

博士論文

神経伝達物質の動態観察に向けた 柔軟型グルタミン酸センサの開発

小竹 直樹

目次

第 1 章 序論	1
1.1 はじめに.....	1
1.2 グルタミン酸の動態観察の必要性.....	2
1.3 脳内グルタミン酸の観察手法とその問題点.....	2
1.3.1 マイクロダイアリシス.....	2
1.3.2 グルタミン酸センサ.....	4
1.4 神経電極開発の変遷.....	10
1.5 柔軟型センサの必要性.....	15
1.6 本研究の目的.....	16
1.7 本論文の構成.....	16
第 2 章 柔軟型センサ基板	17
2.1 柔軟型センサ基板の設計.....	17
2.1.1 要求性能.....	17
2.1.2 基板材料の選定.....	18
2.1.3 センサ基板構造の検討.....	20
2.1.4 センサ基板の設計仕様.....	21
2.2 柔軟型センサ基板の作製.....	22
2.2.1 センサ基板作製に関する要素技術.....	22
2.2.2 柔軟型センサ基板の作製方法.....	24
2.3 柔軟型センサ基板の作製結果と性能検証実験.....	25
2.3.1 性能検証方法.....	25
2.3.2 作製結果と機能検証結果.....	26
2.4 考察.....	27
2.5 まとめ.....	30
第 3 章 柔軟型グルタミン酸センサ	31
3.1 要求性能.....	31
3.2 柔軟型グルタミン酸センサの作製.....	34
3.2.1 グルタミン酸センサに係る要素技術.....	34

3.2.2	センサの作製方法.....	35
3.3	柔軟型グルタミン酸センサの性能検証実験.....	36
3.3.1	センサ性能検証実験概要.....	36
3.3.2	グルタミン酸の測定方法.....	37
3.3.3	センサの性能検証実験結果.....	38
3.4	考察.....	42
3.5	まとめ.....	46
第4章	生体内での柔軟型センサの性能検証.....	47
4.1	急性実験でのセンサ性能の検証.....	47
4.1.1	目的.....	47
4.1.2	実験方法.....	47
4.1.3	結果.....	51
4.2	模擬脳による検証実験.....	55
4.2.1	目的.....	55
4.2.2	実験方法.....	55
4.2.3	結果.....	56
4.3	考察.....	57
4.4	まとめ.....	62
第5章	結論.....	63
	謝辞.....	64
	参考文献.....	65
	研究業績.....	73
	付録 A.....	76
	付録 B.....	78

第 1 章 序論

1.1 はじめに

低侵襲化は生体内留置型センサ全般に共通した課題である。ここで生体内留置型センサとは、生体の情報を取得するために生体内に留置されるセンサを指す。その例としては、グルコースや乳酸、グルタミン酸やドーパミンなどの生体物質を観察対象とした各種バイオセンサの他、神経信号を計測する神経電極も含まれる。また、バイオセンサとは、酵素や抗体などの生体物質を用いて対象物質を特異的に検出するデバイスである。いずれのセンサについても、センサの低侵襲化は、観察対象である生体への負担を軽減する。さらに、センサの低侵襲化は、計測の妨げとなるセンサ周囲の炎症や異物反応を低減し、結果的にセンサの計測の安定化や長寿命化に寄与する。

長期安定かつ連続的に測定できる生体内留置型センサの実現は、患者の身体的負担を軽減すると期待される。その例として糖尿病患者の血糖値管理が挙げられる。体内に留置したセンサで長期間安定的に血糖値を測定できれば、1日に複数回必要な痛みをとまなう指先からの採血が不要となり、採血箇所からの感染リスクも軽減される。さらに、連続的な測定は、食事や運動などの生活動作にとまなう血糖値変化の詳細を明らかにし、その結果は糖尿病に対する迅速かつ適切な対症療法を可能にする。このように生体物質の濃度変化を常時監視するバイオセンサの開発は、患者の生活の質を向上させるのに役立つ。

生体内留置型のバイオセンサの中では、先述した血糖値センサの開発が先行している。糖尿病の患者数は増加の一途をたどり、国際糖尿病連合の発表では2014年にその患者数は世界で3億8670万人と発表されている[1]。その需要の高さから、糖尿病患者の血糖値管理に用いられるバイオセンサの開発は盛んに組み込まれてきた。1962年にClarkらによって報告された世界初のバイオセンサも、その開発動機は生体内留置型の血糖値センサの実現であった[2]。現在では、皮下のグルコースを測定対象としたセンサが持続血糖モニタリングシステムとして臨床応用されている。臨床応用されているセンサの使用期限は未だ7日間程度に限られているものの、研究開発段階にある生体内留置型センサでは、動物の生体内で1年間以上にわたりグルコースの測定に成功した事例が報告されている[3]。

神経伝達物質であるグルタミン酸を観察対象とした脳内留置型バイオセンサの開発は、生体内留置型グルコースセンサの開発に比べて遅れている。例えばセンサの寿命を比較すると、グルコースセンサでは1年間以上の測定に成功しているのに対して、グルタミン酸を対象としたセンサの寿命は、筆者が知る限りRutherfordらが報告した17日間が最長である[4]。脳内留置型のグルタミン酸センサは脳機能の解明に貢献すると考えられるが、より詳細な知見を得るためには、生体の脳内で長期にわたり安定的に測定できるグルタミン

酸センサの開発が必要である。長期安定計測の実現には、低侵襲化が必要であることから、本研究では、低侵襲化に貢献すると期待される柔軟型グルタミン酸センサの開発に取り組む。

1.2 グルタミン酸の動態観察の必要性

グルタミン酸は、脳の機能や脳神経疾患の機序を探る上での観察対象とされてきた。その理由は、思考や学習、記憶などの脳機能が、単一の神経細胞のみの活動で成立しているわけではなく、多数の神経細胞が形成する神経ネットワーク上で神経信号が伝達されることで成立しているためである。神経ネットワーク上の神経信号伝達は電気的な伝達と神経伝達物質を介した伝達で行われる。単一神経細胞内では神経軸索を伝わる活動電位によって神経信号が伝達される。そして神経細胞間では、その大部分はシナプス間隙で生じる神経伝達物質の放出と受容によって神経信号が伝達される。シナプス間隙で放出される神経伝達物質は、その作用別に興奮性と抑制性に大別されるが、興奮性の神経伝達物質であるグルタミン酸は、興奮性の神経信号伝達の大部分に関与し、記憶や学習の機序において重要な役割を果たしている。

脳の神経信号伝達に不可欠なグルタミン酸は、神経細胞死を招く毒にもなりうる。通常、神経細胞外のグルタミン酸濃度は低く保たれているが、何らかの異常をきっかけに神経細胞外のグルタミン酸が高濃度に達すると、周囲の神経細胞は過剰に興奮して細胞死を引き起こす。これは興奮性神経細胞毒性と呼ばれ、例えば、脳外傷時の二次的神経細胞損傷の原因である[5][6]。こうした過剰興奮による神経細胞死は筋萎縮性側索硬化症やアルツハイマー病罹患者の脳内でも認められる現象であることから、これらの神経疾患の機序や治療法を探る手掛かりとしてもグルタミン酸が注目されている[7]。

このようにグルタミン酸は脳の機能のみならず、脳神経疾患にも関与する重要な神経伝達物質である。したがって、脳の機能や脳神経疾患の治療法を探るために、脳内のグルタミン酸の動態観察が必要とされる。

1.3 脳内グルタミン酸の観察手法とその問題点

1.3.1 マイクロダイアリシス

脳内のグルタミン酸の動態観察には従来からマイクロダイアリシス法が用いられてきた。マイクロダイアリシス法は脳内に限らず、生体内の生体物質を観察するために広く用いられてきた測定手法である。測定に用いられるプローブは微細な管の先端に透析膜が配されている。このプローブ内にリンゲル液等を灌流させることで、生体内に留置したプローブ周囲の物質が半透膜を介して回収される（図 1-1）。回収された生体物質を含む灌流液は高

速液体クロマトグラフィや質量分析計で分析され、対象物質の濃度が測定される。グルタミン酸をはじめ脳内の神経伝達物質の濃度もこの手法で測定されてきた。

脳に対するマイクロダイアリシスは1966年 Bito らによって初めて用いられた[8]。その後、1970年代には脳マイクロダイアリシス法として測定手法が確立され、主に神経科学や薬理学の研究分野で普及した。1990年代にはベッドサイドで利用可能な分析装置が市販され、現在では、脳マイクロダイアリシス法は臨床現場でも活用されている[9]。

過去50年にわたり研究や臨床に活用されてきた脳マイクロダイアリシス法は、その測定手法自体も改良されてきた。特に同法の弱点である時間分解能の向上と測定的高速化に注力されてきた。例えば、Wang らはダイアリシスプローブを通過した灌流液を2nlずつに分離し、その微量サンプル毎に分析することで測定的时间分解能を最大2秒にまで向上させた[10]。

先述のように、改良されている脳マイクロダイアリシス法ではあるが、脳内のグルタミン酸を測定するには適当でないと指摘されている。それは時間分解能と空間分解能が十分ではなく、さらにプローブ留置による脳組織の損傷が懸念されているためである。時間分解能については、一部に高い時間分解能を実現した研究はあるものの、基本的なマイクロダイアリシス法的时间分解能は1~20分であり、数秒間で変化するグルタミン酸の動態観察には不向きである。また、マイクロダイアリシス法の空間分解能は半透膜の表面積に依存するが、物質の回収率を確保するには長さ1~4mmの半透膜が必要であるため、空間分解能の向上は望めない。そして、プローブの留置が脳組織へ及ぼす影響も報告されている。脳内にマイクロダイアリシスプローブを留置し40時間灌流した後、周囲の脳組織の状態を光学顕微鏡で観察した Clapp-lilly らの研究では、プローブの周囲1.4mmにわたり脳組織の著しい損傷が生じていた[11]。このように脳内のグルタミン酸の応答を捉えるには、時間的・空間的分解能が十分ではなく、かつプローブ周囲の脳組織に損傷をとまなうことが脳マイクロダイアリシス法の問題点である。

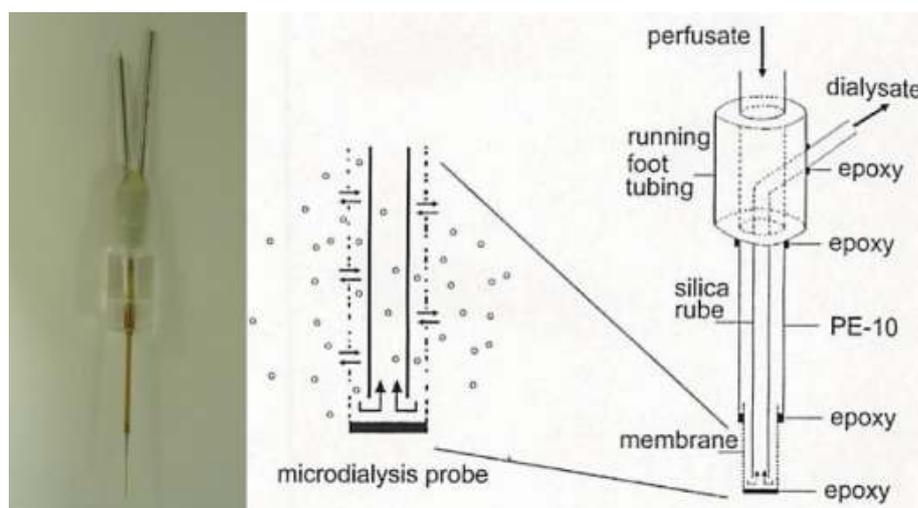


図 1-1： マイクロダイアリシスプローブとその構造図 ([12]から)

1.3.2 グルタミン酸センサ

問題点はあるが、脳マイクロダイアリス法は確立された測定方法として研究や臨床に用いられる。これと平行して、1990年代以降では、脳内のグルタミン酸の新たな測定方法の一つとしてグルタミン酸酸化酵素を用いたバイオセンサの開発研究が報告されている。1990年以降に報告されたグルタミン酸センサに関する主な研究について、そのセンサの特徴を表 1-1 に示す。ここでは報告されたグルタミン酸センサを、センサの種類別に①ワイヤー型センサ、②硬基板型センサ、③柔軟型センサの 3 つに分類し、各分類について概説する。

表 1-1： グルタミン酸センサの先行研究

Year	Author	Electrode	Substrate	Response time (s)	Detection limit (μM)	Sensor type
1994	Hu et al. [13]	Pt-Ir (Single)	—	1.3	2	①Wire
1999	Kulagina et al. [14]	CFE (Single)	—	20~40	1~3	①Wire
2001	Burmeister et al. [15]	Ti/Pt (Multi)	Ceramic	~1	0.98±0.09	②Rigid substrate
2006	Oldenziel et al. [16]	CFE (Single)	—	~8	5	①Wire
2006	Day et al. [17]	Ti/Pt (Multi)	Ceramic	~1	1.82±0.17	②Rigid substrate
2008	Wassum et al. [18]	Cr/Pt (Multi)	Silicon	0.8±0.2	0.79±0.16	②Rigid substrate
2010	Frey et al. [19]	Ta/Pt (Multi)	Silicon	6	0.42	②Rigid substrate
2012	Cao et al. [20]	Au/Cr (Multi)	Polyimide	~2	0.25	③Flexible substrate
2014	Weltin et al. [21]	Ti/Pt (Multi)	Polyimide	4.9±1.9	0.22	③Flexible substrate

CFE: Carbon fiber electrode

①ワイヤー型センサ

グルタミン酸酸化酵素が固定されたワイヤーでグルタミン酸を検出するこの種のセンサは、脳内留置型グルタミン酸センサの中で最も古い世代のセンサである。例えば、Huらは直径 $170\mu\text{m}$ の白金イリジウムワイヤーの周囲にグルタミン酸酸化酵素を固定したセンサを試作し(図1-2)、そのセンサで *in vitro* およびラット脳内のグルタミン酸濃度が測定できることを示した[13]。この他、センサの微小化を図るため、直径 $10\mu\text{m}$ のカーボンワイヤーの周囲にグルタミン酸酸化酵素を固定したセンサで、ラット脳内のグルタミン酸を測定した研究が報告されている[16]。

これらの研究で示されたグルタミン酸センサは時間分解能に優れる。一般的な脳マイクロダイアリシス法の時間分解能が1~20分程度であるのに対し、グルタミン酸センサの反応時間は1~40秒程度である。なお、センサに定電位を印加し、その電流値を記録するアンペロメトリー法を用いた測定では、測定に用いる電気化学分析器のサンプリングレートが時間分解能となる。しかし、これではセンサの性能を反映していない。そこでバイオセンサでは、時間分解能に代わる指標として、ある事象に対するセンサの反応時間が示される。

さらに、ワイヤー型センサの利点は、マイクロダイアリシスプローブよりも小さく作製できる点である。センサの検出部を小さくすることは空間分解能の向上につながる。そして、センサを小さくすることで留置時の脳組織損傷の程度も低減できる[22]。

先行研究は、ワイヤー型センサがマイクロダイアリシス法に比べ時間分解能に優れることを示し、同時に空間分解能も向上できると述べている。一方で、ワイヤー型センサの問題は、センサ作製の再現性が悪い点である。手作業で作製されるワイヤー型センサは、特に多チャンネルのセンサを作製する際の各チャンネルの位置を正確に再現することが困難である。

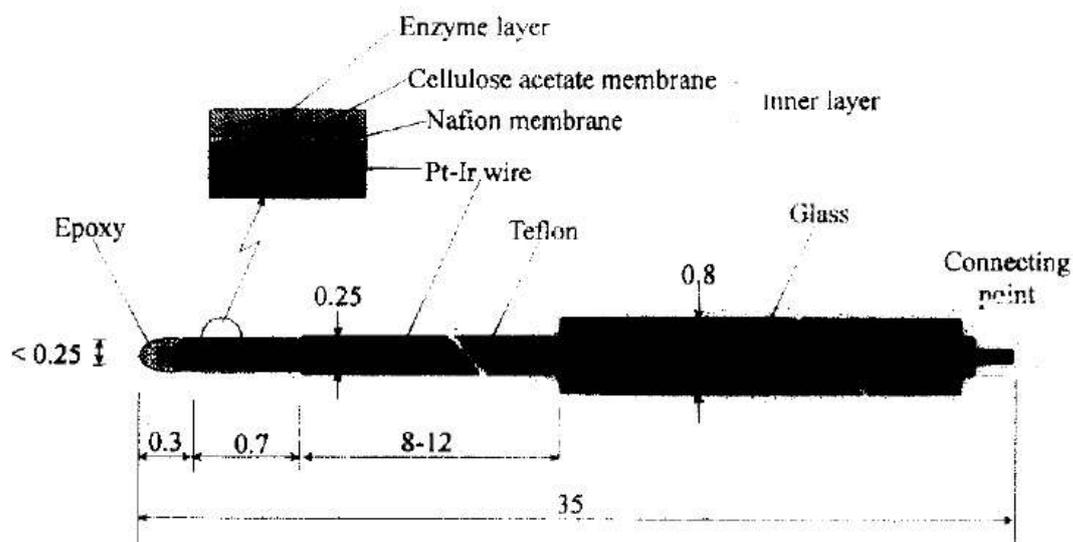


図1-2: ワイヤー型のグルタミン酸センサ概略図 単位はいずれも mm([13]から)

②硬基板型センサ

ワイヤー型センサに次ぐ世代として、シリコンやセラミックをセンサ基板とした硬基板型センサが 2000 年以降に報告されている[15][18][19][23]. その中でも、Gerhaedt らの研究グループは、絶縁性に優れるセラミックを基板として多チャンネルのグルタミン酸センサを開発し (図 1-3) [15][23], その後も、同センサを用いた脳内のグルタミン酸の動態観察結果を続けて報告している[4][17] [24]. 例えば、Rutherford らはラットの脳にセンサを留置し、自由行動下のラット脳内のグルタミン酸濃度を測定した. そして、センサ留置から 17 日後も脳内のグルタミン酸濃度が測定できたと報告している[4]. こうした研究が基盤となり、グルタミン酸センサの開発はワイヤー型から硬基板型センサへと変遷してきた.

