

補助事業番号 2024M-526

補助事業名 2024年度 自転車等機械振興補助事業

補助事業者名 ヒト由来神経ネットワークのマルチ機能検出インターフェース技術の開発

## 1 研究の概要

中枢神経系疾患や、神経伝達物質の異常放出によって引き起こされる複雑な副作用が広く報告されている。もし神経伝達物質の放出と電場電位（FP）をリアルタイムで同時測定できれば、神経伝達物質放出の変化と電気活動変化との関係を捉えることが可能となる。本研究では、主要な神経伝達物質であるグルタミン酸を数nMから数百nMという高感度で検出可能な酵素修飾CNT-MEAおよびFPと電気化学計測を同時に測定可能な新規MEAシステムを開発した。開発した酵素修飾CNT-MEAおよび同時計測システムを用いて、海馬脳スライスから細胞外電位とグルタミン酸放出を同時記録し、カフェイン投与によるオシレーションの増加およびグルタミン酸放出の時間変化を検出した。さらに、本システムを用いて脳スライスからのドーパミン放出の記録にも成功した。細胞外電位、グルタミン酸放出、およびドーパミン放出を同時測定可能な本酵素修飾CNT-MEAとデュアル計測システムは、脳回路の動作原理解明、疾患脳の理解、さらには化合物評価に貢献すると考えられる。

## 2 研究の目的と背景

高齢化に伴い、認知症、パーキンソン病、うつ病、てんかんなどの脳神経疾患患者が増加しており、治療薬開発が喫緊の課題となっている。これらの疾患では、神経伝達物質グルタミン酸（Glu）の放出異常が共通して関与している。GluはNMDA受容体を介して学習・記憶に重要な役割を果たす一方、過剰放出は興奮毒性を引き起こし、アルツハイマー病や統合失調症、てんかん発作の発症に関与するとされる。そのため、Glu放出計測は病態解明や創薬評価に有効である。近年、NAMsに基づくin vitro評価の需要が高まっており、リアルタイムかつ非侵襲的なGlu計測法が求められている。従来法にはHPLC、蛍光標識法、電気化学（EC）法があるが、神経活動との同時計測には課題があった。そこで本研究では、微小電極アレイ（MEA）を用いて電場電位（FP）とGlu放出を同時にリアルタイム測定可能なEC/FP dual systemを構築し、酵素修飾型カーボンナノチューブ（CNT）MEAチップの開発により、海馬脳スライスにおいてFPとGlu放出の同時計測の実現を目的とした。

## 3 研究内容

### （1）酵素修飾型CNT-MEAの作製

FPを計測するMEAの電極表面は、インピーダンスを減少させる為に、白金黒が使用されているが、神経伝達物質のECにおいて高感度検出可能なカーボンナノチューブ(CNT)をITO電極表面に電解めっきした。Fig.1Aは、64電極のMEAプローブの全体像とメッキ前後の位相差像を示している。(Fig.1A)メッキ後の電極表面を走査型電子顕微鏡観察した結果、メッキされたCNTが管状の形状を保持してメッキされていることが明らかになっ

た。(Fig.1B) 表面積の増大により、電気化学反応の感度上昇とインピーダンスを減少させる効果も併せ持つ電極が作製できた。メッキによる電極の電気化学応答の差を比較するために FP 10 mM に対する CV 計測の応答電流を評価した。メッキ無しの IT0 電極に比べ、明らかな還元電流が観察され、微小電極特有のシグモイド型の CV 曲線を示した。0.337 V で Peak 電流値 36.9 nA を記録し、電流密度 1.48 nA /cm<sup>2</sup> であり、高感度電気化学特性を有していることが確認された (Fig. 1C)。

