

2023年 1月 5日

電気・電子情報 工学専攻	学籍番号 第D189201号	指導教員 澤田 和明
氏名 土井 英生		

## 論文内容の要旨 (博士)

博士学位論文名	非標識バイオイメージセンサの開発と海馬からの化学種の可視化
---------	-------------------------------

(要旨 1,200字程度)

脳の生理機能および病態生理機能解明のためには、神経伝達に重要な役割を果たす細胞外の化学物質を高い時空間分解能で可視化解析する技術の開発が重要である。蛍光顕微鏡によるイメージング技術は感度・空間分解能が高いが、細胞外の神経伝達物質やイオンを観察するために蛍光色素やたんぱく質等の標識を必要とするため、神経伝達を阻害する恐れや励起光照射による細胞への悪影響が懸念される。標識を用いずに可視化する生物発光法は、非常に感度が高いが、反応による発光量が微弱なため空間分解能は100  $\mu\text{m}$ 程度と神経伝達の局所応答の可視化は困難である。一方、Field Effect Transistor (FET) を用いた電位検出型のバイオセンサアレイは検出素子の微細化および多点同時計測を可能とし、イメージングへの可能性を秘めている。本研究室で開発されてきた電荷転送型イオンイメージセンサは液中の水素イオン拡散を非標識でリアルタイムに観察でき、特定のイオン感応膜を形成することでバイオイメージセンサとして機能する。本論文では、計測対象物質としてのAdenosine-5'-triphosphate (ATP)、Lactate、カルシウムイオン ( $\text{Ca}^{2+}$ )、カリウムイオン ( $\text{K}^+$ ) のような主要な神経伝達物質を非標識で可視化するイメージング技術の創出を目的とし、CMOSイメージセンサ技術に分子検出膜を融合した非標識バイオイメージセンサの開発によるバイオイメージングへの可能性を検討した。

まず、画素ピッチ37.3  $\mu\text{m}$ の電位検出型アレイセンサ上にATP分解酵素を機能膜として修飾した酵素型非標識ATPイメージセンサを提案した。センサ表面の親水化処理および酵素の多量固定が可能ポリイオンコンプレックス法による成膜で液中ATP拡散の画像化に成功した。ATPの高感度検出に向けた膜厚依存性の検討実験では、厚さを200 nm程度にすることで濃度10  $\mu\text{M}$ の検出を実現した。マウスの急性脳スライス標本を用いた細胞外応答の可視化実験では、電気刺激により細胞外に放出されたATPの非標識観察に成功した。また、液中のpH緩衝作用がセンサの検出限界を著しく悪化させる問題点を明らかにした。

次に、pH緩衝作用による原理的な課題を解決するための酸化還元型ATPイメージセンサを提案した。金/チタンを堆積したアレイセンサに、3種類の酸化酵素、フェロセンメディエータを用いた電子反応検出技術に基づいて、pH緩衝作用が10 mMのような生物学的実験下で2.8  $\mu\text{M}$ の最低検出下限を示し、センサの高感度化を実証した。また、酸化還元反応検出系を応用し、ATP、Lactateを含む5種類の分子検出にも成功した。細胞外応答の計測実験では、ATP放出の可視化には至らなかった一方で、海馬スライスからの乳酸放出応答のリアルタイムイメージングに初めて成功し、イメージングデバイスとしての機能を実証した。

続いて、イオノフォア含有PVC膜型の $\text{Ca}^{2+}$ および $\text{K}^+$ イメージセンサ (画素ピッチ23.55  $\mu\text{m}$ ) を製作し、高感度・高解像イメージングに向け膜厚依存性を検討した。 $\text{Ca}^{2+}$ イメージセンサの実験では、膜溶液の溶媒量および成膜量を制御することで理論感度を示し出力分布の均一化に成功した。 $\text{K}^+$ イメージセンサの実験では、理論感度が低下せず面内バラツキを5%程度にできる成膜条件を見出した。共存イオンおよび神経伝達物質に対する電位応答の計測実験より、生物学的実験環境を模倣した溶液中でイオンの選択的検出を実証した。

最後に、PVC膜型イオンイメージセンサを海馬スライスの薬剤刺激実験に応用し、細胞外応答を検討した。興奮性のシナプス伝達を模倣したグルタミン酸刺激により、細胞外 $\text{Ca}^{2+}$ 濃度がダイナミックに低下すること、この応答が海馬脳部位で全く異なった (CA1, DG>CA3)。また、受

容体の阻害実験を通じて、細胞外 $\text{Ca}^{2+}$ 低下および $\text{K}^+$ 上昇にNMDA型のグルタミン酸受容体が強く関与することを明らかにした。また厚さの異なるセンサを用いた空間解像度の検証実験では、感応膜の膜厚が細胞外応答の時空間ダイナミクスに及ぼす可能性を実証し、薄膜化の有用性を示した。

本研究では、細胞外ATP、乳酸、 $\text{Ca}^{2+}$ 、 $\text{K}^+$ を画素ピッチ数十 $\mu\text{m}$ の電位検出型アレイセンサ上で非標識観察することに成功し、海馬スライスのような脳神経組織における細胞外応答の時空間解析センサとして有用である可能性を示した。開発した細胞外イメージング技術は、脳の生理および病態生理機能の解明に貢献することが期待でき、新たなバイオイメージングツールと成り得る。

