

O2-4

カーボンナノチューブ電極を用いた神経伝達物質のリアルタイム細胞外記録法の開発

Development of carbon nanotube microelectrode array for
real-time extracellular recording of neurotransmitter

○福田真生 鈴木郁郎 後藤正男

東京工科大学大学院バイオ・情報メディア研究科バイオニクス専攻

Mao Fukuda Ikurou Suzuki Masao Gotoh

Department of Bionics, Graduate School of bionics, computer and media science

Tokyo University of Technology

Abstract: We have developed the carbon nanotube (CNT) microelectrode array. A 64 planner electrodes was fabricated by etching an indium-tin oxide (ITO) layer deposited on glass slide, and covered with insulating film. The surface of recording terminals was formed by etching insulating film to 50 μ m in diameter and was then coated with single-wall CNT and multi-wall CNT by electroplating. Using this CNT microelectrode array, we successfully detected their response to 10nM dopamine, acetylcholine, and glutamic acid. This demonstrated the potential for real-time recording method of the neurotransmitter released from neurons.

Key Words: carbon nanotube, microelectrode, neurotransmitter

はじめに

集積化平面多電極アレイ基板を用いた細胞電位計測技術は35年の歴史があり、多点同時計測できる点と長期計測できる点から広く使われてきた。しかしながら、電極表面の素材は開発当初の白金黒電極が現在も主流であり、時代と共に改善されてきたわけではない。そのため、計測できる量および計測感度の向上は頭打ちとなり、神経活動記録においてはシナプス電流記録や神経伝達物質の測定に至っていない。そこで本研究では、平面多電極アレイ基板を用いた神経伝達物質のリアルタイム計測の実現を目指し、カーボンナノチューブ多電極アレイチップの開発を目的とした。

方法

・カーボンナノチューブ多電極アレイ基板の開発

単層カーボンナノチューブ(SWCNT)、多層カーボンナノチューブ(MWCNT)を用いて溶媒中に分散させた。平面多電極アレイ基板(アルファメッドサイエンティフィック社)のITO電極上にCNT分散液を滴下し、電圧を印加することによってメッキした。

・電気化学測定

作成したカーボンナノチューブ電極の神経伝達物質計測は電気化学アナライザーを用いたサイクリックボルタメトリー法により調べた。CNT電極を作用電極、塩化銀線を参照電極、白金線を対向電極として使い、溶媒はリン酸緩衝液(pH7.41)を使用した。図1に電気化学測定の測定条件を示す。



図1 神経伝達物質の電気化学測定

・細胞計測

作成したCNT電極上にRat海馬神経細胞を培養しMED64システム(アルファメッドサイエンティフィック社)を使用して細胞計測を行った。

結果

・CNT メッキ電極の電子顕微鏡観察

単層カーボンナノチューブ、多層カーボンナノチューブ共に電着法により ITO 電極上にメッキすることに成功した。図 2 は作製した単層カーボンナノチューブ電極の位相差像と電子顕微鏡画像であり、約 100nm の粒状の凝集体が形成されていることがわかった。図 3 は作製した多層カーボンナノチューブ電極の位相差像と電子顕微鏡画像であり、単層カーボンナノチューブと同様に約 100nm の凝集体を形成しているが、チューブ状の物も残留していた。これはメッキ条件に依存してくるものと推測された。