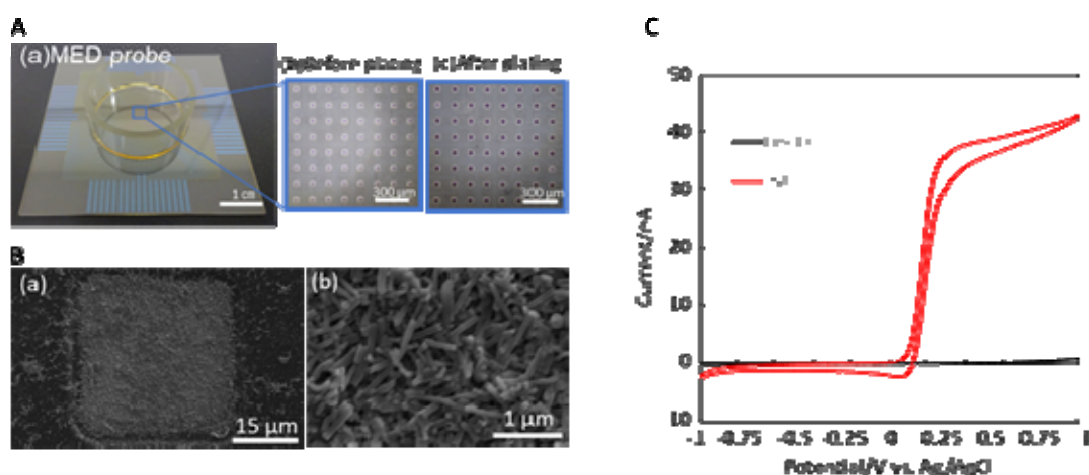


Fig.1 CNT-MEA チップと電気化学特性

(A) (a) 64 電極 MEA プローブの全体像。Scale bar = 1 cm。 (b) CNT メッキの前の 64 電極の位相差像。 (c) CNT メッキ後。Scale bar = 300 μm。 (B) CNT-微小電極表面の走査型電子顕微鏡画像。 (a) Scale bar = 15 μm。 (b) Scale bar = 1 μm。 (C) FP 10 mM での CV 測定結果(黒 ; メッキ前電極、赤 ; CNT-MEA)

## (2) EC/FP dual system の開発

CNT-MEA チップを用いて FP 記録と GA を同時計測できる計測システムを開発した (Fig. 2A (a))。 CNT-MEA チップはヒーター (MED 温度制御パッド (MED-CPB02)) の上に設置し、MEA コネクタ (MAD-C03) を介して信号は MEA64 system に入力され、PC へ出力される。対極は MEA プローブ内の液体につけた白金線とした。 Fig. 2A (b) は、FP と Glu の電気化学測定を同時計測するための装置を示している。 FP を測定できる MED64 system をカスタマイズして EC するための回路を追加し、64 電極のうち選択した 1 電極で電気化学測定し、その他の 63 電極で FP を測定する。電気化学用電極で測定した電流値と近傍で選択した FP 測定用電極のデータは MIO に入力され、電気化学用電極以外の 63 電極のデータは、MED64 system に入力され入力されるシステムとなっている。この同時計測システムにより FP と Glu 反応電流値のリアルタイム同時計測を可能にした。また、CNT-MEA 表面に Glu を測定できるようにするための酵素 (Glu-Ox、Os-HRP) と架橋剤として GA を修飾した。(Fig. 2B (a)) Glu の測定原理は Glu-Ox で Glu を α-ケトグルタル酸に変化させるときに生成される H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 素を利用する。生成された H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> が Os-HRP と反応することによって電極に流れる電流値を計測する。(Fig. 2B (b)) 開発した FP と EC EC/FP dual system が正常に稼働し、生体試料からの同時計測が可能であることを確かめる為に、Glu 100 nM を 100 秒毎に添加して、FP 記録における

電位変化および EC 記録における CA 計測の電流値を評価した。EC 記録電極では、Glu100 nM 滴下後に還元電流が滴下毎に観察された。一方、細胞外記録用電極では液体添加のアーチファクトのみで、電位の変動は観察されなかった。このことから、酵素修飾型 CNT 電極は Glu に反応するとともに、電気化学反応は FP に影響を及ぼさないことが確かめられた。(Fig. 2C)