Date of Submission (month day, year) : January 5<sup>th</sup>, 2023

Department of Electrical and Electronic Information Engineering	Student ID Number D189201	Supervisors Kazuaki Sawada
Applicant's name Hideo Doi		

**Abstract (Doctor)**

Title of Thesis	Development of a label-free bio-image sensor and visualization of chemicals from the hippocampus
-----------------	---

Approx. 800 words

To elucidate the physiological and pathophysiological functions of the brain, it is important to develop techniques to visualize and analyze extracellular chemical substances that play an important role in neurotransmission with high spatiotemporal resolution. Although fluorescence microscopy has high sensitivity and spatial resolution, it requires labels such as fluorescent dyes and proteins to visualize extracellular neurotransmitters and ions, which may interfere with neurotransmission and adversely affect cells due to the irradiation of excitation light. The bioluminescence method, which allows visualization without labeling, is very sensitive to the target molecules. However, the spatial resolution is only about 100  $\mu\text{m}$  due to the weak luminescence from the reaction, making it difficult to visualize the local release of neurotransmitters. On the other hand, field effect transistor (FET)-based potentiometric biosensor arrays have a potential for bioimaging, because they enable the miniaturization of sensing elements and simultaneous measurement of multiple points. The charge-transfer-type ion image sensor developed in this laboratory can visualize the diffusion of hydrogen ions in real time and without any labeling. By immobilizing a specific ion-sensitive membrane, it can function as a bioimage sensor. In this paper, we describe the development of an imaging technique to visualize neurotransmitters, such as Adenosine-5'-triphosphate (ATP), Lactate, calcium ions ( $\text{Ca}^{2+}$ ), and potassium ions ( $\text{K}^+$ ) in a non-labeled manner as the target molecules. We discussed the possibility of bioimaging by developing a label-free bioimage sensor that integrates CMOS image sensor technology with a molecular detection membrane.

First, we proposed an enzyme-based label-free ATP image sensor with an ATP-degrading enzyme modified as a functionalized membrane on a potentiometric sensor array with a 37.3  $\mu\text{m}$ -resolution. The thickness-dependent ATP diffusion was investigated for highly sensitive detection of ATP, and the limit of detection was achieved to be 10  $\mu\text{M}$  by decreasing the film thickness to approximately 200 nm. In visualization experiments of extracellular responses using acute mouse brain tissues, unlabeled ATP released extracellularly by electrical stimulation was successfully visualized. We also clarified the problem that pH buffering in the solution significantly deteriorates the detection limit of the sensor.

Next, a redox-type ATP image sensor was proposed to overcome the principle problem caused by pH buffer action. Based on an electronic reaction detection technique using three oxidase enzymes and an electron mediator on a sensor array deposited gold and titanium layer, a lower detectable concentration was 2.8  $\mu\text{M}$  was demonstrated under biological experiments where the pH buffering was 10 mM, demonstrating the high sensitivity of the sensor. In addition, by applying the redox reaction detection system, we succeeded in detecting five chemicals including ATP and Lactate. From visualization experiments of extracellular responses, ATP release could not detect while label-free real-time imaging of lactate from hippocampal slices for the first time, demonstrat

ing its function as an imaging device.

In the experiment of the  $\text{Ca}^{2+}$  image sensor, the theoretical sensitivity and uniformity of the output distribution were successfully obtained by controlling the volumes of solvent and the film thickness. For the  $\text{K}^+$  image sensor, we found the film deposition conditions that can reduce the in-plane variation to about 5% without decreasing the theoretical sensitivity. The selective detection of  $\text{Ca}^{2+}$  and  $\text{K}^+$  under biological conditions was demonstrated.

Finally, PVC membrane-based ion image sensors were applied to biological experiments with chemical stimulation in hippocampal slices. Based on glutamate stimulation, which mimics excitatory synaptic transmission, dynamically decreased extracellular  $\text{Ca}^{2+}$  concentration ( $[\text{Ca}^{2+}]_o$ ), and this response was different in hippocampal sub-regions (CA1, DG>CA3). Through receptor inhibition experiments, we found that N-Methyl-D-aspartic Acid (NMDA)-type glutamate receptors are strongly involved in the  $[\text{Ca}^{2+}]_o$  decrease and  $\text{K}^+$  increase. Additionally, using different thick sensors, it was demonstrated that the film thickness greatly affects the spatial resolution of  $[\text{Ca}^{2+}]_o$  and  $[\text{K}^+]_o$  dynamics, and the thinner film is effective for better extracellular imaging.

In this study, we succeeded in label-free imaging of extracellular ATP, lactate,  $\text{Ca}^{2+}$ , and  $\text{K}^+$  on a potentiometric sensor array with several tens of micrometers pitch and demonstrated that the sensor may be useful for spatiotemporal analysis of extracellular responses in brain tissue such as hippocampal slices. The developed extracellular imaging technique is expected to contribute to the elucidation of physiological and pathophysiological functions of the brain as a novel bioimaging tool.