硬基板型センサの特徴は、その作製に微細加工技術を用いるため、多チャンネルなどの複雑な形状のセンサを高い精度で均一に作製できる点である. そのため、硬基板型のセンサでは 4 つのチャンネルを 200 μm 間隔で配置したセンサや[23], 測定に用いる作用極、対極、参照極の 3 種類を 1 つの基板上に統合したセンサの開発が進んだ[25]. また、その作製は複数のセンサを同時に作製するバッチプロセスで行われるため、作製の作業効率は高い. これらはいずれも手作業で作製するワイヤー型センサでは実現困難な硬基板型独自の利点である. そして、脳内のグルタミン酸濃度を多チャンネルで測定できるなど、動物実験でも硬基板型センサの優位性を示した.

硬基板型センサの課題は、センサの脳内留置にともなうセンサ周囲の脳組織損傷が懸念される点である. 確かに、マイクロダイアリシスプローブに比べ硬基板型センサのサイズは小さく、留置にともなう組織の侵襲度は低減された[4]. しかし、シリコンやセラミックから作られた硬い基板では、侵襲度の低減が十分ではない. シリコンやセラミックのヤング率は 100~400Gpa であるのに対して、脳神経組織のヤング率は 0.1~6kPa と報告されている. そして、生体の脳は、体動作や呼吸にともない揺れ動く. 硬いセンサと柔らかい脳組織には 10000 倍以上に及ぶヤング率の差があるため、脳内に留置した硬いセンサは脳の揺れ動きに追従できず、結果的にセンサ周囲の脳組織を傷つけると懸念されている[26]. 加えて、シリコンやセラミックは柔軟性に乏しく脆いために、脳内で碎ける危険性も合わせて懸念されている[27]. このように、脳内のグルタミン酸濃度の多チャンネル測定や 17 日間の慢性測定を実現した硬基板型センサではあるが、脳組織に対する低侵襲化と留置時の安全性には課題が残る.

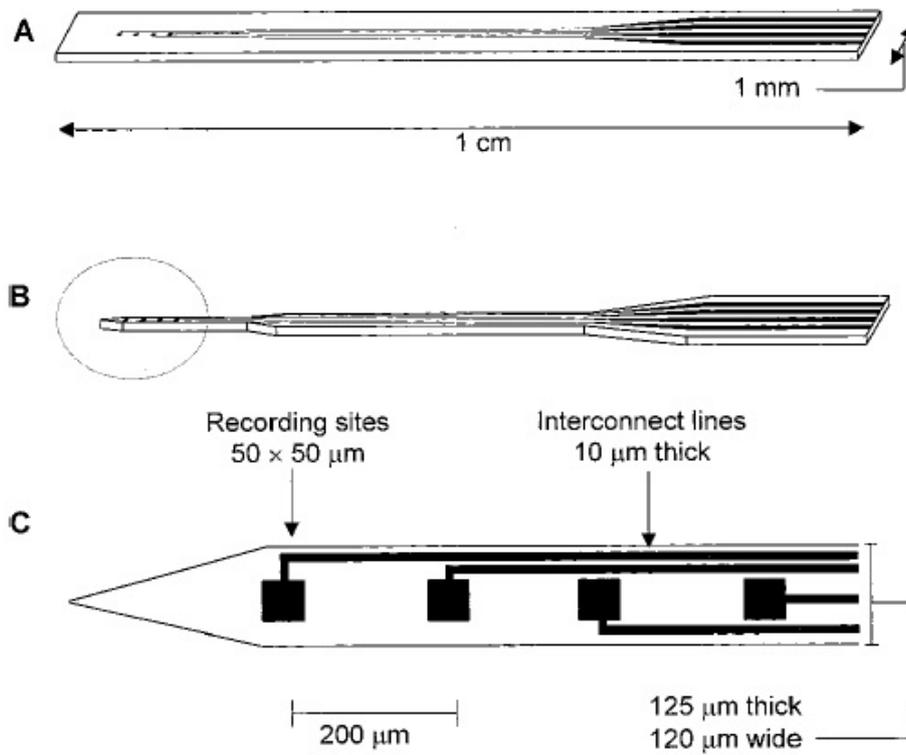
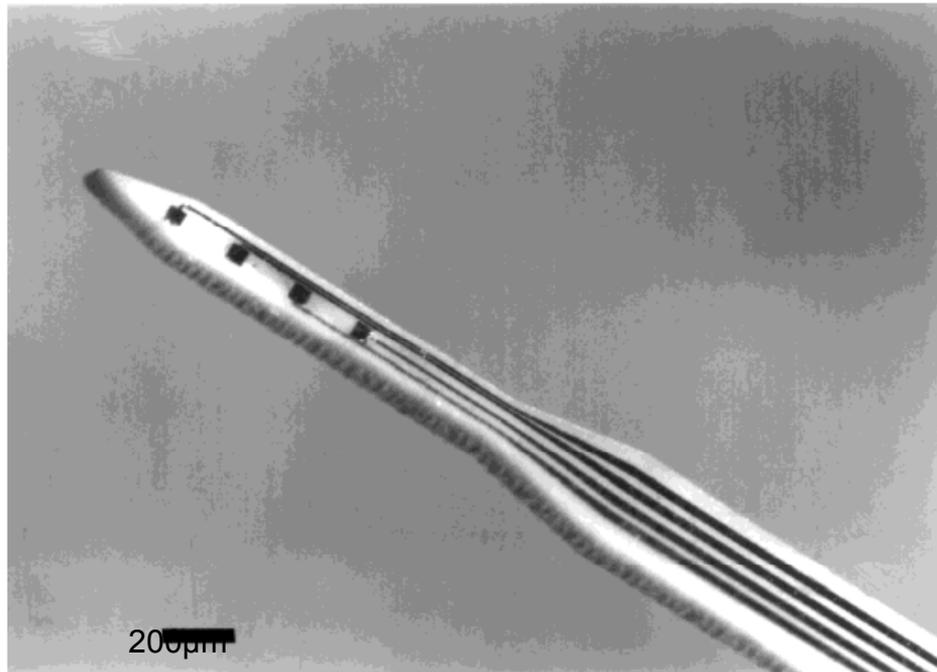
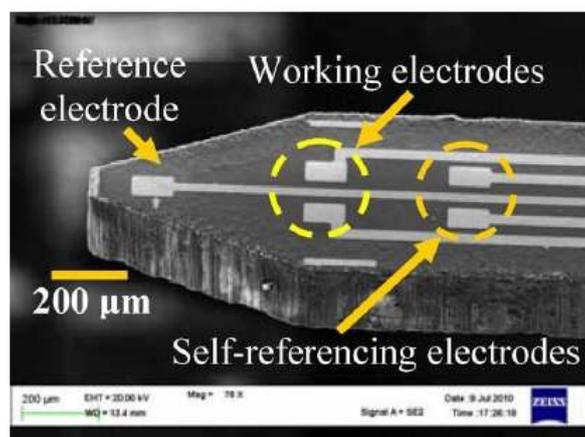


図 1-3 : セラミックを基板とした多チャンネルグルタミン酸センサ ([23]から)

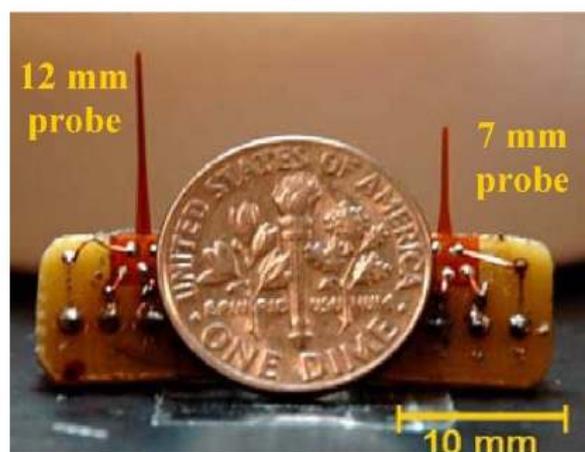
③柔軟型センサ

硬基板型センサでは、脳組織への侵襲度の低減が十分ではないと懸念されている。こうした懸念を受けて2報のみではあるが、柔軟型のグルタミン酸センサが提案されている。1つは、2012年にCaoらが報告したポリイミドを基板とした柔軟型グルタミン酸センサである(図1-4)。麻酔下のラットの脊髄に刺入したこのセンサによって、後肢への機械的な感覚神経刺激に対する脊髄内のグルタミン酸濃度の変化を検出している[20]。他方も、ポリイミドを主な基板に柔軟型センサを作製し(図1-5)、麻酔下のラット脳内でグルタミン酸と乳酸をそれぞれ測定できることを示した[21]。

この2つの先行研究では、センサ留置にともなう脳組織損傷の低減が期待される柔軟型センサを用いて、生体内のグルタミン酸が測定できることを示した。報告されたどちらの研究も、そのセンサの基板にはポリイミドが使用されているが、ポリイミドは比較的吸湿性が高く、慢性留置を目的とするセンサの基板材料として適当ではないとも指摘されている[27][28]。



(a)



(b)

図1-4: Caoらが開発したポリイミド製の柔軟型グルタミン酸センサ([20]から)

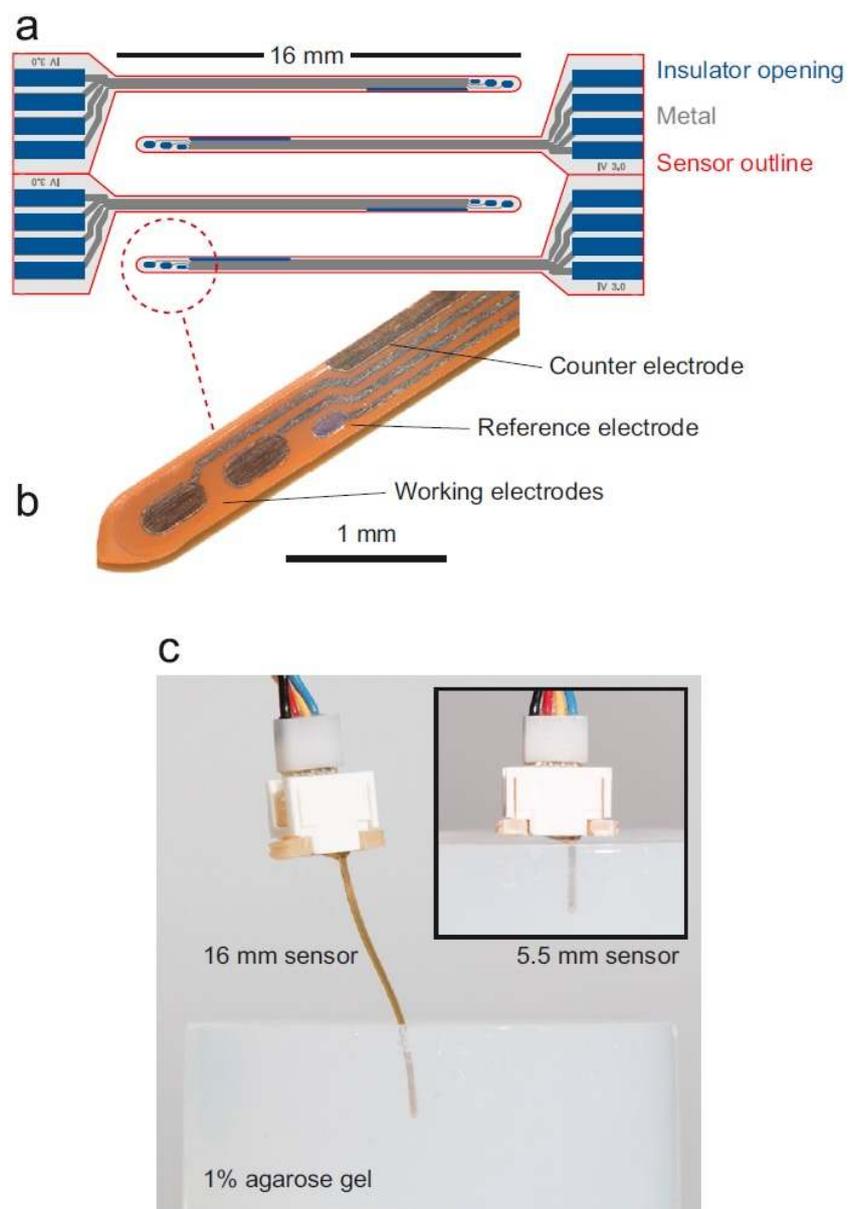


図 1-5 : Weltin らが開発したポリイミド製の柔軟型グルタミン酸センサ ([21]から)

1.4 神経電極開発の変遷

グルタミン酸などの神経伝達物質を測定対象としたバイオセンサの他にも、生体の脳内で神経活動の慢性計測に取り組む研究分野がある。それはブレイン・マシン・インタフェース (BMI) である。BMI とは、生体の脳と外部機器をつなぐ技術を指す。サルから取得した神経信号によって外部機器であるロボットアームを操作した Wessberg らの研究 [29]。さらに、脊髄損傷患者の脳から取得した神経信号によってロボットアームを操作した Hochberg らの研究 [30] が BMI 分野の代表的な研究である。

BMI 研究で用いられる神経電極は、長期安定計測の点でバイオセンサよりも優れ、電極の低侵襲化について先駆的な研究知見がある。そのため、BMI 分野で蓄積された知見は侵襲度の低いグルタミン酸センサを開発する上での参考となる。そこで、本節では BMI 分野で用いられる神経電極に関する先行研究を概観する。

神経電極の開発は、ワイヤー型から硬基板型へ、そして柔軟型へと変遷してきた。この変遷は、前節で述べたグルタミン酸センサ開発の変遷と同様である。つまり、グルタミン酸センサの開発は、同じく脳内での長期安定計測を目的とした神経電極の開発を参考に進められてきたとみられる。神経電極の3つの型について、以下にその特徴をまとめる。

①ワイヤー型神経電極

ワイヤー型の神経電極は、先端を除き周囲を絶縁被覆した金属ワイヤーから構成される。1本のワイヤーのみならず、多チャンネル同時計測を実現するために4本のワイヤーを束にしたテトラード電極や、均等な間隔をもって複数のワイヤーをアレイ状に配置した多チャンネル神経電極を作製し(図1-6)、複数の神経細胞の活動を同時に計測している [31]。しかし、これらの神経電極は手作業で作製されるため、高い精度で均一な電極を作製することが困難であった。



図 1-6: ワイヤー型神経電極アレイ ([31]から)

②硬基板型神経電極

ワイヤー型では作製が困難であった多チャンネル神経電極の開発には、次第に微細加工技術が用いられるようになった。作製に微細加工技術を用いた神経電極の中でも、ミシガン大学で開発されたミシガン電極とユタ大学で開発されたユタ電極の2つが広く知られ、現在では研究用に市販されている。ミシガン電極は、1枚の平面基板上に複数の電極を配置することで多チャンネル化が図られている(図1-7) [32]。また、ユタ電極は剣山状の立体的な構造がその特徴である。4mm×4mmの面積の中に100チャンネルの電極が立体的に配置されている(図1-8) [33]。

ミシガン電極やユタ電極に代表される微細加工技術を用いた神経電極は、脳での多チャンネル神経活動計測を実現し、BMI研究を推進する原動力となった。2012年に報告されたHochbergらの研究では、脳に留置したユタ電極が5年後も計測可能で、その電極で計測された神経信号によってロボット手を操作した事例が報告されている[30]。これは、硬基板型神経電極の生体内での計測の長期安定性を示すひとつの結果である。一方、柔らかな脳に対する硬いシリコン製神経電極の留置は、電極周囲の脳組織に損傷を与えると懸念され、その安全性については今なお議論が続いている。

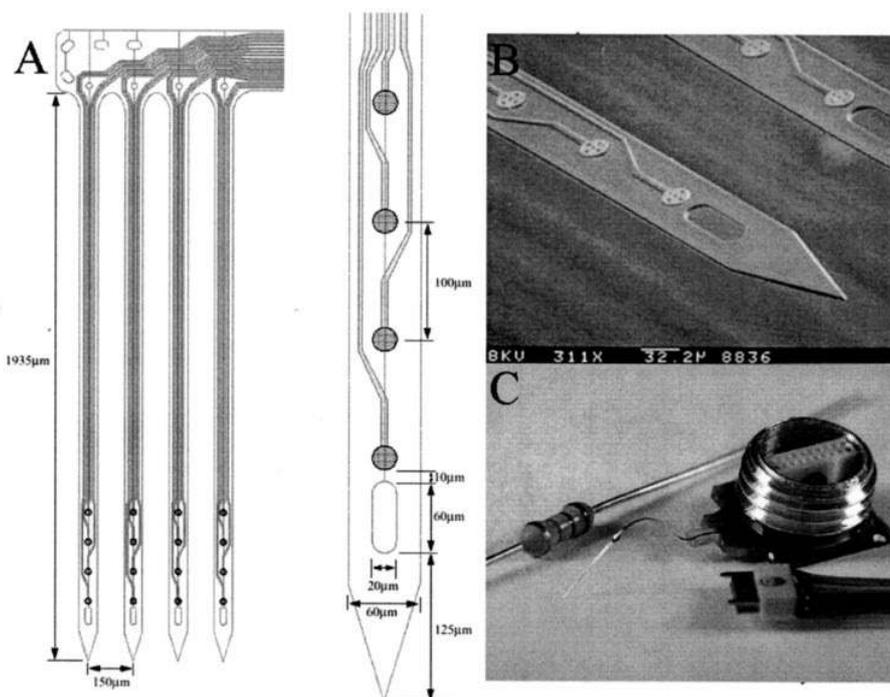


図 1-7 : ミシガン電極 ([32]から)