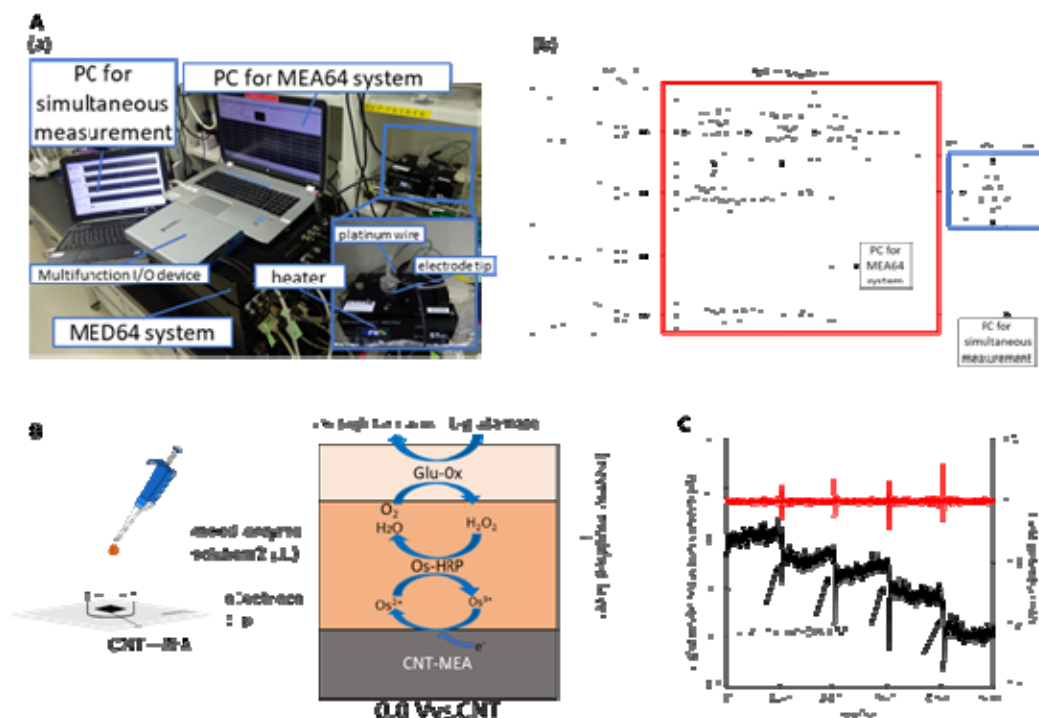


Fig. 2 EC/FP dual system

(A) (a) EC/FP dual system での測定の構成。(b) EC/FP dual system の回路図。赤枠内が MED64system の回路、青枠内は MIO の回路。(B) 酵素修飾型 CNT-MEA 作製の概念図(左)。酵素修飾型 CNT 電極における Glu 反応の図解。(C) 100 nM L-Glu の累積投与における CA と FP の同時測定。電圧 0V で 100 秒毎に Glu を投与した。赤 : FP 黒 : CA

### (3) 酵素修飾型 CNT-MEA における H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> に対する電気化学反応

Os-HRP が H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> を用量依存的に検出しているか確かめるために、H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> の用量依存性と検出限界を確認した aCSF を入れた MEA プローブに H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 10 nM を順次滴下し、その時の電流値の変化を測定した。H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 濃度が上昇するにつれて電流値が段階的に変化した。(Fig. 3A) H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 10 nM の反応は、0.207 pA/nM (n = 3) の感度で線形性が認められた (R<sup>2</sup> = 0.996, Fig. 3B)。100 pM を順次滴下したときも H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 濃度が上昇するにつれて電流値が段階的に変化した。(Fig. 3C) H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 100 pM の反応は 14.4 fA/nM で線形性が認められた。(R<sup>2</sup> = 0.994, Fig. 3D) 10 nM レベルで H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> を計測できたことから、Glu の放出量を計測できる H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 反応性を有している

