ISNM2009 The Best Poster Award*

"Development of planar biosensor combined with cell patterning and photostimulation for neural network analysis", *2<sup>nd</sup> International Symposium on Nanomedicine (ISNM2009)*, Aichi, Japan, 5-7 February (2009).

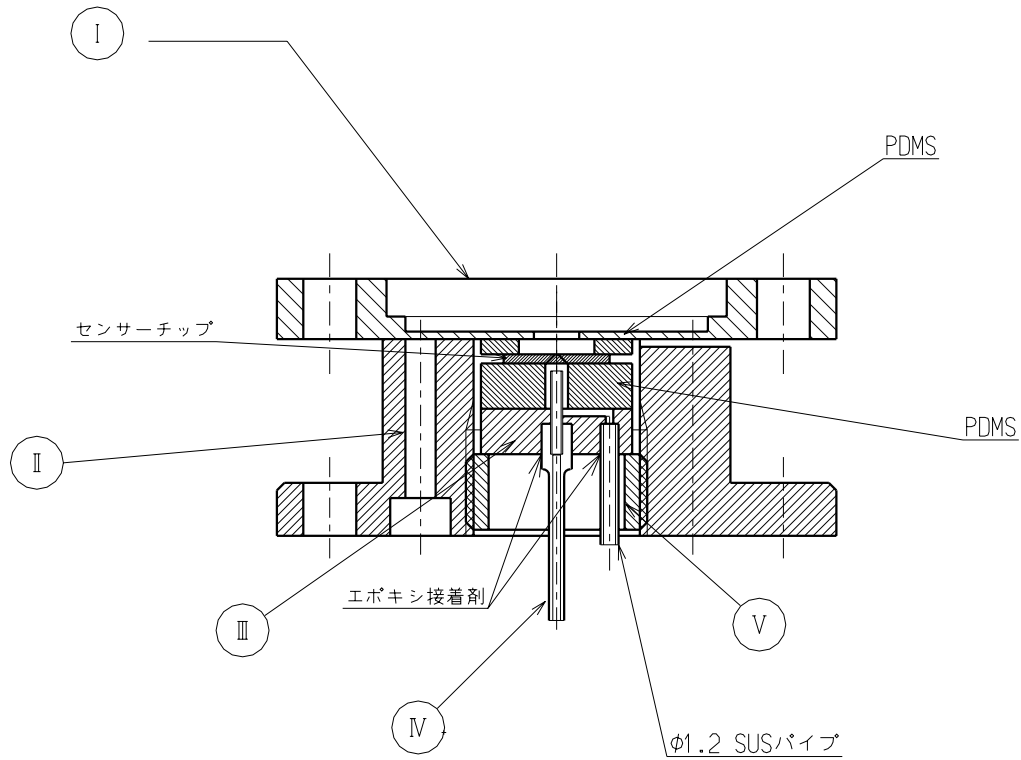
2. 平成 19 年 4 月～平成 21 年 3 月 日本学術振興会 特別研究員(DC2)

## 参考資料

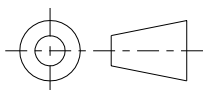
開発したプレーナーイオンチャンネルバイオセンサーは 5 つのチャンバー部品によって構成されている。センサー本体上部(I)は細胞培養を行うためにアルコール洗浄と UV 照射による滅菌が可能なフッ素系樹脂(ダイフロン)を使用した。センサー本体下部(II)には加工が容易な塩化ビニール樹脂を用いた。また、下チャンバー部の電極として用いる銀管は塩化銀化処理を適時行い、安定した測定を行うために、先端部が交換できるようにジョイント型とした。以下に各構成要素と設計図面を示す。

### 構成部品

- I. センサー本体上部
- II. センサー本体下部
- III. 電極・流路導入部
- IV. Ag 電極ジョイント
- V. 締め付けリング
- VI. センサーステージ



削り加工寸法許容差 GENERAL TOLERANCES	
寸法の区分	JIS中級
0.5以上6以下	±0.1
6をこえ30以下	±0.2
30〃120以下	±0.3
120〃315以下	±0.5
315〃1000以下	±0.8
1000〃2000以下	±1.2