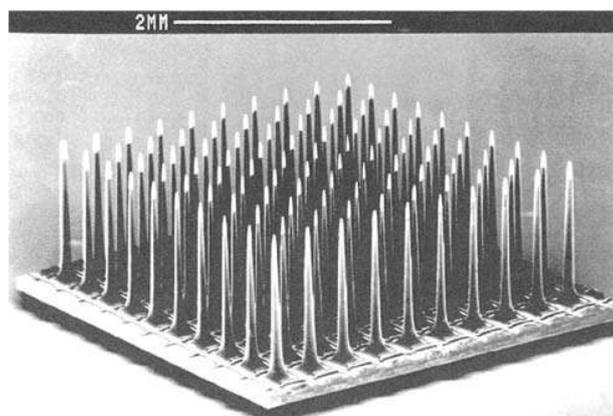


図 1-8： ユタ電極([33]から)

③柔軟型神経電極

柔軟な神経電極の開発は、硬基板型神経電極で懸念される脳組織損傷への対策として進められてきた。例えば、Rousche らはポリイミドを基板とした柔軟型神経電極を用いてラットの脳から神経信号が計測できることを示した(図 1-9) [34]。この他、ポリイミド [35][36][37]、パリレン(図 1-10) [27][26][38]、BCB (Benzocyclobutene) (図 1-11) [28] を基板材料に神経電極の開発が報告されている。

これら各種ポリマーを基板材料とした柔軟型神経電極は、体動作や呼吸にともなう脳の動きに追従できる。そのため、硬基板型の神経電極に比べて電極周囲の脳組織への損傷が低減でき、さらには、留置中に計測位置がずれにくいと考えられてきた[34]。最近になり、柔軟型神経電極が慢性計測に有用であることを明確に示す実験結果が、ようやく報告されはじめた。例えば、Sohal らは、パリレンを基板材料に作製した多チャンネル神経電極(図 1-12)によって、脳内留置後 2 年以上にわたり神経信号が計測できたと報告している[39]。彼らは、まず電極のケーブル部分を正弦曲線状にした。さらに電極先端はポリイミドで被覆した円形状にした。これらの形状が脳内でアンカーとして働き、脳の動きに対する電極の追従性を高めている。電極の形状を工夫し、脳の動きに対して神経電極がずれにくくしたことが、2 年以上にわたる神経信号の計測を可能にしたと彼らは考察している。

このように、柔軟型神経電極が慢性計測に有用である事を示す実験結果が報告されてきているが、こうした研究報告は未だ少なく、この点についての知見の蓄積が必要である。

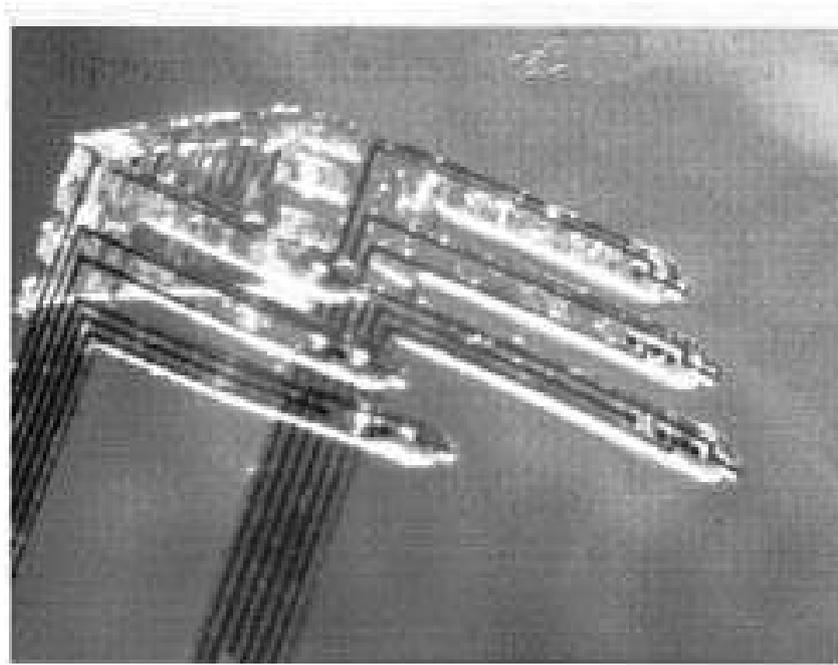


図 1-9 : ポリイミド製柔軟型電極 ([34]から)

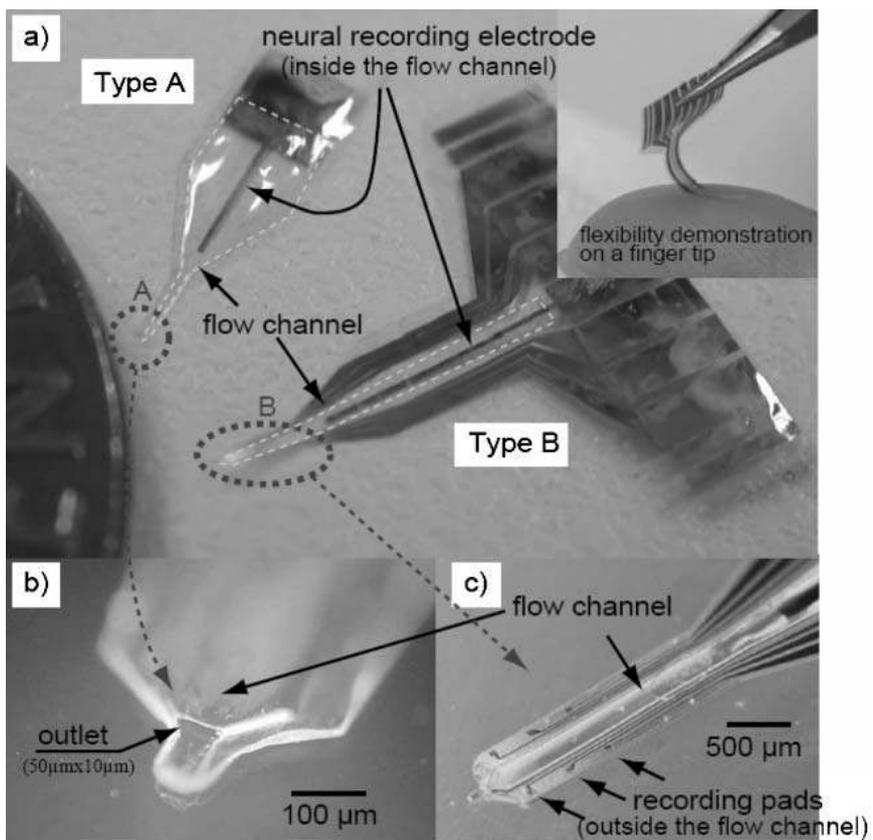


図 1-10 : パリレン製柔軟型電極 ([38]から)

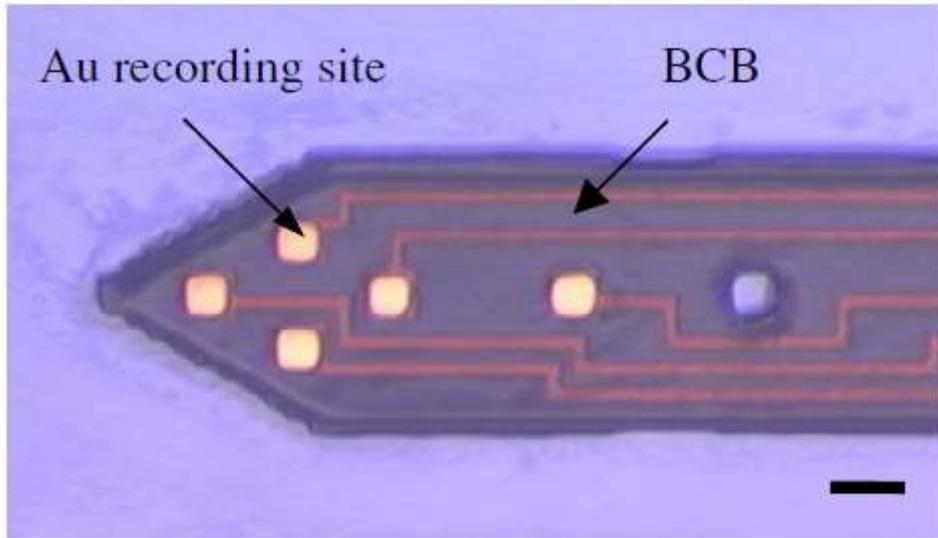


図 1-11 : BCB 製柔軟型電極 ([28]から)

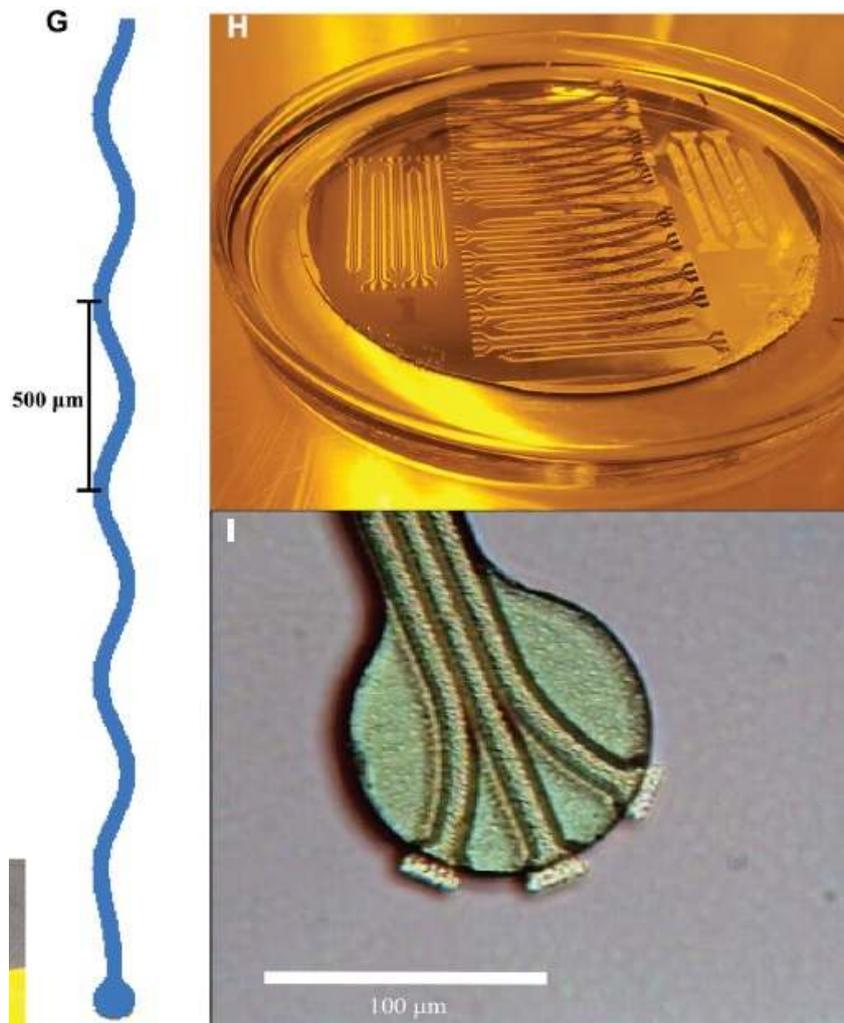


図 1-12 : 正弦曲線状基板を有する柔軟型神経電極 ([39]から)

1.5 柔軟型センサの必要性

本節では、先行研究を踏まえ柔軟型グルタミン酸センサの必要性を検討する。先述のとおり、脳内のグルタミン酸濃度を測定する方法は、脳マイクロダイアリシスからグルタミン酸センサへと変遷してきた。そしてグルタミン酸センサでは、ワイヤー型から硬基板型へと移り変わり、近年では柔軟型センサの開発が始まっている。このグルタミン酸センサの変遷は、低侵襲化の取り組みで先行する神経電極の変遷を参考に進んでいるとみられる。どちらのデバイスもこの変遷の目的は、留置にともなうデバイス周囲の脳組織損傷の低減と慢性計測の実現である。柔軟型のデバイスが低侵襲化と慢性計測の実現に有用であるとの確証を得るには至っていないが、神経電極については、柔軟型の優位性を示唆する研究結果が示されてきている。

柔軟型センサの必要性を考える上で、まずは硬基板型デバイスの研究状況に着目すると、既存の硬基板型神経電極は慢性計測に適さないことが示唆されている。確かに、脳内留置から5年後もユタ電極で神経信号が計測可能であった Hochberg らの研究は、硬基板型神経電極の計測の長期安定性を示す一つの実験結果ではあるが[30]、この結果をもって慢性計測が実現できたとは言えない。それは Hochberg らの過去の報告からも明らかである。彼らは、脳内に留置したユタ電極が10ヶ月後には50%以上のチャンネルで計測不能になったと報告している[40]。彼らの研究のみならず、硬基板型神経電極を用いた慢性計測は20年以上にわたり挑戦されてきたが、未だ慢性計測技術の確立には至っていない[41]。

硬基板型神経電極は生体の異物反応によって計測不能となる。柔軟な脳組織へ硬いデバイスを刺入すると、急性期ではデバイス周囲で生じる炎症によって神経細胞が失われる。さらに、中長期ではミクログリアやアストロサイトがデバイスを覆うことによって、電極インピーダンスが上昇し計測不能に陥ると考えられている[42]。

バイオセンサでも神経電極と同様の理由で慢性測定が不能となる。センサを覆うミクログリアやアストロサイトは測定対象物質がセンサへ拡散するのを妨げる。その結果、センサの検出能力は低下し、長期測定はできなくなる[42][43]。これらの先行研究結果から、神経電極、バイオセンサともに、デバイスの留置にともなう生体の異物反応を低減することが脳内留置型デバイスの長寿命化のひとつの方策であると考えられる。

そこで、柔軟型センサが必要となる。柔軟型デバイスは硬基板型デバイスに比べ留置時の生体の異物反応が軽度であることが示されている。例えば、Subbaroyan らは、柔軟型デバイスと周囲の組織のひずみが小さいことを数理モデルを用いて示し、柔軟型デバイスが慢性計測に有用であると示唆した[44]。さらに、Cheung らは、14日間留置したポリイミド製の柔軟型神経電極の周囲100 μm 以内に、脳組織損傷の指標とされるアストロサイトの発生が認められるものの、シリコン製の硬基板型神経電極留置の場合に比べ、その範囲は限定的であったと報告している[37]。また、柔軟性と形状を特徴とした神経電極で2年間の神経信号計測に成功した Sohal らの研究でも、電極周囲の異物反応はワイヤー電極の場合に

比べ軽度であったと報告している[39]. これらの結果は、柔軟型センサが留置時の低侵襲化に有効であることを示し、ひいては柔軟型センサによる慢性測定の実現可能性を示唆する.

1.6 本研究の目的

本研究の目的は、柔軟型グルタミン酸センサの開発である. 既存のグルタミン酸センサの機能低下の要因は明確ではないが、神経電極やグルコースセンサに関する先行研究結果から推察すると、センサ留置にともなう生体の異物反応がセンサ機能低下の一因である. 柔軟型センサは硬基板型センサに比べ、留置時の生体の異物反応が軽度であり、測定は阻害されにくいと考えられる. そのため、硬基板型から柔軟型へと変遷するグルタミン酸センサ開発の方向性は妥当である. ただし、現在報告されている柔軟型グルタミン酸センサでは生体内での慢性測定は実現されていない. さらに、それらは比較的吸湿性が高いポリイミドを基板材料とし、そのサイズも大きいため、慢性測定の実現性は疑わしい. このように、柔軟型グルタミン酸センサの開発は未だ発展途上にあり、さらなる発展を必要とする.

本研究では、留置にともなうセンサ周囲の脳組織損傷を低減すると期待される柔軟型のグルタミン酸センサを、パリレンを基板材料として作製し、生体の脳内で変化するグルタミン酸の濃度を連続的に観察する.

1.7 本論文の構成

本論文は5章から構成される. 以下に各章の概要を述べる.

第1章では、本研究の背景と関連する先行研究について述べた上で、本研究の目的を述べた.

第2章では、柔軟型グルタミン酸センサの基板について、その設計および作製について述べる. その後、作製した柔軟型基板の機能評価実験からその作製方法と機能性について考察する.

第3章では、2章で作製した柔軟型基板を基にグルタミン酸センサを作製する. そしてグルタミン酸センサとして基本的な機能を有するかを確認するため、*in vitro* で評価実験を行い、その作製方法と機能性について考察する.

第4章では、3章で作製した柔軟型グルタミン酸センサを用いた動物実験を実施する. 対象としたラットの脳内でセンサがグルタミン酸の濃度を連続的に検出しうることを示し、開発した柔軟型グルタミン酸センサの有用性を考察する.