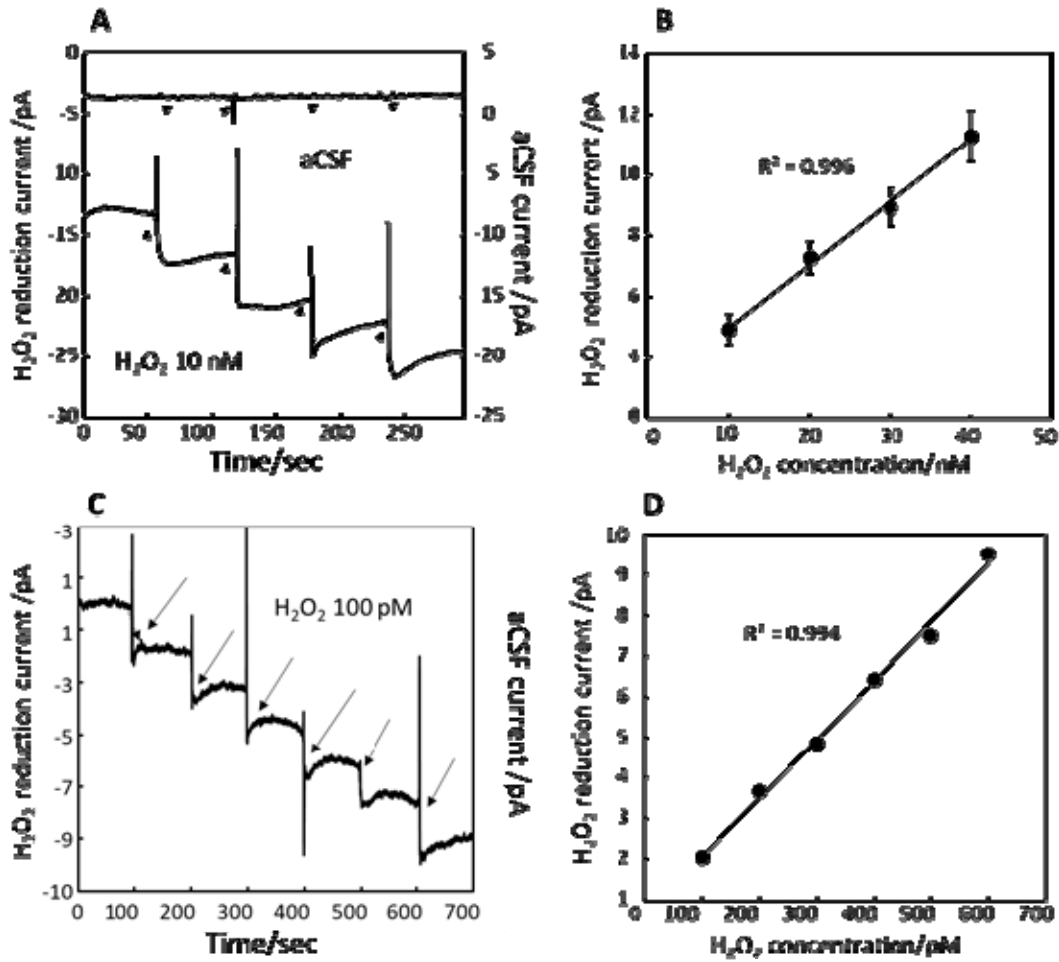


Fig. 3 酵素修飾型 CNT-MEA における H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> の CA

(A) 10 nM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> の累積投与における電流値変化。矢印は投与タイミングを示している。(B) 10 nM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> の用量依存性。(n = 3) (C) 100 pM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> の累積投与における電流値変化。(D) 100 pM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> の用量依存性。

#### (4) 酵素修飾型 CNT 電極における Glu に対する電気化学反応

作製した酵素就職 CNT 電極における Glu 検出感度を調べる為に、用量依存性と検出限界を確認した。Glu の脳室内濃度は 0.5~2 μM であるため[16]、100 nM レベルでの用量依存性を測定した。aCSF を入れた電極プローブに Glu を 100 秒毎に滴下した結果、電流値が段階的に変化した (Fig. 4A)。一方、Glu 無しの溶媒添加では変化が認められなかった。Glu 100 nM の反応電流値の平均勾配は 4.48 fA/nM (n = 3) で線形性が認められた (R<sup>2</sup> = 0.999, Fig. 4B)。Fig. 4D は、Glu 1 nM を順次投与した際の結果を示しており、0.232 pA/nM (n = 4) の感度で線形性が認められた。(R<sup>2</sup> = 0.955, Fig. 4D) 数 nM から数 100 nM で Glu 放出を検出できたことから、神経細胞を使用した測定においても、Glu を検出できる感度を有していることがわかった。