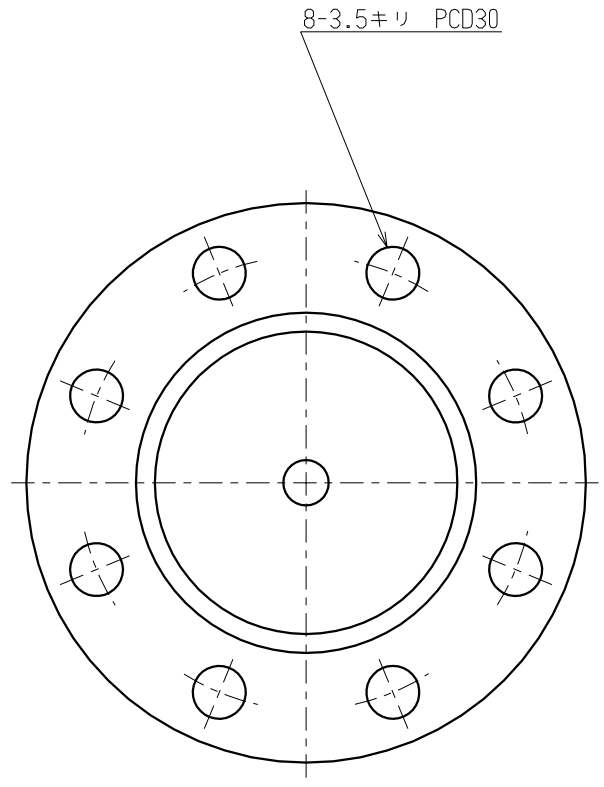
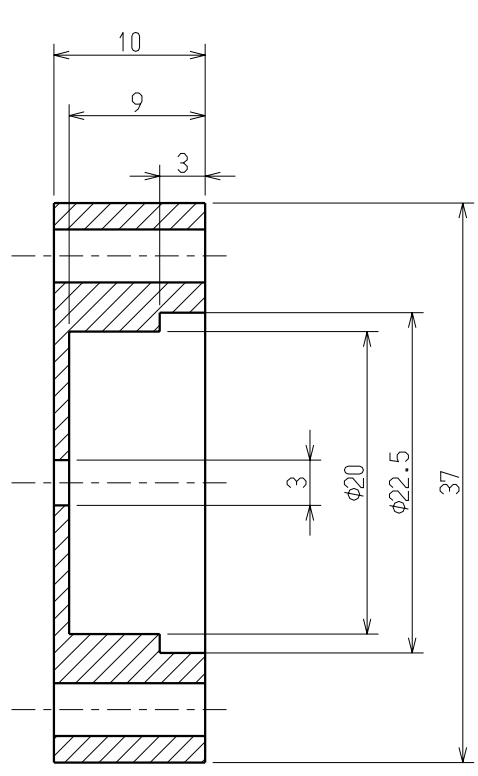
TITLE:

センサー組立図

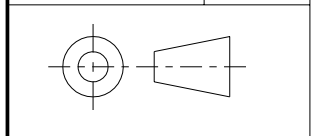
材質

SCALE

2 / 1



削り加工寸法許容差 GENERAL TOLERANCES	
寸法の区分	JIS中級
0.5以上6以下	$\pm 0.1$
6をこえ30以下	$\pm 0.2$
30 $\llcorner$ 120以下	$\pm 0.3$
120 $\llcorner$ 315以下	$\pm 0.5$
315 $\llcorner$ 1000以下	$\pm 0.8$
1000 $\llcorner$ 2000以下	$\pm 1.2$



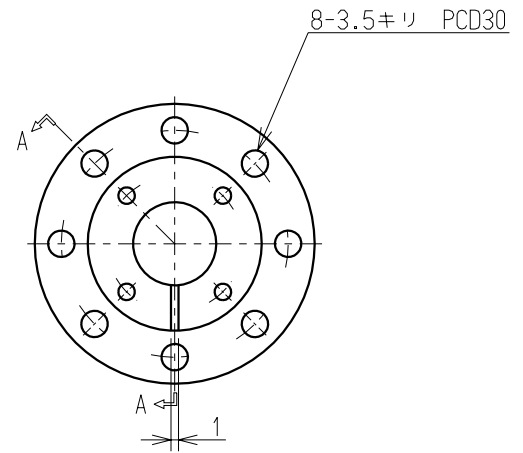
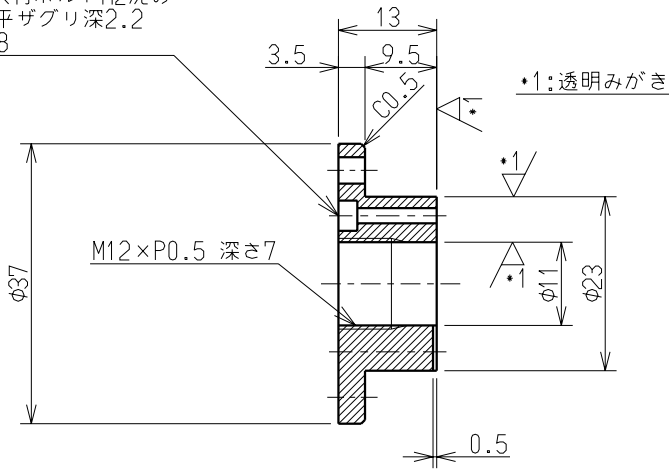
TITLE:  
センサー本体上部 ( I )