第5章では、各章で述べた実験結果を総括して本論文の結論とする.

第 2 章 柔軟型センサ基板

本章では、本センサの特徴である柔軟性を生むセンサ基板の作製について述べる。

2.1 柔軟型センサ基板の設計

2.1.1 要求性能

脳内留置にともなう脳組織損傷を低減しうる柔軟なセンサを開発する上で、本センサの基板に要求される性能は次の 5 点である。

①微小性

センサ留置にともなう脳組織損傷を低減するためには、センサのサイズは小さいことが望ましい。特に、センサ留置初期の損傷の程度は、センサ基板の横断面積に影響されることが明らかになっている[45]。市販されているマイクロダイアリシスプローブの外径は最小でも $200\mu\text{m}$ である。また、主な硬基板型グルタミン酸センサの基板サイズは幅 $100\mu\text{m}$ 以上、厚さは $30\sim 150\mu\text{m}$ 程度である[19][23][46]。そして、唯一脳内での測定結果が報告されている柔軟型グルタミン酸センサの基板サイズは幅が $500\mu\text{m}$ 、厚さが $100\mu\text{m}$ である[21]。低侵襲化を目指す本センサの基板は、これら先行研究で示されているセンサの基板サイズよりも小さいことが望ましい。

②柔軟性

センサ基板の柔軟性は、低侵襲化を図るための重要な要素である。脳組織は柔らかく、そのヤング率は $0.1\sim 6\text{kPa}$ と報告されている[26]。一方、硬基板型センサに用いられるシリコンやセラミックのヤング率は $100\sim 400\text{GPa}$ である。この脳組織と留置するデバイスのヤング率の差が組織損傷を引き起こす。ヤング率 2.3GPa のポリイミドや、ヤング率 2.8GPa のパリレン C を基板とした柔軟型神経電極では、脳に留置した電極周囲の組織損傷の低減が認められていることから[37]、本センサ基板には、少なくともこの程度の柔軟性が要求される。

③生体適合性

脳内に留置する本センサには、高い生体適合性が求められる。生体適合性を評価する一つの基準としては、臨床現場で用いられる医療機器や材料の安全性評価基準がある。本センサの基板材料には、生体内での使用の安全性を示すアメリカ薬局方 (U.S. Pharmacopeial Convention: USP) の USP クラス VI や国際基準である ISO10993 の生体適合性基準に準

拠し、厚生労働省医薬局やアメリカ食品医薬品局(Food and Drug Administration: FDA)により認可されている材料が望ましい。

④長期絶縁性

柔軟型センサの基板は、金属配線を被覆する絶縁層でもあることから電気絶縁性が求められる。具体的には、柔軟型神経電極の基板に用いられているポリイミドの体積抵抗率 $10^{16}\Omega\cdot\text{cm}$ 以上の絶縁性が望ましい。さらに、脳内での長期間測定を目指す本センサには、長期にわたる絶縁性の維持が求められる。絶縁性の低下が測定不能の原因ではないとみられるが、報告されている脳内留置型グルタミン酸センサの寿命は最長 17 日である[4]。さらに、先行研究で報告されている生体留置型のグルコースセンサでは、生体内で 1 年間の測定に成功している[3]。これらの先行研究の結果を目標とするには、本センサの基板は 1 年以上にわたり絶縁性を維持できることが望ましい。

⑤機械的強度

脳へ留置する本センサの基板には、脳へ刺入するために必要な機械的強度が求められる。柔軟であるが故に、柔軟型デバイスの脳への刺入は容易ではなく、先行研究では柔軟型神経電極の様々な刺入方法が提案されてきた。例えば、神経電極全体を柔軟にはせず、一部にシリコン製の支持層を設けることで脳への刺入に必要な機械的強度を確保した柔軟型神経電極が提案されている[35][41]。あるいは、生体内で溶解するポリエチレングリコール (polyethylene glycol: PEG) で柔軟型神経電極の周囲をコーティングすることで刺入時のみ必要な機械的強度を付加する方法が提案されてきた[47]。

その他、先行研究では、デバイスを脳へ刺入するために必要な機械的強度が算出され、それは実験的にも検証されている。その結果、軟膜を貫通するために必要な荷重は $1000\mu\text{N}$ であると明らかにされている[48][27]。つまり、ポリマー製の柔軟型基板でも、そのセンサ基板が $1000\mu\text{N}$ の座屈荷重に耐える構造を有しているならば、機械的強度を増すための補助は必要なく、柔軟型センサのみで刺入できる。本センサ基板では、センサ単体で脳へ刺入できる機械的強度を目指す。

2.1.2 基板材料の選定

前項で述べた要求性能を満たすため、本研究ではパリレン C (poly(chloro-para-xylylene)) をセンサ基板の材料に用いる。パリレン C はパラキシリレン樹脂の一種であり、化学蒸着法によりピンホールをとまわず均一な厚みの薄膜が形成できる。電気絶縁性に優れるだけでなく、耐水性、耐薬品性に優れることから、電子部品のみならず自動車部品や宇宙用部品の被覆に用いられている。さらに特筆すべきは、その生体適合性である。生体内で使用される材料の安全性を示す USP クラス VI に適合し、FDA が承認する材料であることから、パリレン C は医療用機器の被覆にも活用されている。

電子部品、医療機器の被覆に用いられるパリレン C は、微細加工が可能で、かつ生体適合性が高いため、硬基板型神経電極の絶縁被覆にも活用されてきた[49]。さらに、硬基板型神経電極の絶縁層としてのみならず、柔軟なパリレン C 薄膜自体を電極基板として用いることで、柔軟型神経電極が実現されてきた[27][26][38]。パリレンと同様に、柔軟かつ微細加工に適しているポリイミドも、柔軟型神経電極の基板として用いられている[34][36][35]。

柔軟型グルタミン酸センサを開発した 2 つの先行研究でもセンサ基板としてポリイミドが採用されている[21][20]。しかしながら、ポリイミドは生体内での慢性計測には適さない材料であると指摘されている[27][28]。ここで、先行研究で採用されたポリイミドと今回採用するパリレン C の物性を比較する。表 2-1 に両材料の代表的な物性値を示す。柔軟性および絶縁性に関しては両材料ともに類似した特性を有する。一方、吸湿性と伸張性はおよそ 10 倍の差異がある。単なるセンサの構造体ではなく、絶縁層でもあるセンサ基板には、吸湿性の低さが求められる。それはセンサ基板の吸湿がその絶縁性を低下させ、また内部の金属配線を腐食させる恐れがあるためである。この点で、センサの基板にはポリイミドよりも吸湿性の値が低いパリレン C を用いることが望ましい。さらに、生体適合性の点においても、パリレン C は生体内での材料の安全性を示す USP クラス VI に適合するが、ポリイミドは、この基準に適合していない。ポリイミドとパリレン C の両者を比較したこれらの観点から検討すると、センサの基板材料としてはポリイミドよりもパリレン C が望ましいと主張する先行研究に[27]、筆者も賛同する。

また、スピコートにより作製されるポリイミド薄膜は、ピンホールが生じやすく、絶縁被覆が不完全になる可能性がある。一方、化学蒸着法を用いるパリレン C の成膜ではピンホールは生じないとされ、その絶縁性の高さがうたわれている。

このように、微細加工が可能（要求性能①）で、かつ柔軟な材料である（要求性能②）パリレン C は、ポリイミドに比べて生体適合性（要求性能③）および吸湿性が関わる長期絶縁性に優れる（要求性能④）。これら先述した要求性能のうち 4 つを満たす材料であることから、本研究ではパリレン C を柔軟型センサ基板材料として採用する。なお、機械的強度については後述する。

表 2-1： ポリイミドとパリレン C の物性値

Properties of Polymers	Polyimide ^a	Parylene C ^b
Young's modulus (GPa)	2.3	2.8
Dielectric constant (at 1MHz)	3.7	3.0
Volume resistivity ($\Omega \cdot \text{cm}$)	$>10^{16}$	8.8×10^{16}
Moisture Absorption (%)	0.94	<0.1
Elongation (%)	21	200
USP class	N/A	VI

^a DuPont Pyralux

^b SCS Parylene C

2.1.3 センサ基板構造の検討

本項では、2.1.1項で述べた要求性能のうち、微小性と機械的強度の2点を満たす柔軟型センサ基板の構造を検討する。前提条件は次の3つである。

- ①基板の材料はパリレンC
- ②グルタミン酸を検出するために必要な電極面積の確保
- ③脳への刺入に必要な機械的強度の確保

・電極面積と基板幅の検討

上記条件を満たすセンサ基板のサイズを検討するにあたり、先行研究で報告されている基板型グルタミン酸センサの電極および基板のサイズを表2-2に示す。

センサ留置初期の損傷範囲は、センサ基板の横断面積に影響されるため[45]、本センサの断面積はこれら先行研究に示されたセンサよりも小さいことが望ましい。一方で、グルタミン酸を検出するために必要な電極面積を確保する必要がある。先行研究でグルタミン酸の検出に成功している基板型センサの最小電極面積は Burmeister らが報告している $50 \times 50\mu\text{m}$ であることから[15]、既存センサの最小電極面積であるこの研究結果を参考に、まずは本センサの電極サイズは $50 \times 50\mu\text{m}$ とする。さらに、本センサ基板の幅は、既存センサの最小値である Frey らの研究を参考に[19]、その最小値を $100\mu\text{m}$ として設計する。

表 2-2： 基板型グルタミン酸センサの電極および基板サイズ

Author	Electrode size (μm)	Width (μm)	Thickness (μm)	Cross-sectional area (μm^2)
Burmeister et al. [15]	50×50	120	125	15000
Day et al. [17]	15×333	N/A	N/A	N/A
Wassum et al. [18]	40×100	120	150	18000
Frey et al. [19]	50×150	100	>30	3000
Cao et al. [20]	N/A	N/A	125	N/A
Weltin et al. [21]	$95000 (\mu\text{m}^2)$	500	100	50000

・基板厚の検討

ここでは、先述のとおり決定した基板幅 $100\mu\text{m}$ のパリレン C 製の柔軟型センサ基板を脳へ刺入するために必要な基板厚を検討する。Wester らは軟膜を貫通するために必要な荷重が $1000\mu\text{N}$ であることを示し、その荷重に耐えるために必要な基板のサイズを、下記の式 2.1 および式 2.2 に示すオイラーの座屈荷重公式から求めた。彼らは、この計算結果に基づき作製したパリレン C 製の柔軟型神経電極がラットの脳内へ刺入できることもあわせて実証している[27]。本研究もこの Wester らの報告に基づき、下記の式からラットの脳へ刺入可能な基板厚を求める。

$$P_{cr} = \frac{K \cdot \pi^2 \cdot E \cdot I}{L^2}, \quad (2.1)$$

$$I = \frac{1}{12} \cdot b \cdot h^3, \quad (2.2)$$

P_{cr} は座屈荷重であり、これは軟膜の貫通に必要な荷重 $1000\mu\text{N}$ とする。K は端末条件係数である。脳へのセンサの刺入は 1 端固定、他端回転の条件に該当するため、その値は 2.045 である。E はヤング率である。今回基板材料に採用したパリレン C のヤング率は 2.8GPa である。L は座屈長であり、ここでは刺入時にピンセットで把持する位置からセンサ基板先端までの長さである。I は断面二次モーメントである。b は断面長辺長であり、基板幅 $100\mu\text{m}$ とする。h は断面短辺長であり、ここでは基板厚を指す。

本計算式から、基板幅 $100\mu\text{m}$ のパリレン C 製の柔軟型センサ基板を脳へ刺入するために必要な最小基板厚は、センサ先端から 1mm 上を把持する場合は $13\mu\text{m}$ 、センサ先端から 2mm 上を把持する場合は $21\mu\text{m}$ と求められる。本センサを脳へ刺入する際にはセンサ先端から 2mm までを把持することが想定されることから、本センサの柔軟型基板の厚さは $20\mu\text{m}$ として設計する。

2.1.4 センサ基板の設計仕様

前項で検討した事項を踏まえて設計した柔軟型センサを図 2-1 に示す。検討の結果から、電極のサイズは $50 \times 50\mu\text{m}$ とし、作用極の他、測定に必要な対極、参照極、さらには比較作用極の設置を想定して、4 つのチャンネルを $150\mu\text{m}$ 間隔で配置した。また、基板幅は $100\mu\text{m}$ として設計したが、配線に要する面積を加えたことで一部の基板幅は最大で $160\mu\text{m}$ となった。基板厚は $20\mu\text{m}$ とした。

本研究では、ラットを用いる動物実験時の測定対象を、グルタミン酸の活動が高い前頭前皮質とする。そのため、深さ 3.0mm の刺入を可能にするため、センサ先端から 4mm までの基板幅を $160\mu\text{m}$ 以下として設計した。

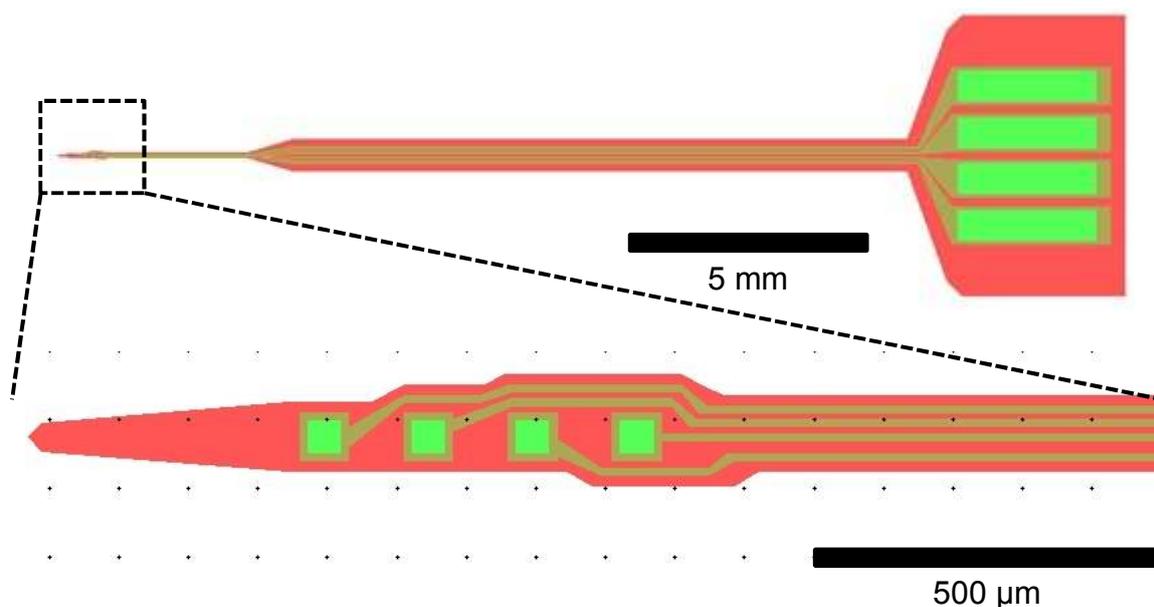


図 2-1:設計した柔軟型センサ

上図は全体像，下図は先端拡大像を示す．緑色は金配線を表し，赤色はセンサ基板を表す．

2.2 柔軟型センサ基板の作製

2.2.1 センサ基板作製に関する要素技術

・微細加工技術

本研究では，Micro Electro Mechanical System（微小電気機械システム：MEMS）技術と呼ばれる微細加工技術を用いて柔軟型センサを作製する．MEMSとは，半導体製造技術を応用して作製された微細なセンサやアクチュエータ，電子回路，あるいはそれらを一体化した電子システムを指す．さらに，これらを作製する加工工程や技術はMEMS技術と呼ばれる．既に製品として活用されているインクジェットプリンターヘッドや加速度センサ，デジタルミラーデバイスなどの微細なデバイスはMEMS技術で作製された代表的な製品である．

MEMS製品および技術の応用先は多岐にわたり，微小な流路やポンプ，反応器や混合器を1つに組み込んだMicro-Total Analysis Systems (μ -TAS)によって，DNAや蛋白質など微量のサンプルが扱える小型の分析装置もMEMS技術によって開発されている．

・フォトマスク

柔軟型センサ基板の作製にはフォトリソグラフィ技術を用いる．そこで，その作製にはフォトマスクが必要となる．作製するデバイスの構造によって必要となるフォトマスクの数は異なる．本研究では2枚のパリレンC薄膜の間に電極配線が挟まれた構造の柔軟型基

板を作製するため、2枚のフォトマスクを作製した。

フォトマスクの作製にあたり、センサの設計には CAD ソフト (L-Edit, タナーリサーチジャパン) を用いた。作成した CAD 画像を図 2-2 に示す。CAD ソフトを用いて設計された金属配線とセンサ基板外形の 2 つの CAD データは電子線描画装置 (F5112, アドバンテスト) によってフォトマスク (ST-TLR6-TQZ-5009, 凸版印刷) に描画された。その後、描画されたパターンを現像し、クロムをエッチングすることでフォトマスクを作製した。なお、フォトマスクの作製には東京大学 VLSI Design and Education Center (VDEC) に設置された各種共用装置を利用した。