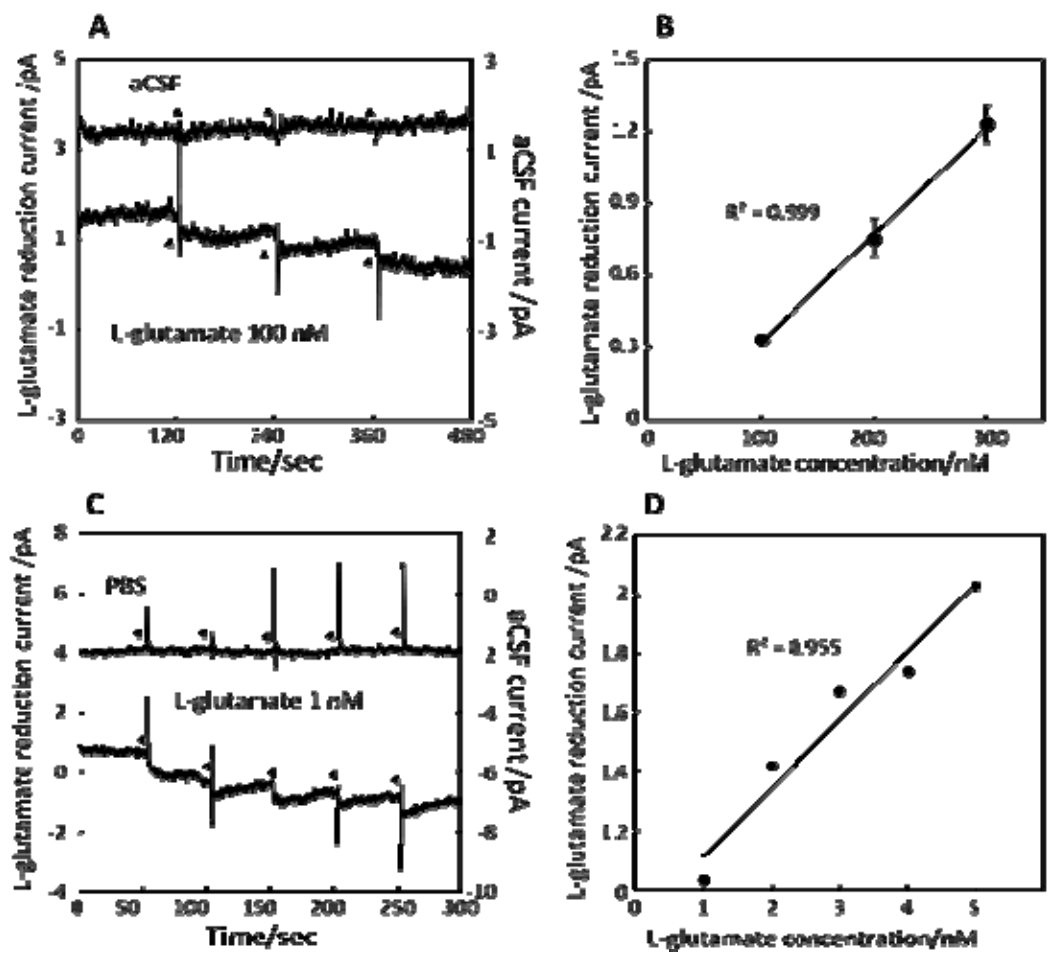


Fig. 4 酵素修飾型 CNT-MEA における Glu の CA  
 (A) 100 nM Glu の累積投与における電流値変化。矢印は投与タイミングを示している。(B) 100 nM Glu の用量依存性 ( $n = 3$ )。 (C) 1 nM Glu の累積投与における電流値変化。(D) 1 nM Glu の用量依存性。

#### (5) 干渉物質、DA、Glu に対する電気化学反応

神経組織から放出される物質は多く存在する為、酵素修飾型電極で得られた電流値が Glu であるかを確かめるために、干渉物質の影響を調べた。Fig. 5 に示すように、溶媒である aCSF 添加時、および神経伝達物質である GABA 10  $\mu\text{M}$  では電流値の変化は観察されなかった。続いて、DA 100 nM を投与したところ 4.50 pA の電流値上昇が観察された。酵素に関係なく、DA に対して反応することが確認できた。また、プラス向きの酸化電流であり、Glu の還元電流とは異なる為、区別できることがわかった。続いて、脳内で放出される干渉物質である尿酸 10  $\mu\text{M}$  の投与、化合物を溶解する際に使用される DMSO 0.1% の投与、CFF 200  $\mu\text{M}$  の投与においても電流値変化は認められなかった。Glu 10  $\mu\text{M}$  を投与すると、投与に伴い、還元電流が観察された。このことから、作製した酵素修飾型 CNT 電極は Glu と DA を特異的に検出でき、阻害物質の影響を受けないことがわかった。