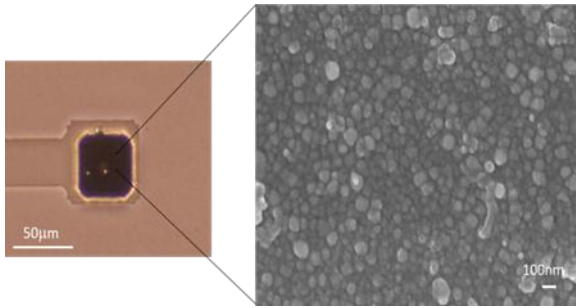


図 2 単層カーボンナノチューブ電極

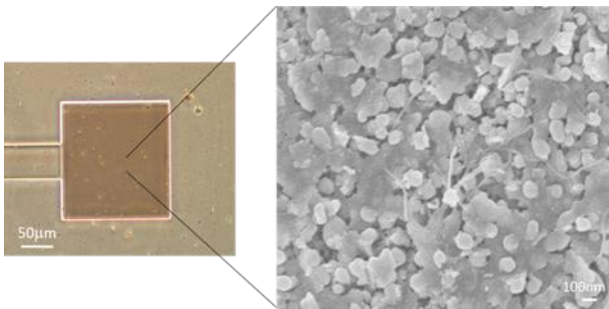


図 3 多層カーボンナノチューブ(竹型)電極

・神経伝達物質計測

図 4 はカーボンナノチューブ電極のドーパミン 10nM によるサイクリックボルタンメトリーの結果を示している。単層カーボンナノチューブは 0.4V 付近、多層カーボンナノチューブは 0.15V 付近にドーパミンに対する酸化ピークが観察された。従来の白金黒電極では酸化ピークが確認できなかったため、作製した微小カーボンナノチューブ電極は神経伝達物質に対して優れた電気化学特性を持つことがわかった。

・CNT 電極を用いた細胞計測

図 5 はカーボンナノチューブ電極上に Rat 海馬神経細胞を培養した写真である。従来の白金黒電極では、倒立顕微鏡下で培養した細胞が可視できなかったが、カーボンナノチューブ電極ではその薄さゆえに細胞が可視化されていることがわかる。図 6 はカーボンナノチューブ電極上に 7 日間培養した Rat 海馬神経細胞より活動電位を計測した結果である。ノイズレベルは 5µV と非常に低ノイズであり、20µV 程度の微弱信号を検出することに成功した。

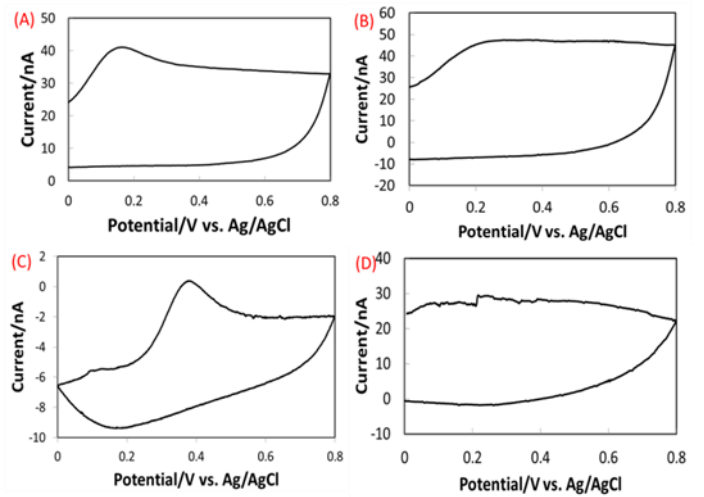


図 4 10nM ドーパミンの CV 測定
(A)MWCNT(竹型)200µm DA10nM (B)MWCNT(竹型)200µm PB
(C)SWCNT50µm DA10nM (D)SWCNT50µm PB

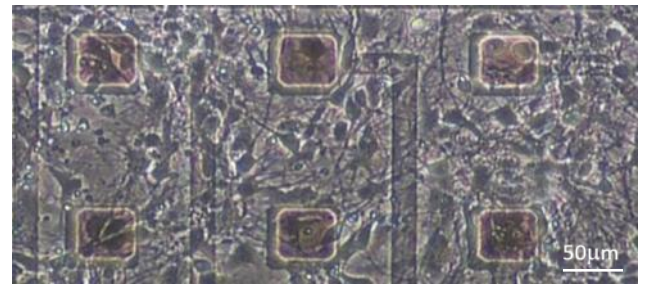


図 5 CNT 電極上の細胞培養

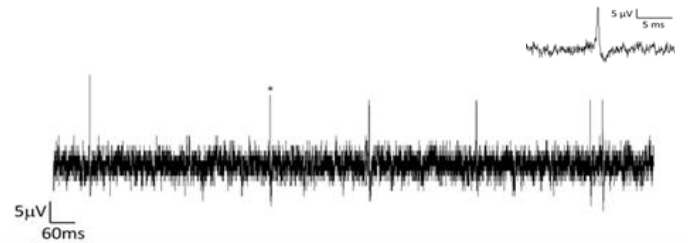


図 6 培養 7 日目 Rat 海馬神経細胞の活動波形

・まとめ

本研究では微小カーボンナノチューブ電極の作製とこれを用いた細胞から放出される濃度での神経伝達物質の計測に成功した。これらの結果は、in vitro で長期間に渡り神経伝達物質の放出量を同時多点にリアルタイム測定できる可能性を示唆している。今後、実際に細胞培養下での神経伝達物質の測定を行う予定である。