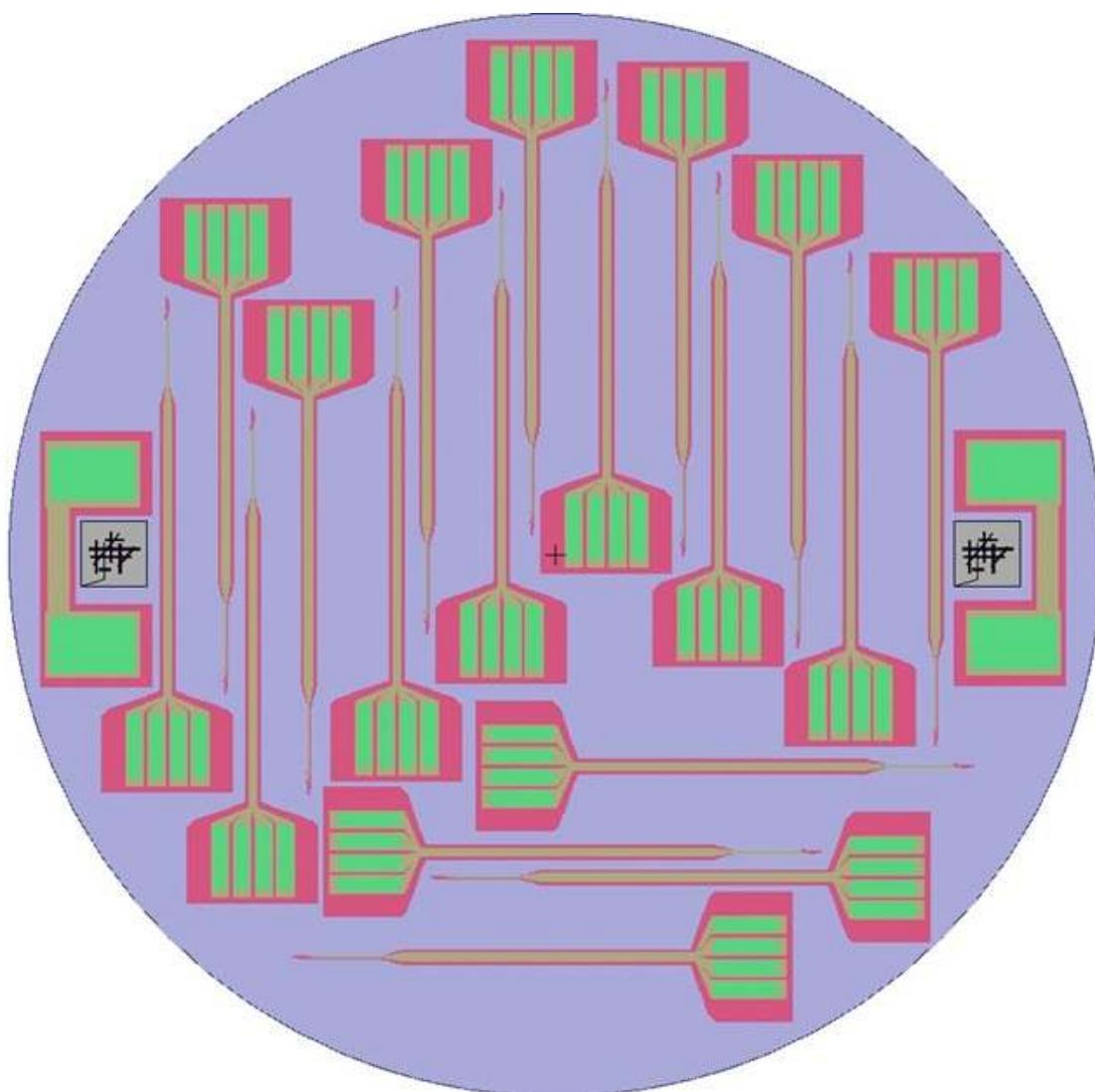


図 2-2: 作成した CAD の画像

緑色は金属配線を表し、赤色はセンサ基板を表す。

2.2.2 柔軟型センサ基板の作製方法

柔軟型センサ基板の作製工程を図 2-3 に示すとともに、その概要を以下に述べる。なお、加工条件を含む作製方法の詳細は付録 A に記す。

厚さ 20 μm のパリレン C 薄膜で形成される柔軟型センサ基板は、直径 3 インチ、厚さ 300 μm ~500 μm のシリコンウエハを土台とし、その表面に作製された。はじめにパリレンコーター (PDS 2010, 日本パリレン) を用いて、シリコンウエハ上に厚さ 10 μm のパリレン C (日本パリレン) を蒸着した。

次に、真空蒸着装置 (SVC-700, サンヨー電子) あるいはスパッタリング装置 (CFS-4EP, 芝浦メカトロニクス) を用いて、パリレン C 上に電極配線となる金を厚さ 300nm 成膜した (図 2-3a)。そして金表面にポジ型フォトリソ (S1818, シップレイジャパン) をスピンコート (MS-A150, ミカサ) した後、マスクアライナ装置 (PEM-800, ユニオン光学) とフォトリソマスクを用いて、紫外線露光した。露光されたフォトリソを現像し (NMD-3, 東京応化工業)、続いて金エッチャント (AURUM302, 関東化学) を用いて配線部以外の金をエッチングした (図 2-3b)。

再び厚さ 10 μm のパリレン C を蒸着し、その表面にパリレンエッチングの際の保護膜となるアルミニウムを厚さ 100nm 真空蒸着した (図 2-3c)。アルミニウムは先述したフォトリソを用いたパターンニング工程、およびアルミエッチング液 (混酸アルミ, 関東化学) によるエッチングを行いセンサ基板形状の保護膜を成形した (図 2-3d)。

電極窓およびコネクタ部表面の 10 μm 厚のパリレン C は、酸素プラズマエッチング (FA-1, サムコ) を用いたドライエッチングで削られ、結果的に金が表面に露出する。センサ基板外形は、さらにエッチングを続けることで最終的に 20 μm 厚のパリレン C が削られることで形成された (図 2-3e)。最後に作製した柔軟型センサ基板をシリコンウエハ上から剥離した (図 2-3f)。

剥離した神経電極には導電性エポキシ (CW2400, ITW Chemtronics) で 4 端子分に分割したコネクタ (R861, メガニクス) を接着し、その周囲はエポキシ系接着剤 (エクセルエポ, セメダイン) で被覆した。

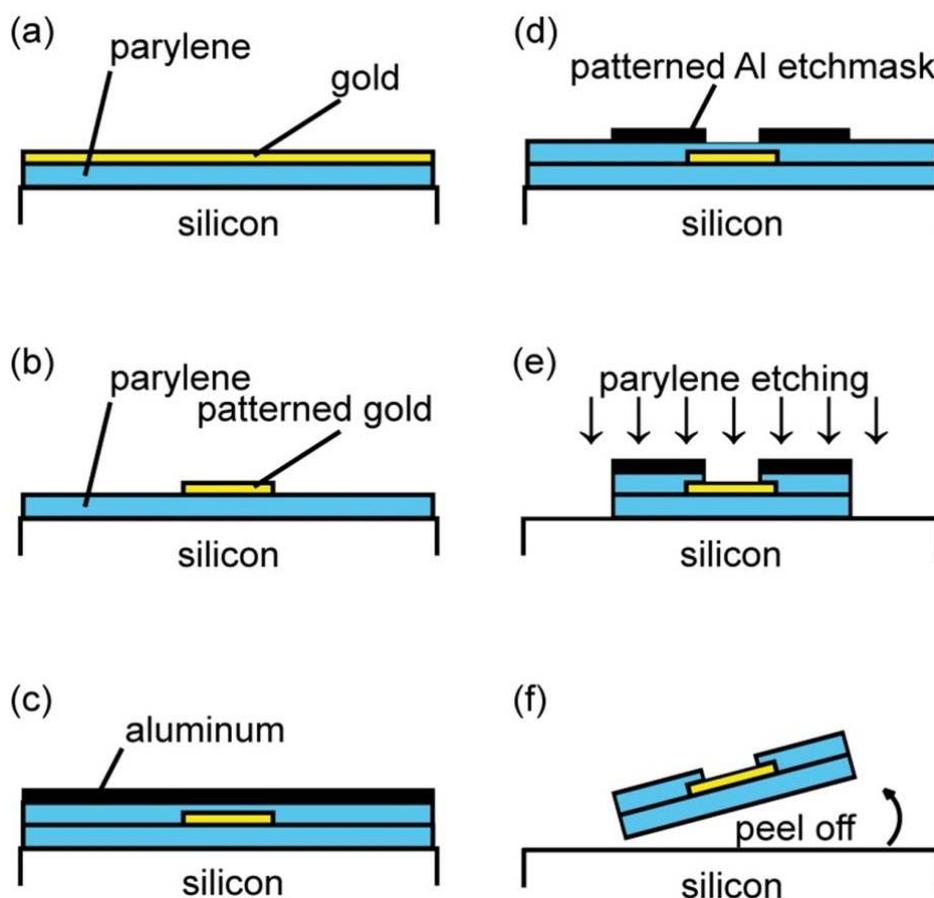


図 2-3: 柔軟型センサ基板の作製工程

2.3 柔軟型センサ基板の作製結果と性能検証実験

2.3.1 性能検証方法

・電気絶縁性

金配線を被覆する絶縁層でもあるパリレン C の電気絶縁性を検証するため、電極部の金が露出していない柔軟型センサ基板を作製した。作製したこのセンサを、37°Cの生理食塩水に5日間浸漬し、その前後でそれぞれ電極インピーダンスを LCR メーター (4263B, Hewlett packaed) を用い 1kHz, 20mV で測定した。

・機械的強度

作製した厚さ 20 μ m のパリレン C 製の柔軟型センサ基板が、生体の脳へ刺入できる機械的強度を有するかを検証した。機械的特性が生体の脳と類似する 0.6% wt/v のアガロースゲルから作製した模擬脳に対し[50], 作製したセンサの刺入を試みた。この模擬脳はアガロー

ス (Agarose S, ニッポン・ジーン) を濃度 0.6% wt/v になるように生理食塩水 (大塚製薬) に溶解して加熱後, 型に流し込み, 室温にて冷却して作製した.

2.3.2 作製結果と機能検証結果

前節に述べた工程を経て作製された柔軟型センサ基板を図 2-4 に示す. 微細加工で作製された柔軟型センサ基板の形状やサイズはその設計値に近似するものであった. そして, 導電性エポキシで接着したコネクタの接続も含めすべてのチャンネルで導通が確認できた.

パリレン C 薄膜の絶縁性を確認するため, 37°C の生理食塩水中に 5 日間浸漬したところ, 電極が露出していないセンサの電極インピーダンスの平均値は初日で $20.9 \pm 1.6 \text{ M}\Omega$, 5 日後は $19.9 \pm 1.7 \text{ M}\Omega$ と, 浸漬前後でその値に有意な差は認められなかった.

次に, 柔軟型センサ基板の機械的強度を検証するため, アガロース製の模擬脳へ刺入を試みた. 刺入開始時はセンサ先端から 1mm を, 先端刺入後は模擬脳表面から 1mm をピンセットで把持しながら刺入すると, 刺入中に柔軟型センサ基板が座屈することはなく, その基板幅が $160 \mu\text{m}$ 以下である先端から 4mm までを模擬脳内へ刺入することができた (図 2-5). また, 模擬脳への刺入前後に計測した電極インピーダンスに差異は認められなかった.

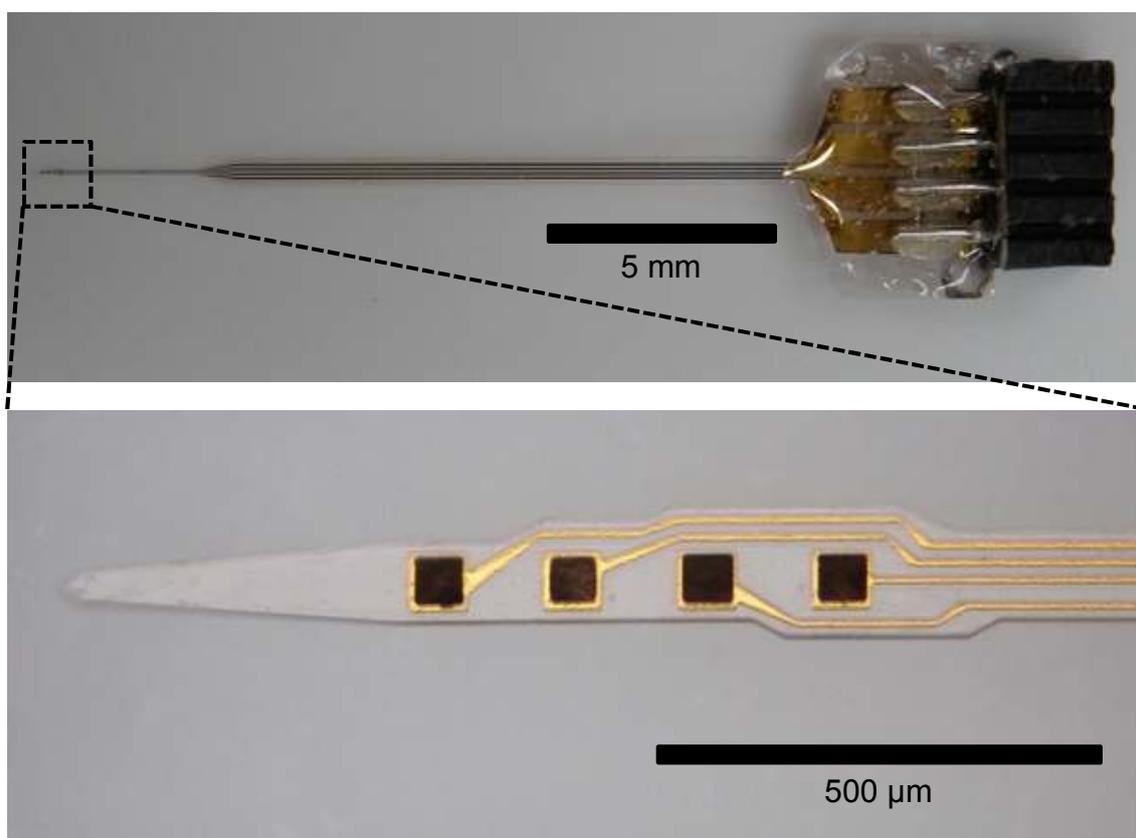


図 2-4: 作製された柔軟型神経電極
上図は電極全体像を表し, 下図は電極の先端部を表す.

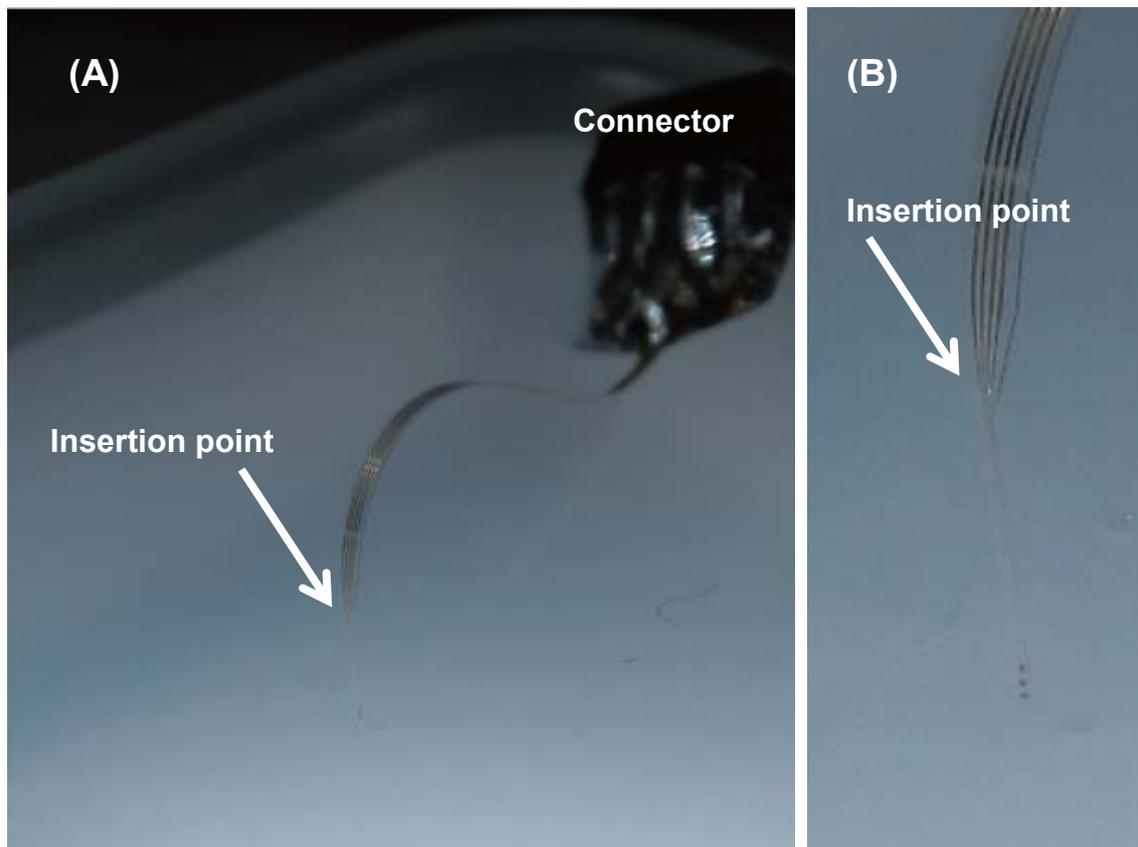


図 2-5： 模擬脳へ刺入した柔軟型センサ基板
(A)：センサ全体像を表す。(B)：刺入したセンサ先端の拡大像を表す。

2.4 考察

本節では、要求性能に基づいて設計および作製した柔軟型センサ基板の性能について考察する。

・センサ基板の微小性について

基板の断面積を微小化した本柔軟型センサは、既存の基板型グルタミン酸センサに比べ、留置にともなう脳組織損傷を低減できると考えられる。グルタミン酸の検出に必要と想定される電極面積を確保しながらも、センサの基板断面積は $3200\mu\text{m}^2$ (基板幅最大 $160\mu\text{m}$, 基板厚 $20\mu\text{m}$) として設計し、そして作製した。本センサ基板の断面積を、報告されている主な基板型グルタミン酸センサの断面積と比較すると、Frey らが示した硬基板型センサのサイズ ($3000\mu\text{m}^2$) に次いで 2 番目に小さい (表 2-3)。脳へのセンサ留置にともなう初期