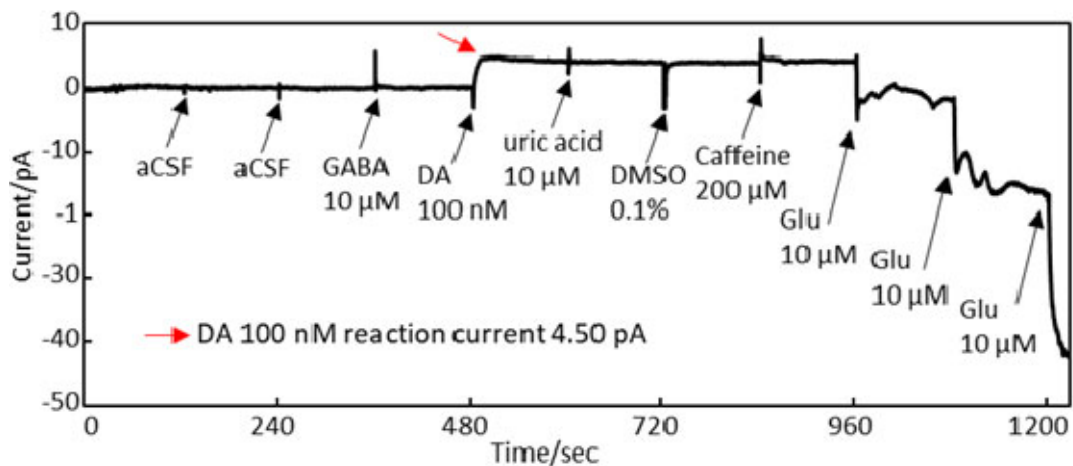


Fig. 5 干渉物質、DA、Glu の応答評価

aCSF、GABA10  $\mu$ M、DA 100 nM、尿酸 10  $\mu$ M、0.1% DMSO、CFF 200  $\mu$ M) および Glu の累積投与に CA 測定。

#### (6) 急性脳スライスでの FP と Glu の同時計測

マウス急性脳スライスでの薬剤応答を測定した (Fig. 6A)。Fig. 6B と 6C は、CFF 投与前後の FP 波形と Glu 検出の電気化学波形を示す。FP で検出した海馬神経ネットワークのオシレーション (OSC) 活動数は、CFF 200  $\mu$ M 投与により、150 秒間で 21 回から 41 回に上昇した (Fig. 6D)。Fig. 6B と C で示す電流値 (青) のとげ状の信号は、FP で得られた神経活動の影響が電流値に反映されていることを示している。Glu の応答は Slow wave として検出される。Glu の還元電流値の算出方法として、電流値に反映された OSC によるノイズを除いて平滑化し、0 pA 以下の面積を反応電荷量として求めた。CFF 投与前の Glu 放出による電流値の変化は  $25.6 \pm 10.2$  秒間 ( $n = 3$ ) にわたって観察され、CFF 投与後は 56.9 秒間 ( $n = 1$ ) にわたって観察された。150 秒間の Glu 放出による反応電荷量は CFF 投与前を基準とした場合、2.07 倍の反応電荷量となった (Fig. 6E)。これらの結果より、CFF 投与前後の神経活動の変化と神経伝達物質放出変化の同時計測を実現した。FP の OSC が認められても、Glu 放出による電流値に変化がない場合が認められた。神経回路の発火パターンの違いによって検出されるか否かが決まっているのではないかと仮説を立て、Fig. 6B の (a)~(f) の OSC について 63 電極で得られた電位波形から発火パターンを分析した。得られた電位波形の絶対値を取得し、63 電極についてヒートマップを作製した (Fig. 6F)。その結果、電流値の変化がなかった OSC (a)~(b) のヒートマップは 3 回とも同様であり、電流値の変化があった OSC (d)~(f) の絶対値のヒートマップは 3 回とも同様だった。この結果から、Glu の電流値が観察されるか否かは発火パターンの違いによることが示唆された。