材質

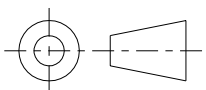
ダイフロン

SCALE  
2 / 1

4-2.2キリ  
六角穴付ボルトM2沈め  
φ4平ザグリ深2.2  
PCD18



削り加工寸法許容差 GENERAL TOLERANCES	
寸法の区分	JIS中級
0.5以上6以下	±0.1
6をこえ30以下	±0.2
30〃120以下	±0.3
120〃315以下	±0.5
315〃1000以下	±0.8
1000〃2000以下	±1.2

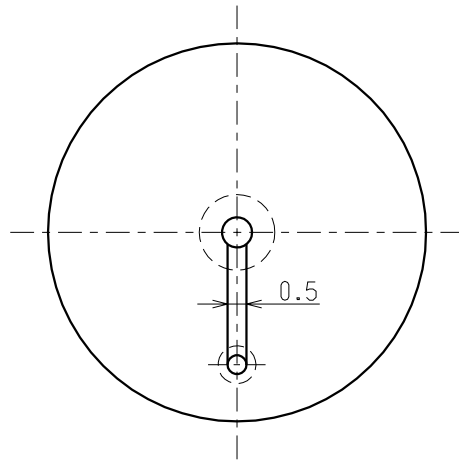
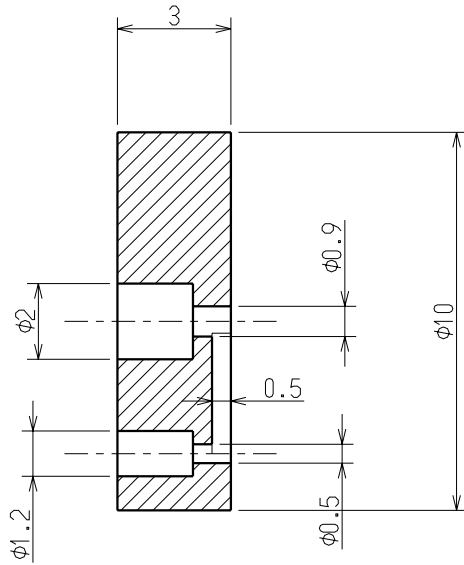


TITLE:  
センサー本体下部 ( II )

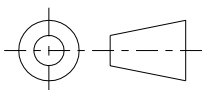
材質

塩化ビニール

SCALE  
1 / 1



削り加工寸法許容差 GENERAL TOLERANCES	
寸法の区分	JIS中級
0.5以上6以下	±0.1
6をこえ30以下	±0.2
30〃120以下	±0.3
120〃315以下	±0.5
315〃1000以下	±0.8
1000〃2000以下	±1.2



TITLE:

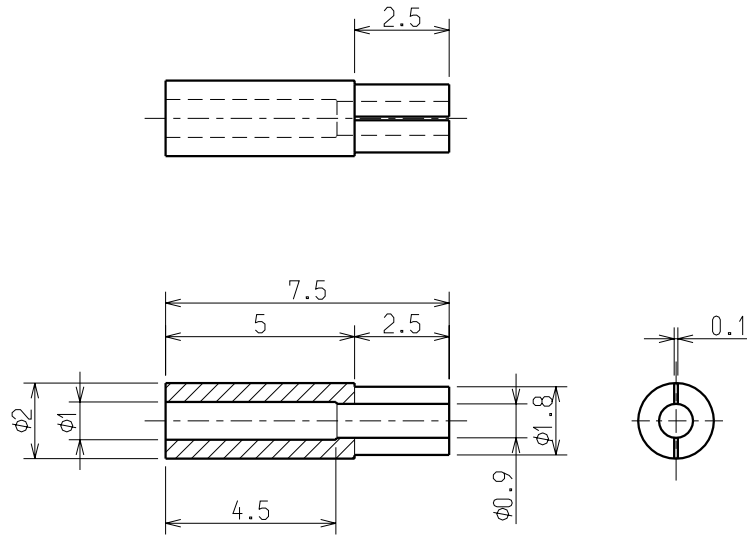
電極・流路導入部（Ⅲ）

材質

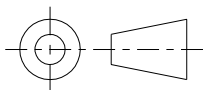
塩化ビニール

SCALE

5  
/  
1



削り加工寸法許容差 GENERAL TOLERANCES	
寸法の区分	JIS中級
0.5以上6以下	±0.1
6をこえ30以下	±0.2
30〃120以下	±0.3
120〃315以下	±0.5
315〃1000以下	±0.8
1000〃2000以下	±1.2



TITLE:

Ag 電極ジョイント(IV)

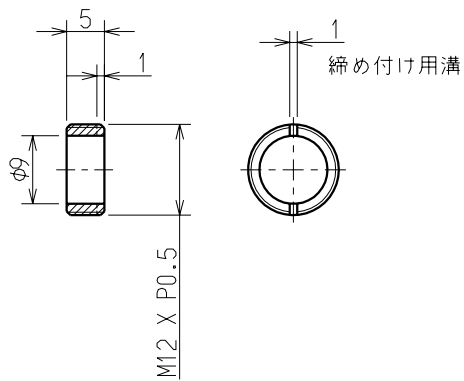
材質

Ag

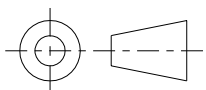
SCALE

5  
/  
1





削り加工寸法許容差 GENERAL TOLERANCES	
寸法の区分	JIS中級
0.5以上6以下	±0.1
6をこえ30以下	±0.2
30〃120以下	±0.3
120〃315以下	±0.5
315〃1000以下	±0.8
1000〃2000以下	±1.2



TITLE:

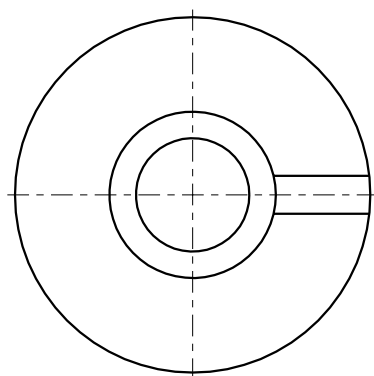
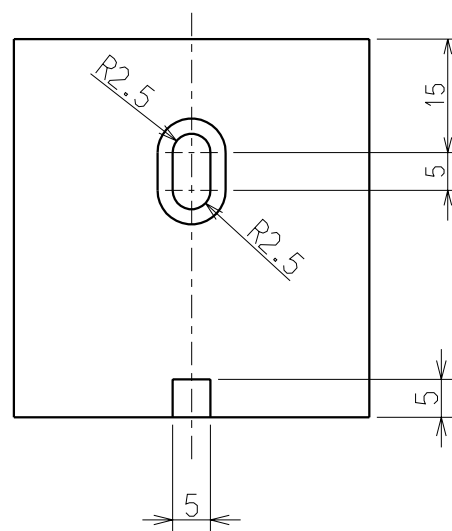
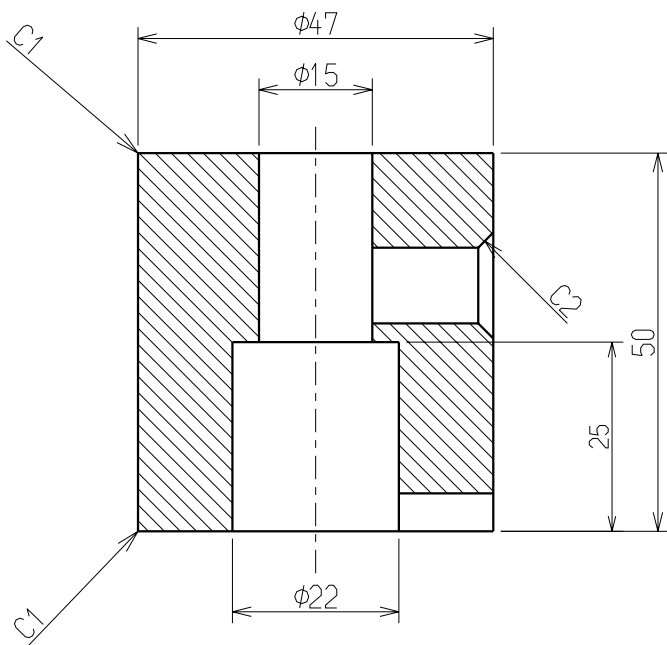
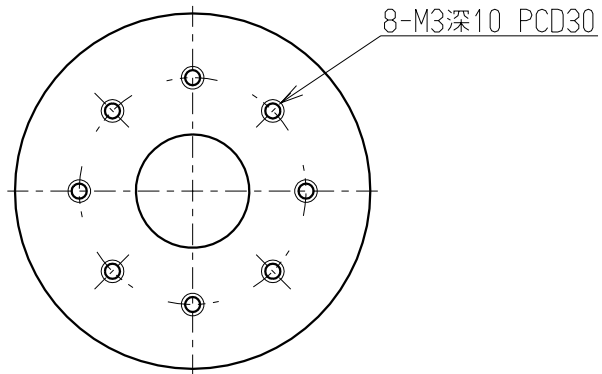
締め付けリング (V)