の脳組織損傷の程度は、留置したセンサの断面積に影響されるため[45]、基板断面積を小さく設計した本柔軟型センサは、低侵襲化の観点で既存のセンサよりも優れると期待できる。

特に、先行研究で唯一脳内でのグルタミン酸測定に成功している柔軟型センサの断面積は $50000\mu\text{m}^2$ と大きく [21]、それは本柔軟型センサ基板の断面積 $3200\mu\text{m}^2$ の 15 倍以上である。この 15 倍以上におよぶ基板断面積の差が侵襲の程度に影響することを考えると、本研究で設計および作製した柔軟型センサ基板の微小性は、その意義が大きい。

表 2-3： 基板型グルタミン酸センサの基板サイズ比較

Author	Electrode size (μm)	Width (μm)	Thickness (μm)	Cross-sectional area (μm^2)
Burmeister et al. [15]	50 × 50	120	125	15000
Day et al. [17]	15 × 333	N/A	N/A	N/A
Wassum et al. [18]	40 × 100	120	150	18000
Frey et al. [19]	50 × 150	100	>30	3000
Cao et al. [20]	N/A	N/A	125	N/A
Weltin et al. [21]	95000 (μm^2)	500	100	50000
Kotake	50 × 50	160	20	3200

・ 柔軟型センサ基板の電気絶縁性について

パリレン C を材料に作製した本柔軟型センサ基板は、センサの配線を被覆する絶縁層としても十分に機能すると考えられる。37°C の生理食塩水中に 5 日間浸漬した前後で計測した電極インピーダンス結果から、パリレン C 薄膜 (厚さ: $10\mu\text{m}$) の電気絶縁性に変化は認められなかった。パリレン C の電気絶縁性能については Hsu らも報告している [49]。彼らはパリレン C を厚み $4.5\mu\text{m}$ 被覆したデバイスを生理食塩水に浸漬し、1 年間以上にわたりパリレン C 薄膜の絶縁性を検証した。その結果、浸漬開始から 487 日後であってもパリレン C 薄膜の電気絶縁性は浸漬初日と変わりなく、その性能は維持されていたと報告している。

既存の柔軟型グルタミン酸センサでは、その基板としてポリイミドが採用されている。ポリイミドの長期にわたる電気絶縁性を確認した研究報告がないため、その長期絶縁性能は不明である。ただし、ポリイミドはパリレン C に比べて吸湿性が高く、それが電気絶縁性を劣化させると考えられている[27][28]。そのため、1年以上にわたりその電気絶縁性が確認されているパリレン C を本柔軟型センサの基板および絶縁層として採用したことは、妥当である。

・柔軟型センサ基板の機械的強度について

本柔軟型センサ基板は、脳へ刺入するために必要な機械的強度を十分に確保できていると考えられる。その論拠は次の2点である。まず、模擬脳への刺入実験結果から、この柔軟型センサ基板が座屈することなく、脳へ刺入できることが確認された。そして、後述する機械的強度の計算結果からも、作製した柔軟型センサ基板が刺入に必要な機械的強度を有していることがわかる。

模擬脳への刺入実験の際、基板の把持はセンサ先端から、あるいは模擬脳表面から1mmの位置とした。厚さ20 μm のパリレン C 製のセンサ基板を先端から1mmの位置で把持した場合、先述したオイラーの公式から、その座屈荷重は3764 μN と算出される。これは、軟膜を貫通するために必要な荷重1000 μN を3倍以上上回る値である、この計算結果からも、基板最小幅100 μm および基板厚20 μm として設計したパリレン C 製の本柔軟型センサ基板は、脳へ刺入するに十分な機械的強度を有すると説明できる。

脳内でグルタミン酸の濃度を測定した Weltin らの柔軟型センサでは、その基板のサイズが大きく、脳へ刺入するための機械的強度は十分に確保されているようである。論文内に示されているサイズから計算した、彼らのポリイミド製の柔軟型センサの座屈荷重は63873 μN である。マウスの硬膜を貫通するために必要な荷重が10900 μN と報告されていることから[41]、彼らのセンサは、おそらく硬膜をも貫通できる十分な機械的強度を持つが、一方で、このサイズの大きさは、結果的に周囲の脳組織への侵襲度を大きくする。

柔軟型センサが有する柔軟性を活かし、低侵襲化を図るには、脳への刺入に必要な機械的強度を確保しつつも、そのセンサ基板サイズは可能な限り微小化することが望ましい。この観点から、本研究で作製した柔軟型センサ基板は、センサの微小化と刺入に必要な機械的強度の2つの要求性能を満たす望ましい設計と作製が実現できたと言える。

・PEG の必要性について

模擬脳への刺入実験では、PEG 等による支持が無くとも厚さ20 μm のパリレン C 製の柔軟型センサ基板が刺入できることが確認された。しかしながら、柔軟なセンサの先端部をピンセットで把持しながら刺入する必要があるため、把持によるセンサ基板の破損が危惧

される。これまでのところ、把持によるセンサ基板の破損や配線の断線は確認されていないが、把持による基板の破損が生じるようであれば、センサ刺入時の PEG コーティングを検討する必要がある。

2.5 まとめ

本章では、柔軟型センサ基板の設計と作製、そして作製したセンサ基板の性能検証について述べた。

1 節では、まず、本柔軟型センサ基板に要求される性能を検討した。そして、その要求性能を満たすために相応しい基板材料としてパリレン C を選定し、次いでセンサの微小性と脳への刺入に必要な機械的強度を両立するセンサ基板構造を検討した。検討の結果、センサ基板の最小幅は $100\mu\text{m}$ 、基板厚を $20\mu\text{m}$ として設計した。2 節では、前節で決定した設計を基に、微細加工技術を用いてパリレン C を基板材料とする柔軟型センサ基板を作製した。3 節では、作製した柔軟型センサ基板が必要な電気絶縁性および機械的強度を有しているか検証した。そして 4 節では、要求性能の検討から、実際に作製した柔軟型センサ基板の検証結果までを踏まえ、本柔軟型センサ基板の設計と作製結果の妥当性を考察した。

以上により、先述した 5 つの要求性能を満たすパリレン C 製の柔軟型センサ基板が作製できた。

第3章 柔軟型グルタミン酸センサ

本章では、前章で作製したパリレン C 製の柔軟型センサ基板を基に、柔軟型グルタミン酸センサを作製する。

3.1 要求性能

柔軟型グルタミン酸センサの作製に当たり、本センサに要求される性能を検討する。まず、1つのシナプス間隙内で生じるグルタミン酸の動態を述べる。グルタミン酸は前シナプスからシナプス間隙へ放出され、後シナプスにある受容体に結合する。この時、前シナプスからグルタミン酸が放出されると、その距離 20nm 程度のシナプス間隙内のグルタミン酸濃度は、最大で数 mM に達するが[16]、グルタミン酸トランスポーターによる再取り込みによって 1 秒未満で、その濃度は放出前の水準に低下する。シナプス間隙のサイズに比べると、既存のグルタミン酸センサはいずれもそのサイズが大きく、シナプス間隙内で生じるこのグルタミン酸の濃度変化を捉えることはできない。本研究で作製するセンサでも同様に、時間的にも空間的にも目指せる性能を超えており、シナプス間隙内のグルタミン酸濃度変化を観察することは出来ない。

本センサに要求されるのは、シナプス間隙から漏出する細胞外のグルタミン酸濃度の計測である。シナプス間隙で生じる神経伝達のみならず、近年では細胞外に漏出したグルタミン酸による近傍の神経細胞への作用が神経信号伝達において重要な役割を果たしているのではないかと考えられてきている[51]。また、通常では 1~5 μ M 程度に保たれていると言われる神経細胞外のグルタミン酸濃度は、脳虚血時には 160 倍に上昇し[13]、周囲の神経細胞を過剰に興奮させ、結果的には神経細胞死を招く。この脳虚血をはじめとする脳の異常時の細胞外グルタミン酸濃度の変化を実時間的に計測できることが本センサの達成すべき目標である。脳虚血時の細胞外グルタミン酸濃度の変化を計測できれば、本センサはその機序を探るための一つのツールとして活用できる。また、興奮性神経細胞毒性は脳虚血に限らず、その他の脳神経疾患にも関与しているとみられ、これらの機序を探るためにも本センサを役立てることが出来る。

グルタミン酸センサの性能は、検出下限、感度、反応時間、選択性の4つで構成される。まず、脳内の神経細胞外グルタミン酸の濃度から具体的な要求性能を考える。安静時のラット脳内の細胞外グルタミン酸濃度を計測した先行研究は多数あるが、各研究報告によってその値は異なる。例えば、Day らは安静時のラットの前頭皮質内のグルタミン酸濃度が $1.4 \pm 0.2 \mu\text{M}$ であったと報告している[17]。一方、Rutherford らは同じく前頭皮質で計測された安静時のグルタミン酸濃度が $44.9 \pm 4.7 \mu\text{M}$ であったと報告している[4]。このように、

安静時の脳内のグルタミン酸濃度は、各研究によって示される値が異なり、未だ統一した知見を得るには至っていない[52]。しかしながら、神経細胞外のグルタミン酸濃度は1~5 μM 程度であるとする多くの研究報告があることから、本センサでは1 μM 程度のグルタミン酸濃度を検出できる検出下限が望まれる。

次に、既存のグルタミン酸センサの性能を参考に、本センサに要求される性能を検討する。これまでに研究報告された主なグルタミン酸センサの性能を表3-1に示す。上記でも述べた検出下限については、各センサでその性能が異なり、その値は0.22~5 μM と示されている。この値を参考に、本センサでも既存のセンサと同等の検出下限性能が求められる。また、感度については、Burmeisterらが示す1.58 \pm 0.24pA/ μM が低く[15]、Weltinらが示すセンサの感度205pA/ μM が最も高い値である[21]。ただし、ここで示す感度は、センサの電極面積を考慮していないため、電極面積が大きいセンサの感度は高く示されている。Burmeisterらの研究を参考に、電極面積を決定した本センサでは、彼らのセンサの感度と同等である1pA/ μM 程度の感度を目標とする。反応時間についても、各研究によってその性能に差が認められるが、その多くは10秒未満の反応時間を達成している。本センサでも10秒未満の反応時間が望まれる。選択制について、脳内にはグルタミン酸の他にも多数の生体物質が存在する。そのため、本センサにはグルタミン酸のみを特異的に検出する性能が必要となる。

表 3-1: 既存のグルタミン酸センサの性能

Year	Author	Electrode	Substrate	Response time (s)	Sensitivity (pA/ μ M)	Detection limit (μ M)
1994	Hu et al. [13]	Pt-Ir (Single)	—	1.3	100	2
1999	Kulagina et al. [14]	CFE (Single)	—	20~40	3.4	1~3
2001	Burmeister et al. [15]	Ti/Pt (Multi)	Ceramic	~1	1.58 \pm 0.24	0.98 \pm 0.09
2006	Oldenziel et al. [16]	CFE (Single)	—	~8	5.5	5
2006	Day et al. [17]	Ti/Pt (Multi)	Ceramic	~1	16	1.82 \pm 0.17
2008	Wassum et al. [18]	Cr/Pt (Multi)	Silicon	0.8 \pm 0.2	2.5 \pm 0.5	0.79 \pm 0.16
2010	Frey et al. [19]	Ta/Pt (Multi)	Silicon	6	9.9 \pm 1.5	0.42
2012	Cao et al. [20]	Au/Cr (Multi)	polyimide	~2	22.3	0.25
2014	Weltin et al. [21]	Au (Multi)	polyimide	4.9 \pm 1.9	205	0.22

3.2 柔軟型グルタミン酸センサの作製

3.2.1 グルタミン酸センサに係る要素技術

・酵素を用いたグルタミン酸の検出原理

本研究で作製する柔軟型センサでは、グルタミン酸の検出にグルタミン酸酸化酵素 (L-glutamate oxidase: GluOx) を用いる。GluOx を用いたセンサがグルタミン酸を検出する原理を模式的に図 3-1 に示し、その検出原理を以下に述べる。グルタミン酸はセンサ表面に固定された GluOx によって α -ケトグルタル酸と過酸化水素 (H_2O_2) に分解される。発生した H_2O_2 は電極表面に接すると印可されている電位によって酸化され、電極に 2 つの電子を受け渡す。この反応を電流値として記録する。

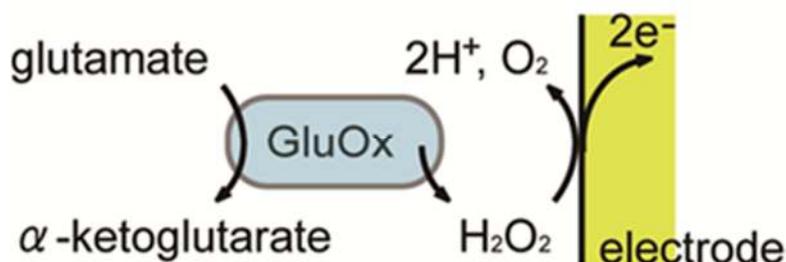


図 3-1: グルタミン酸の検出原理

・電極表面への酵素固定方法

酵素を用いたセンサを作製するためには電極表面に酵素を固定する必要がある。電極に酵素の固定方法は大きく分けて化学結合法、架橋法、包括法の 3 つがある (図 3-2)。この 3 つの固定法にはそれぞれ利点と不利点がある。化学結合法と架橋法は、電極と酵素の結合力が強いため電極からの酵素の脱離は少ないが、化学薬品による酵素の失活が起りやすい。包括法では薬品による失活は起りにくい、化学結合法や架橋法に比べると電極と酵素の結合力が弱いため、酵素の脱離による応答の低下が懸念される。

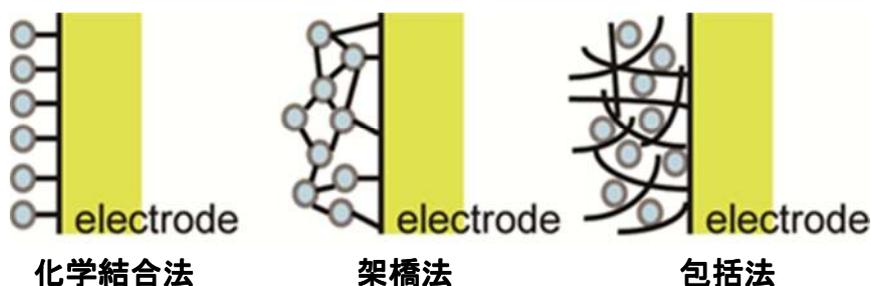


図 3-2: 電極表面への酵素固定方法 ([53]から一部改変)

3.2.2 センサの作製方法

・白金黒メッキ方法

本センサの作製にあたり，酵素を固定する電極の表面積を増やし，センサの感度を向上させると報告がある[54]白金黒メッキを活用した．白金黒メッキは，30ml の蒸留水に 1g の六塩化白金 (H_2PtCl_6) および 10mg の酢酸鉛を溶かして作製した白金黒メッキ液に酵素固定前のセンサを浸し，ポテンショスタットを用いて+0.5V を 7 秒間印加した．

・酵素の固定方法

酵素の固定方法を検討するため，本研究では，電極表面への酵素の固定に，包括法と架橋法の 2 つの方法を用いた．

包括法では，電極表面に *o*-フェニレンジアミンを電解重合することでグルタミン酸酸化酵素 (L-glutamate oxidase: GluOx, ヤマサ醤油) を包括固定した．100mM のリン酸バッファに *o*-フェニレンジアミンを溶解し，300mM *o*-フェニレンジアミン溶液を調整した．そこへウシ血清アルブミン (Bovine serum albumin: BSA, 和光純薬) を 5mg/ml 添加した．純水で 160units/ml に濃度調整した GluOx 溶液に電極を 5 分間浸漬し，その後 5 分間乾燥させる．この浸漬と乾燥を計 5 回繰り返した後，300mM *o*-フェニレンジアミン溶液へ電極を浸し，+1V (vs Ag/AgCl) の電位を 30 分間印可した．

架橋法では，まず電極表面に対して 5% の Nafion 溶液 (Nafion117 solution, Sigma-Aldrich) を滴下し，70°C のホットプレート上で乾燥させた．この Nafion 膜は計測対象である H_2O_2 を透過し，計測の妨げとなるアスコルビン酸は透過しない性質がある．

次に酵素の固定は，純水で 200units/ml あるいは 400 units/ml に濃度調整した GluOx 溶液 8 μ l に対し，10% に調整した牛血清アルブミン (Bovine serum albumin: BSA) 溶液と 1.25% に調整したグルタルアルデヒド溶液をそれぞれ 1 μ l ずつ加えた混合液を作製した．混合の結果，160 units/ml あるいは，その 2 倍量にあたる 320units/ml の酵素を含む溶液をスライドガラス上に滴下し，その液溜まりへ電極を浸漬した後乾燥させた．この 3 分間の浸漬とその後 3 分間の乾燥を 5 回繰り返し，電極表面へ酵素を固定した．