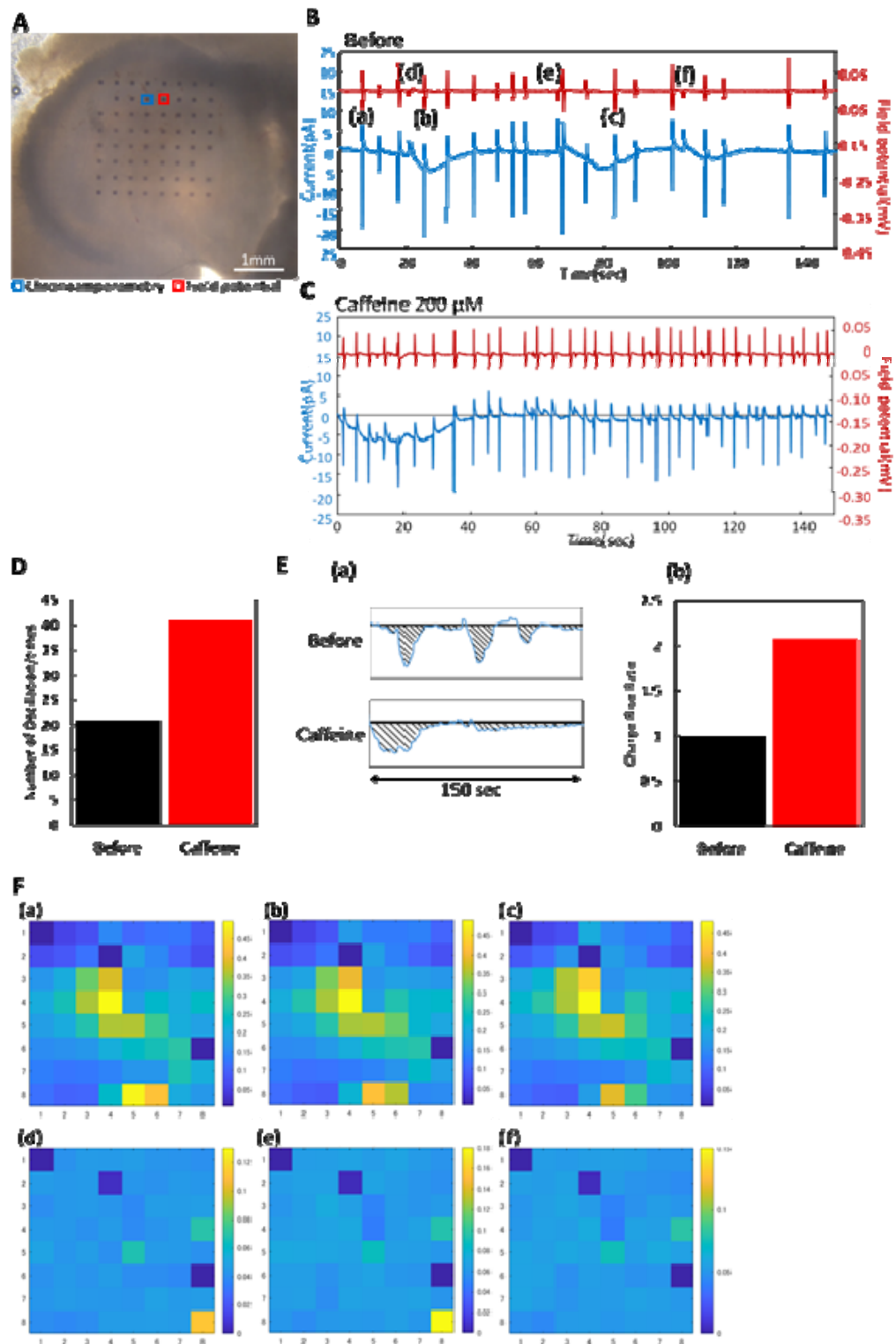


Fig. 6 急性脳スライスでのFPとGluの同時計測

(A)測定したマウス脳スライスの写真。赤：FP 測定用電極。青は：Glu の反応電流測定用電極。(B)Low-Mg aCSF 灌流時のFP(赤)とGlu 反応電流(青)の同時計測。(C)CFF 200 nM 投与時のFP(赤)とGlu 反応電流(青)の同時計測。(D)FP 記録で得られた神経活動のOSC 回

数比較。(E) (a) 反応電荷量算出の概念図。(b) Gluの反応電荷量の比較。(F) FPのOSC (a)~(g)における電位振幅の絶対値をマッピングした63電極のヒートマップ。

