

論文内容の要旨

博士論文題目

自由行動下マウスの脳神経活動計測に向けた蛍光計測用 埋植型 CMOS イメージングデバイスの高感度化に関する研究

氏名 須永 圭紀

(論文内容の要旨)

蛍光イメージング手法は、GFP(Green Fluorescent Protein)をはじめとする様々な分子の局在や挙動を観察することが可能であり、脳神経活動観測の有力な手法となっている。しかし、一般的な蛍光イメージング手法は大型の蛍光顕微鏡が用いられるため、自由行動下におけるマウス等実験動物の観察が困難である。

本論文では、マウス脳に埋植可能な超小型 CMOS イメージングデバイスの蛍光計測の高性能化を行うとともに、開発したデバイスを用いた動物実験を行い、自由行動下マウスの脳神経活動に伴う蛍光計測技術の確立を目指した。

蛍光イメージングにおいては蛍光と励起光を高い除去比で分別することが必須となる。埋植型デバイスには小型化が求められるため、できるだけ小規模かつ高い励起光除去比を実現可能な光学系が求められる。本論文では神経活動計測において有用性の高い緑色蛍光計測を中心に、埋植型デバイスに適した蛍光計測の高感度化に取り組んだ。本論文では、励起光源である LED 表面に励起フィルタを形成することにより、GFP 中心波長の 510 nm 付近の LED の相対強度を 1.4×10^4 から 2.2×10^2 まで減少させることに成功し、励起フィルタと蛍光フィルタを組み合わせることで、蛍光顕微鏡の特性に匹敵する励起光透過率 10^{-5} を達成した。また、黒色の吸収色素を主成分とする遮光層をイメージセンサと LED の間に形成することで、励起光漏れを従来の 10% 以下にまで低減することに成功し、広い撮像領域での蛍光計測を可能とした。

次に、開発したデバイスの緑色蛍光検出における性能評価を目的とした動物実験を行い、固定状態でのマウスへの視覚刺激によるフラビン蛋白による緑色蛍光変化及び GCaMP からの緑色蛍光変化の検出に成功した。自由行動下においても GCaMP 発現部分を観察可能であることを実証した。

以上のように、小型化が求められる埋植型デバイスにおいて、神経活動計測において有用性の高い緑色蛍光計測を中心に、埋植型デバイスに適した蛍光光学系を確立し、蛍光計測の高感度化を実現した。さらに、開発した埋植型イメージングデバイスを用いてマウス脳内の蛍光イメージング実験を行い、実際にマウス脳における脳神経活動に伴う蛍光イメージングが可能であることを実証した。

(論文審査結果の要旨)

本論文は、マウス脳内に埋植可能な超小型 CMOS イメージングデバイスの蛍光計測の高性能化を行うとともに、開発したデバイスを用いた動物実験を行い、自由行動下マウスの脳神経活動に伴う蛍光計測技術の確立を目指すものである。

第1章では、本論文の目的と構成を述べている。

第2章では、埋植型イメージングの原理および手法、一般的な蛍光顕微鏡を用いた蛍光イメージングの特徴を解説し、次にこれまでに提案された埋植型イメージングデバイスの概要を説明し、解決すべき課題を明確にしている。

第3章では、これまで開発された埋植型イメージングデバイスでは、イメージセンサ上に形成された励起光カットフィルターでは励起光を完全に遮断できない課題に取り組んだ。励起光源である LED 表面に励起フィルタを形成することにより、GFP (Green Fluorescent Protein)の中心波長である 510 nm 付近の LED の相対強度を 1.4×10^4 から 2.2×10^2 まで減少させることに成功し、励起フィルタと蛍光フィルタを組み合わせることで、蛍光顕微鏡の性能に相当する励起光透過率 10^{-5} を達成した。

第4章では、従来デバイスの課題の一つであるイメージセンサ付近に配置された励起光源である LED からの漏れ光による出力飽和が発生し、撮像可能な領域が制限されてしまう点に取り組んだ。埋植型イメージングデバイスにおける高感度蛍光検出に向けて、側面遮光フィルタの導入を考案し、側面遮光層形成により励起光漏れを従来の 10% 以下にまで低減することに成功し、広い撮像領域での蛍光計測を可能とした。

第5章では、第3章と第4章で提示したデバイスを用いて、開発したデバイスの緑色蛍光検出における性能評価を目的とした動物実験について述べている。固定状態でのマウスへの視覚刺激によるフラビン蛋白による緑色蛍光変化及び GCaMP からの緑色蛍光変化の検出に成功した。また、自由行動下においても GCaMP 発現部分を観察可能であることを実証した。

最後に、第6章では、各章の総括を行い、残された課題について議論し、今後の展開について述べている。

以上のように、小型化が求められる埋植型デバイスにおいて、神経活動計測において有用性の高い緑色蛍光計測を中心に、埋植型デバイスに適した蛍光光学系を確立し、蛍光計測の高感度化を実現した。さらに、開発した埋植型イメージングデバイスを用いてマウス脳内の蛍光イメージング実験を行い、実際にマウス脳における脳神経活動に伴う蛍光イメージングが可能であることを実証した。これらの結果は、生命科学、医学の発展に貢献すると期待される。その成果は、学術的に新しい知見を見出していると判断され、審査委員一同は、本論文が博士(工学)の学位論文として価値あるものと認めた。