3.3 柔軟型グルタミン酸センサの性能検証実験

3.3.1 センサ性能検証実験概要

本節では、グルタミン酸センサの感度と検出下限に影響すると考えられる①白金黒メッキの活用、②酵素固定方法、③酵素固定量の3点についてそれぞれ *in vitro* での検証実験を行った。なお、*in vitro* 実験におけるグルタミン酸の計測方法は次項に示す。

①白金黒メッキの活用

白金黒メッキの活用を検討するため、電極表面へ白金黒メッキを施したものと、施さなかったものの2種類を用意し、その表面には160 units/ml濃度のGluOxを包括法にて固定した。なお、電極サイズのさらなる微小化をあわせて検討するため、20 μ m \times 20 μ mサイズの電極と、50 μ m \times 50 μ mサイズの電極を用意した。具体的には表3-2に示す1)~4)の4種類のセンサについて感度と検出下限を比較した。

②酵素固定方法

酵素の固定方法を検討するために、サイズ50 μ m \times 50 μ mの電極に白金黒メッキを施した上で、包括法と架橋法の2つの固定法で160 units/ml濃度のGluOxを固定し、固定法の異なるその2種類のセンサでグルタミン酸の計測結果を比較した。表3-2に示す4)と5)の比較である。

③酵素固定量

酵素の固定量がセンサの感度、検出下限に及ぼす影響を検討するため、サイズ50 μ m \times 50 μ mの電極に白金黒メッキを施した上で、架橋法によって160 units/ml濃度あるいは、その2倍量にあたる320 units/ml濃度のGluOxを固定し、その2種類のセンサによるグルタミン酸の計測結果を比較した。表3-2に示す5)と6)の比較である。

表 3-2: 検証実験に用いたセンサ種類一覧

	Electrode size	Platinum black	Enzyme immobilization	Enzyme concentration
1)	20 μ m \times 20 μ m	×	Entrapment	160 units/ml
2)	20 μ m \times 20 μ m	○	Entrapment	160 units/ml
3)	50 μ m \times 50 μ m	×	Entrapment	160 units/ml
4)	50 μ m \times 50 μ m	○	Entrapment	160 units/ml
5)	50 μ m \times 50 μ m	○	Cross-linking	160 units/ml
6)	50 μ m \times 50 μ m	○	Cross-linking	320 units/ml

3.3.2 グルタミン酸の計測方法

ここで、*in vitro* 実験におけるグルタミン酸の計測方法を述べる。グルタミン酸の計測にはポテンシostat (ALS802C, CH Instrument) を用い、作用極、対極、参照極の3極によるアンペロメトリー計測を行った。

図 3-3 に *in vitro* 計測における計測環境を示す。いずれの計測も 10ml の生理食塩水を入れたビーカー内に、作用極、対極、参照極の3種類の電極を設置し、電流値の経時的な変化を 0.1 秒毎 (サンプリングレート:10S/s) に記録した。なお、ビーカーは攪拌機能付きのホットプレート上に設置し、水温 37°C、100rpm で攪拌子が回転する環境下で計測を行った。グルタミン酸の濃度はビーカーへのグルタミン酸溶液の滴下により変化させ、その滴下量はマイクロピペットで調整した。なお、センサの感度は計測結果より作成した検量線の傾きから求めた。そして、検出下限は S/N 比の 3 倍として求めた。

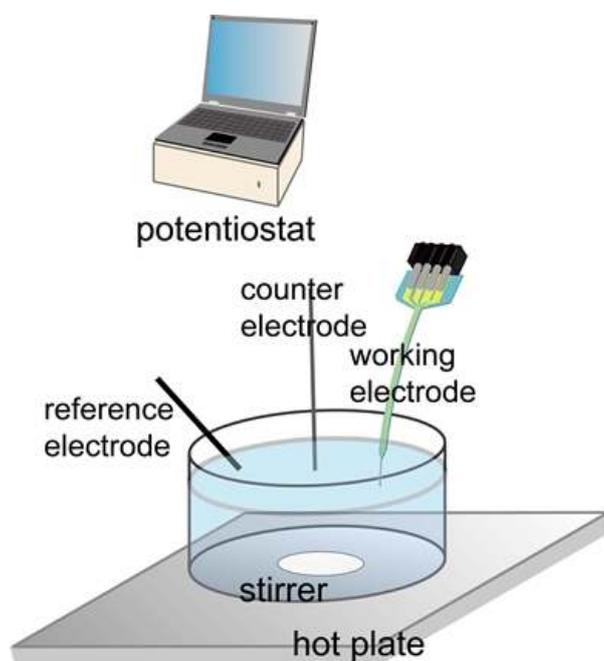
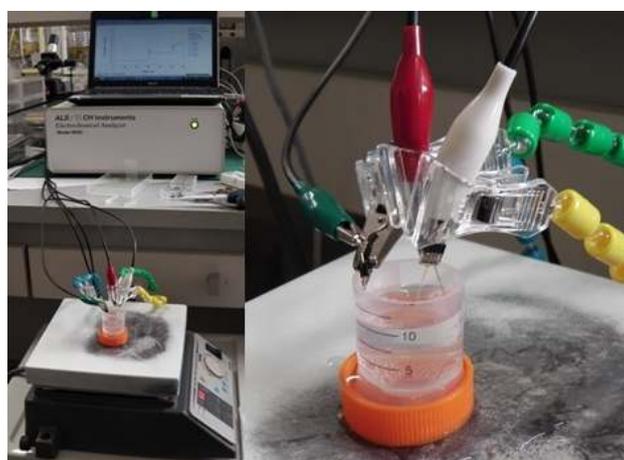


図 3-3 : *in vitro* 計測環境

3.3.3 センサの性能検証実験結果

・電極サイズおよび白金黒メッキの活用について

サイズ $20\mu\text{m} \times 20\mu\text{m}$ および $50\mu\text{m} \times 50\mu\text{m}$ の電極について、それぞれ白金黒メッキを施した電極と施さなかった電極を用意し、電極表面積が異なるそれら 4 つのセンサをそれぞれ生理食塩水に浸漬し、既知の濃度のグルタミン酸を滴下した。その際のグルタミン酸に対するセンサの電流値応答を図 3-4 に示した。

まず、白金黒メッキされていないセンサでは、 $20\mu\text{m} \times 20\mu\text{m}$ サイズと $50\mu\text{m} \times 50\mu\text{m}$ サイズの 2 種類のセンサ間で、顕著な応答の差は認められなかった。一方、白金黒メッキを施したセンサは、白金黒メッキを施さなかったセンサと比較して、 $20\mu\text{m} \times 20\mu\text{m}$ サイズ、 $50\mu\text{m} \times 50\mu\text{m}$ サイズともに、グルタミン酸に対する感度が向上した。そして、白金黒メッキによる感度の向上は、電極サイズが大きい $50\mu\text{m} \times 50\mu\text{m}$ サイズのセンサで特に顕著であった。(図 3-4)。

各センサの計測結果を基に作成した検量線からセンサの感度を求めたところ、表面積が異なる 4 種類のセンサのうち、白金黒メッキ施した $50\mu\text{m} \times 50\mu\text{m}$ サイズのセンサの感度が最も高く、その値は $3.7 \text{ pA}/\mu\text{M}$ であった。これは白金黒メッキを施していない同サイズのセンサの感度 $0.3 \text{ pA}/\mu\text{M}$ の 12 倍以上にあたる (図 3-5)。

次に、4 種類のセンサの検出下限を表 3-3 に示す。白金黒メッキ前の 2 つのセンサで比較すると、 $20\mu\text{m} \times 20\mu\text{m}$ サイズのセンサの検出下限が $3.1\mu\text{M}$ 、 $50\mu\text{m} \times 50\mu\text{m}$ サイズのセンサの検出下限は $1.3\mu\text{M}$ であった。それぞれの電極サイズについて、白金黒メッキの有無で検出下限を比較すると、 $20\mu\text{m} \times 20\mu\text{m}$ サイズの場合には、白金黒メッキを施したことにより、検出下限が $3.1\mu\text{M}$ から $1.3\mu\text{M}$ へ向上した。その一方で、 $50\mu\text{m} \times 50\mu\text{m}$ サイズの場合には、白金黒メッキを施していないセンサでは $1.3\mu\text{M}$ 有ったのに対し、白金黒メッキを施したセンサの検出下限は $3.1\mu\text{M}$ と、その値はメッキを施していないセンサの値よりも劣る結果となった。

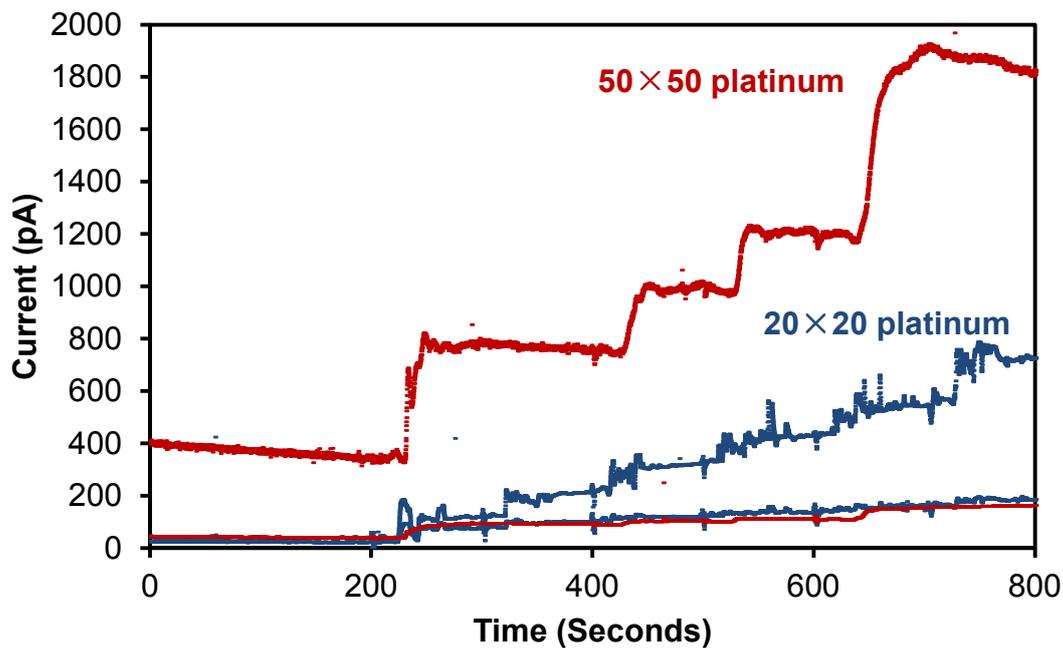


図 3-4 : 電極表面積が異なる 4 つのセンサのグルタミン酸に対する応答
赤線は電極サイズ 50 μm ×50 μm のセンサを表し,
青線は電極サイズ 20 μm ×20 μm のセンサを表す。

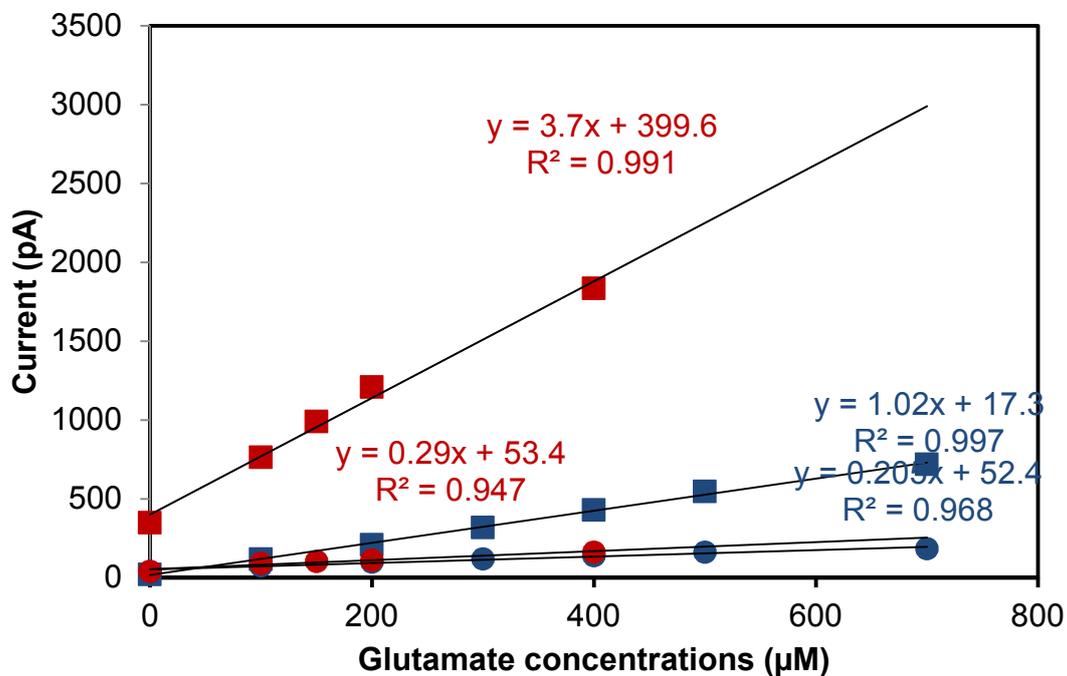


図 3-5 : 電極表面積が異なる 4 つのセンサのグルタミン酸濃度と電流値の関係
赤は電極サイズ 50 μm ×50 μm のセンサを表し,
青は電極サイズ 20 μm ×20 μm のセンサを表す。

表 3-3: 白金黒メッキの検証実験に用いたセンサ種類一覧

	Electrode size ($\mu\text{m} \times \mu\text{m}$)	Platinum black	Enzyme immobilization method	Enzyme concentration (units/ml)	Sensitivity (pA/ μM)	Detection limit (μM)
1)	20 \times 20	×	Entrapment	160	0.2	3.1
2)	20 \times 20	○	Entrapment	160	1.0	1.3
3)	50 \times 50	×	Entrapment	160	0.3	1.3
4)	50 \times 50	○	Entrapment	160	3.6	3.2

・酵素固定方法について

酵素の固定方法を検討するため、包括法と架橋法の2つの方法でセンサを作製し、この2種類のセンサを用いた *in vitro* 計測結果を比較した。図 3-6 に各酵素固定方法で作製されたセンサの検量線を示す。どちらのセンサもグルタミン酸の濃度に比例して計測される電流値は上昇した。検量線から求めた各センサの感度は、包括法で作製されたセンサでは 2.4pA/ μM (n=4) であったのに対し、架橋法で作製したセンサの感度は 10.3pA/ μM (n=4) であった。また、検出下限についても包括法に比べ架橋法で作製したセンサが優れ、その値は包括法では 3.2 μM であったのに対し、架橋法では 2.7 μM であった。

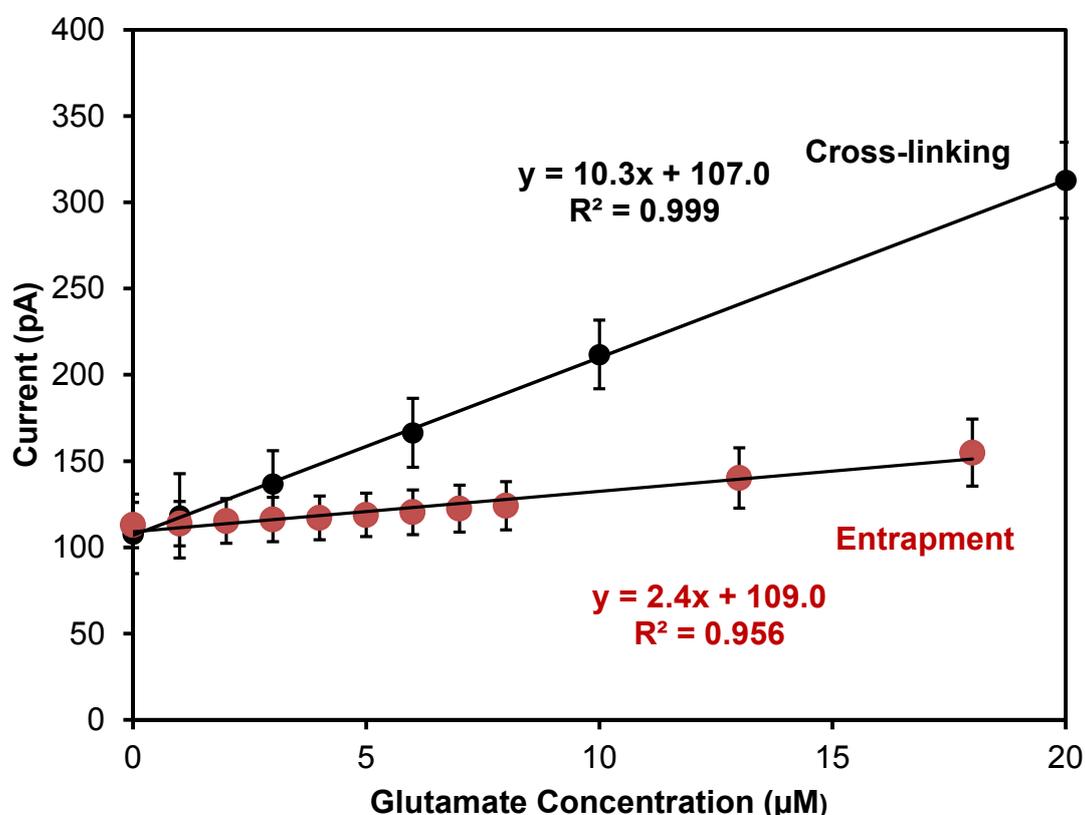


図 3-6: 酵素固定方法が異なる2つのセンサのグルタミン酸濃度と電流値の関係

・酵素固定量について

酵素の固定量がセンサの感度に及ぼす影響を検討するため、GluOx 固定量が異なる 2 つのセンサで *in vitro* 計測を行った。計測に用いた 1 つは 160units/ml 濃度の GluOx 溶液を用いて作製したセンサであり、他方は、その 2 倍量にあたる 320 units/ml 濃度の GluOx 溶液を用いて作製したセンサである。GluOx 固定量が異なるこの 2 つのセンサで計測したところ、両センサともにグルタミン酸と電流値の関係は高い直線性を示した (図 3-7)。検量線から求めた各センサのグルタミン酸に対する感度は 160units/ml センサで 10.4pA/ μ M (n=4) であったのに対し、320units/ml センサでは 14.1 pA/ μ M (n=4) と、その感度はおよそ 1.4 倍に上昇した。また、320units/ml センサについて算出された検出下限は 1.4 μ M であった。これは 160units/ml センサの検出下限 2.7 μ M を上回る性能であった。