### (7) 急性脳スライスでのFPとDAの同時計測

開発した酵素修飾型CNT電極により、脳スライスからもDAが計測されることが確かめられた。Fig. 7Aは、DAが計測された電極と海馬スライスの構造を示している。CA2-CA3間において、FP波形(Fig. 7B 赤の波形)で検出されたOSCのタイミング(204秒)と無関係に、EC波形(Fig. 7B 青の波形)に上向きのOSCが300秒間で9回観察された。例えば、9回あるOSCの内、195.1秒から208.4秒の反応は13.3秒間反応していた。Fig. 7Bの(a)の電流値のピークは19.8 pAだった。Fig. 5で示したようにDAはプラスの電流値として計測される。また我々が以前報告した脳スライスからDA放出を記録した波形と一致していた。

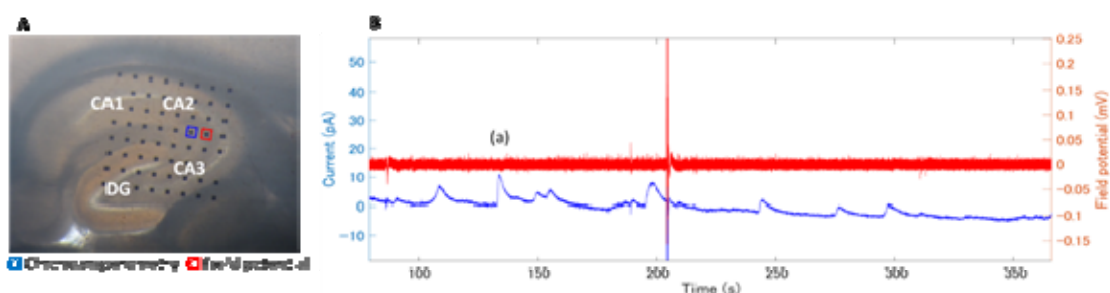


Fig. 7 急性脳スライスでのFPとDA同時計測

- (A) 測定したマウス脳スライスの写真。赤：FP測定用電極、青：DAの反応電流測定用電極。  
(B) 急性脳スライスでの4-AP投与時のFP(赤)とDA反応電流値(青)同時計測。

本研究では、開発した酵素修飾型CNT-MEAとEC/FP dual systemを用いて、海馬脳スライスからのFPとglu放出の同時記録およびカフェインの作用を検出し、DAの放出も記録した。神経活動(FP)、glu、DAの同時計測を可能にした本研究成果は、脳回路の動作原理、疾患脳の理解、化合物評価に貢献するものと考えられる。

### 4 本研究が実社会にどう活かされるか—展望

本技術は、神経活動に伴い放出される神経伝達物質を神経活動と同時かつリアルタイムで非侵襲計測できる技術であることから、神経活動変化のメカニズムを神経伝達物質の放出量変化から説明可能な評価系となる。脳スライスだけではなく、ヒト脳オルガノイドをはじめとするヒト神経モデルへの応用が可能であり、神経疾患の解明や創薬分野における薬効や安全性評価への応用が期待される。

### 5 教歴・研究歴の流れにおける今回研究の位置づけ

平面微小電極アレイによる細胞の電気活動計測の歴史は、50年以上であるが、神経伝達物質と電気活動を同時計測できるシステムの開発および脳スライスからの同時計測に成功した初の研究成果である。

6 本研究にかかわる知財・発表論文等

Hasegawa A, Matsuda N, Suzuki I. Development of a microelectrode array system for simultaneous measurement of field potential and glutamate release in brain slices. *Biosens Bioelectron.* 2025 Nov 1;287:117696.

7 補助事業に係る成果物

(1)補助事業により作成したもの

なし

(2)(1)以外で当事業において作成したもの

なし

8 事業内容についての問い合わせ先

所属機関名： 東北工業大学工学部(トウホクコウギョウダイガクコウガクブ)

住 所： 〒982-8577

宮城県仙台市太白区八木山香澄町35-1

担 当 者： 教授 鈴木郁郎(スズキイクロウ)

担 当 部 署： 鈴木研究室(スズキケンキュウシツ)

E - m a i l: i-suzuki@tohtech.ac.jp

U R L: <https://www.tohtech.ac.jp/dept/teacher/elc/elc2/i-suzuki/>