材質

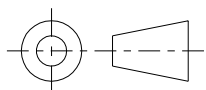
塩化ビニール

SCALE

1 / 1



削り加工寸法許容差 GENERAL TOLERANCES	
寸法の区分	JIS中級
0.5以上6以下	$\pm 0.1$
6をこえ30以下	$\pm 0.2$
30 $\times$ 120以下	$\pm 0.3$
120 $\times$ 315以下	$\pm 0.5$
315 $\times$ 1000以下	$\pm 0.8$
1000 $\times$ 2000以下	$\pm 1.2$



TITLE:  
センサーステージ (VI)

材質

AL2017

SCALE  
1  
/ 1

# 謝辞

本研究は総合研究大学院大学／自然科学研究機構 分子科学研究所 宇理須恒雄教授並びに手老龍吾助教、同大学／自然科学研究機構 生理学研究所 富永真琴教授並びに柴崎貢志助教、重本隆一教授並びに深澤有吾助教、東北大学大学院 八尾寛教授並びに石塚徹講師の御指導、御教授のもと行われた。

本研究の遂行並びに本論文をまとめるにあたり、終始懇切丁寧な暖かい御指導、御鞭撻を賜りました宇理須恒雄教授に心より厚く感謝致します。

本論文の御校閲、また本研究を推進するにあたり常に的確な御指導、御助言並びに激励のお言葉を戴きました手老龍吾助教に心より厚く御礼申し上げます。

本研究の共同研究者である富永真琴教授並びに柴崎貢志助教（現 群馬大院医学系）には生命科学の新しい研究分野を進む中で実験技術や研究方針に関して多大なる御指導、御助言並びに激励のお言葉を賜り心より厚く御礼申し上げます。

遺伝子工学実験に関して御指導並びに御助言を受け賜りました重本隆一教授並びに深澤有吾助教、日馬多美子氏に心より厚く御礼申し上げます。

神経科学及び光感受性タンパク質の基礎知識、光励起システムの構築に関して御指導、御助言を受け賜りました八尾寛教授並びに石塚徹講師に心より厚く御礼申し上げます。

研究活動並びに研究生活を送るにあたり、お世話になりました同研究室の宇野秀隆氏、中井直史氏、MD. Abu Sayed 氏、尚治国氏、藤原邦代氏の皆様には深く感謝致します。

清水厚子秘書には事務的な書類作成をはじめとし数々の御協力を頂き、無理難題にも真摯に対応して頂きました。心より御礼申し上げます。

また、研究室が隣室であった見附孝一朗准教授、片柳英樹助教をはじめ、見附研究室の Kafle Bhim Prasad 氏、MD. Serajul Prodhon Islam 氏の皆様にはセミナーや歓送迎会な

どで大変お世話になりました。厚く御礼申し上げます。

最後に、これまで私の長い学生生活を支え続けて下さいました家族の皆様に深く御礼申し上げます。

本研究は、独立行政法人 日本学術振興会 特別研究員奨励費の助成を受けて行われました。ここに同法人への深い感謝の意を表します。