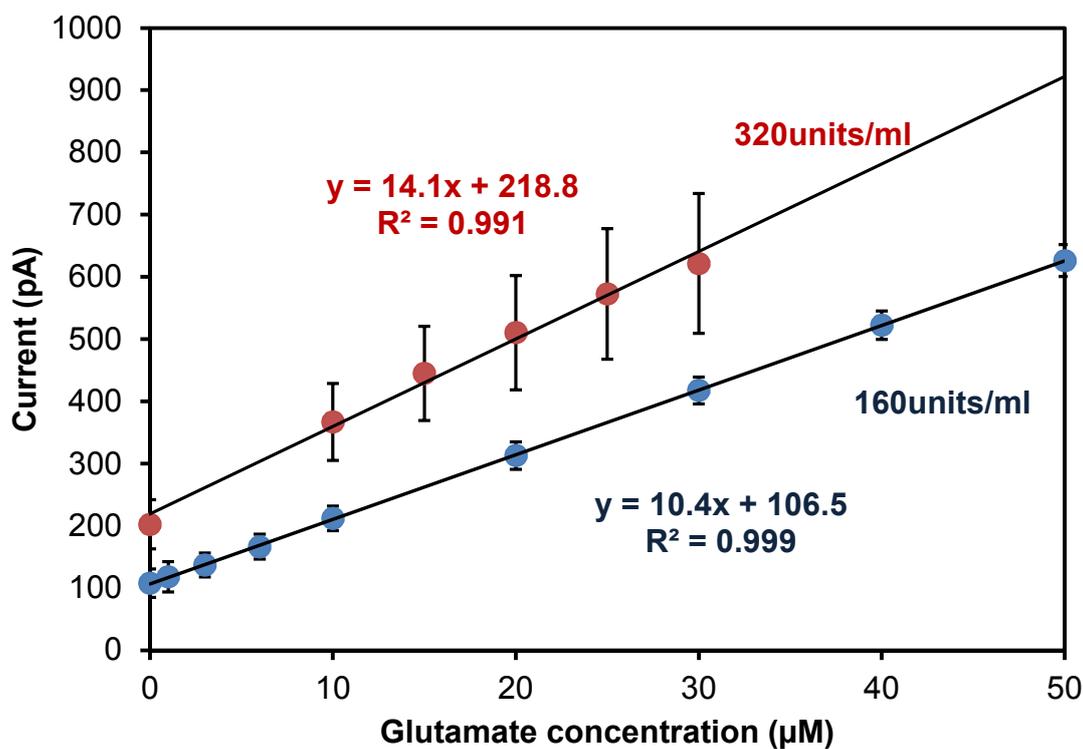


図 3-7: 酵素固定量が異なる 2 つのセンサのグルタミン酸濃度と電流値の関係

3.4 考察

・電極サイズおよび白金黒メッキの効果について

検証実験の結果から、 $20\mu\text{m}\times 20\mu\text{m}$ サイズ、 $50\mu\text{m}\times 50\mu\text{m}$ サイズともに電極表面に白金黒メッキを施すことで、本グルタミン酸センサの感度の向上が認められた。この現象は、酵素を用いたバイオセンサの応答電流量を記述した下記の 3.1 式によって説明できる[55]。

$$i = nFAC_bM \quad (3.1)$$

ここで、 i は応答電流量である。 n は酸化反応で生じる電子数である。 F はファラデー係数であり、 A は電極の表面積である。 C_b はバルク溶液濃度であり、 M は物質の移動時間である。

この式から、電極表面積の拡大によって、センサの応答電流量は増加することがわかる。したがって、白金黒メッキを施したセンサの感度向上は、白金黒メッキによって電極の表面積が拡大した結果であると考えられる。

バイオセンサの感度向上に、白金黒メッキが有用であることは先行研究でも報告されており[54][56]、本実験結果は先行研究結果を支持する。多くの場合、センサの微小化には、電極面積の減少がともない、それはセンサの感度の低下につながる。微小化にともなう、この感度の低下を、いかに補完あるいは向上させるかは、センサの微小化における一つの課題である。この課題の解決策として、白金黒メッキのみならず[54][56]、白金粒子[57]、シリコンナノワイヤー[55]、カーボンナノチューブ[58]などを電極表面へ固定することで電極表面積の拡大を図り、感度の向上させた研究報告がなされている。その中でも白金は、その触媒作用により、酵素による酸化反応の結果として発生する過酸化水素の酸化還元反応を促進する働きがある[56]。また、カーボンナノチューブに比べて安価である白金黒メッキは、微小なセンサの感度向上に有用であると考えられる。

白金黒メッキは、センサの感度のみならず、検出下限にも影響を及ぼす。本実験の結果では、白金黒メッキを施したことで、 $20\mu\text{m}\times 20\mu\text{m}$ サイズのセンサの検出下限は $3.1\mu\text{M}$ から $1.3\mu\text{M}$ へ向上したものの、 $50\mu\text{m}\times 50\mu\text{m}$ サイズのセンサでは、その検出下限は $1.3\mu\text{M}$ から $3.2\mu\text{M}$ へと低下した。白金黒メッキは感度を向上させると同時に、ノイズレベルも増加させる。 $50\mu\text{m}\times 50\mu\text{m}$ サイズのセンサの感度は、白金黒メッキによって 12 倍以上に向上したが、同時にノイズレベルは 30 倍に上昇した結果、検出下限は低下した。先行研究においても、電極表面積の拡大によってノイズレベルの上昇が認められるが、それ以上にセンサの感度が上昇するため、結果的に検出下限は向上している[55]。本実験においても $20\mu\text{m}\times 20\mu\text{m}$ サイズでは、その傾向が認められることから、 $50\mu\text{m}\times 50\mu\text{m}$ サイズのセンサにおいて望ましいメッキが出来なかった可能性がある。

Qiang らは、 300nm 厚の白金黒メッキを施す際に、 $12\mu\text{A}\cdot\text{mm}^{-2}$ の電流密度で 15 分間

のメッキを行っている。低電位で長時間のメッキを行うことで、電極を完全に覆うメッキが実現できると彼らは主張している[56]。本実験では、0.5Vで7秒間のメッキを行ったが、この方法で行った電極表面への白金黒メッキは不完全で脆いものだったのかもしれない。安静時の脳内の細胞外グルタミン酸濃度が1~5 μM であることから、50 μm ×50 μm サイズのセンサで示された3.2 μM の検出下限では不十分であり、メッキ方法のさらなる検討が必要である。

センサ感度の向上をもたらす白金黒メッキではあるが、この白金黒メッキが本センサの使用期限を制限する一因と疑われる。本センサの寿命は現状では1日程度に留まっている。酵素を用いたバイオセンサの使用期限は酵素の失活によることが一般的ではあるが、GluOxを固定したバイオセンサは少なくとも3日程度はその性能を維持することが報告されている[23]。最長では17日間の計測に成功した事例も報告されている[4]。本センサは実験中に突然計測不能に陥る場合があること、そして測定不能になったセンサの電極表面にはくぼみが観察される事例もあったことから、本センサの性能劣化の一因が電極表面にメッキした白金黒の脱離によるものと考えられる。

電極表面からの白金黒の脱離は、厚さ数十 nm 程度のパリレン薄膜で白金黒を覆うことで防げるのではないかと期待される。NishinakaらはPDMSの表面に銀を蒸着し、その表面に25~38nmの厚さのパリレンを蒸着した電極を作製している。銀表面に蒸着した厚さ30nm程度のパリレンはナノサイズの細孔を有する多孔質膜として働き、銀がPDMSから剥がれるのを防止すると同時に、電子の流れは妨げない。このように、彼らはパリレンの特性を活かした新たな活用方法を提案している[59]。彼らの方法を参考として、本センサの電極にメッキした白金黒の表面に数十 nm 厚のパリレンを蒸着することで、電極表面からの脱離を防止し、ひいては本センサの使用期限を延長できると期待される。

・酵素固定方法について

本研究では、包括法と架橋法の2つの酵素固定方法により電極表面へのGluOxの固定を行い、各固定法で作製したセンサのグルタミン酸への感度を比較した。本実験の結果では、架橋法で作製したセンサの感度が包括法で作製したセンサの感度の4倍以上の値を示した。包括法は架橋法と比べ電極と酵素の結合力が弱く、酵素が脱離することでセンサの感度が低下する[53]。本実験における包括法の感度の低さも、この結合力の弱さに起因すると考える。さらに、本センサでは包括法による酵素の固定前に、電極表面に固定した白金黒メッキが、包括法による酵素の固定をさらに弱めた可能性も考えられる。本実験の結果からは、白金黒メッキを施した本センサの電極面に対しては包括法よりも酵素の結合力が強い架橋法が適していると考えられる。

・酵素固定量について

GluOx の固定量を検討するため 160units/ml 濃度を基準に、その 2 倍量にあたる 320units/ml の酵素固定を試みた。固定量を増やしたことで感度は向上したが、その変化量は 1.4 倍に留まった。架橋法による固定手技のムラによる誤差とも考えられるが、試みた 2 倍量が既に電極に固定する量としては過剰な量に達しているとも考えられる。

今回試みた 2 倍量に限らず、さらに高濃度の GluOx を固定することで、さらに感度が向上する可能性はある。しかしながら、センサ作製の都合上、GluOx の濃度を上げると、溶液の粘度が上がるため、センサの微小な電極部へ GluOx を含む溶液を接触させる事が難しくなる。先行研究では、GluOx 溶液とそれを固定する微小なセンサとの親水性を高めるために GluOx 溶液に薬剤 (Triton X-100) を添加している[19]。その有効性について先行研究には記述されていないが、高濃度の GluOx 溶液を用いた固定を容易にする手段のひとつかもしれない。

酵素の固定量を増やすことは、センサ感度の向上にのみならず、センサの長寿命化にも寄与する。酵素を用いたバイオセンサは、電極に固定した酵素が次第に失活してゆくことで、その感度が低下する。電極表面への過剰な量の酵素固定は、この酵素失活による感度低下を遅らせると期待できる。

・要求性能についての検証

本研究で作製した柔軟型グルタミン酸センサの性能を、先行研究で報告されている主なグルタミン酸センサの性能と比較する。表 3-5 には、既存の主な基板型センサの性能を示すとともに、本センサの性能もあわせて示した。反応速度、検出下限については、本センサは既存のセンサと同等の性能を有している。グルタミン酸に対するセンサの感度でも既存のセンサと同等の性能を示すが、単位面積当たりの感度に換算して比較すると、本センサの感度は、既存のセンサよりも高い値を示した。センサ基板の微小化を図るために、本センサの電極面積は小さく設計した。設計した $50\mu\text{m} \times 50\mu\text{m}$ の電極面積のみでは、本センサに要求される感度を得られなかったが、電極に白金黒メッキを施すことで表面積を拡大し、さらに GluOx の固定量を増やすことで、既存のセンサよりも感度の高いグルタミン酸センサを作製できた。

本研究で作製した柔軟型センサは感度以外の点でも、3.1 で述べた要求性能を満たしているとともに、既存のセンサと同等の性能を有していることから、先行研究と同様にラットの脳内において細胞外グルタミン酸濃度を計測しうると考えられる。

表 3-4: 作製したセンサの性能比較

Year	Author	Substrate	Response time (s)	Detection limit (μM)	Sensitivity ($\text{pA}/\mu\text{M}$)	Sensitivity ($\text{fA}/\mu\text{m}^2 / \mu\text{M}$)
2001	Burmeister et al. [15]	Ceramic	~ 1	0.98 ± 0.09	1.58 ± 0.24	0.6
2006	Day et al. [17]	Ceramic	~ 1	1.82 ± 0.17	16	3.2
2008	Wassum et al. [18]	Silicon	0.8 ± 0.2	0.79 ± 0.16	2.5 ± 0.5	0.5
2010	Frey et al. [19]	Silicon	6	0.42	9.9 ± 1.5	1.3
2012	Cao et al. [20]	polyimide	~ 2	0.25	22.3	2.2
2014	Weltin et al. [21]	polyimide	4.9 ± 1.9	0.22	205	2.2
2014	Kotake	parylene	~ 6	1.4	14.1	5.6

3.5 まとめ

本章では、2章でその作製について述べたパリレン C 製の柔軟型センサ基板を基に、柔軟型グルタミン酸センサを作製した。グルタミン酸センサとして求められる性能を満たすため、電極部に対する白金黒メッキの活用、電極への酵素の固定方法、電極に固定する酵素量の3点についてそれぞれ検討した。

3つの検証実験で用いたセンサの特徴とその性能を表3-5に示す。電極への白金黒メッキの有効性を検証したところ、白金黒メッキによる電極表面積の拡大がグルタミン酸センサの感度の向上に寄与することが明らかになった。さらに、電極表面にGluOxを固定する方法を検討し、包括法に比べて架橋法によってGluOxを固定したセンサが、感度と検出下限の点で優れていた。その後、架橋法によって電極に固定するGluOxの量が感度に及ぼす影響を検証した。その結果、GluOxの固定量を増やすことも感度向上に有用であることが判明した。これらの検証実験結果から、本センサの電極表面には白金黒メッキを施し、Nafion膜を成膜後に、その表面にGluOxを320units/ml含有する溶液でGluOxを固定することで、本センサに要求される性能を満たすことができた。そして、本研究で作製した柔軟型グルタミン酸センサは、先行研究で報告されているセンサと同等以上の性能を有し、脳内で想定される細胞外グルタミン酸の濃度を計測しうることが確認された。

表 3-5: 3つの検証実験に用いたセンサ種類一覧

	Electrode size ($\mu\text{m} \times \mu\text{m}$)	Platinum black	Enzyme immobilization method	Enzyme concentration (units/ml)	Sensitivity (pA/ μM)	Detection limit (μM)
1)	20×20	×	Entrapment	160	0.2	3.1
2)	20×20	○	Entrapment	160	1.0	1.3
3)	50×50	×	Entrapment	160	0.3	1.3
4)	50×50	○	Entrapment	160	3.6	3.2
5)	50×50	○	Cross-linking	160	10.4	2.7
6)	50×50	○	Cross-linking	320	14.1	1.4

第4章 生体内での柔軟型センサの性能検証

前章で実施した *in vitro* でのセンサの性能検証実験の結果を踏まえ、本章では作製した柔軟型グルタミン酸センサが生体の脳内でも機能するか検証する。

4.1 急性実験でのセンサ性能の検証

4.1.1 目的

身体動作に起因するノイズが発生しない麻酔下ラットを対象としたセンサの性能検証実験を行い、生体の脳内でのセンサ性能を検証する。

4.1.2 実験方法

・実験動物

本実験では実験対象動物として体重 250g~500g 程度の Wistar 系雄ラットを用いた。全ての動物実験は国内関連法規および東京大学動物実験実施マニュアルに準拠し、動物の苦痛の軽減などの原則に則って実施した。

・ガラスキャピラリーの付加

神経細胞外のカリウムイオンの増加は神経を脱分極させ、それが閾値を超えると活動電位が発生する。神経細胞のこの反応を利用し、生体外から脳へ塩化カリウムを注入することによって、その注入箇所周囲の神経細胞の神経終末からのグルタミン酸の放出を人為的に誘発することができる[23][15]。本実験では生体外からセンサ近傍へ塩化カリウム溶液を注入するためセンサにガラスキャピラリーを取り付けた。ガラスキャピラリーは外径 1mm のガラス管 (G-1, ナリシゲ) をプーラー (PB-7, ナリシゲ) で引き伸ばして作製した。センサへのガラスキャピラリーの取り付けは実体顕微鏡下で行い、エポキシ系接着剤 (エクセルエポ, セメダイン) によって固定した。

ガラスキャピラリーを取り付けたセンサを図 4-1 に示す。キャピラリー先端の直径は 50 μ m 程度とした。キャピラリーの先端は各センサから 150 μ m~300 μ m 程度の距離になるように設置した。

・グルタミン酸酸化酵素の固定

本実験に用いたセンサの作製方法、酵素の固定方法は前章に述べたそれと同様である。本実験では2種類のセンサを用いた。一方には 320units/ml 濃度の GluOx を固定し、他方には GluOx を含まず BSA とグルタルアルデヒドのみを固定した。

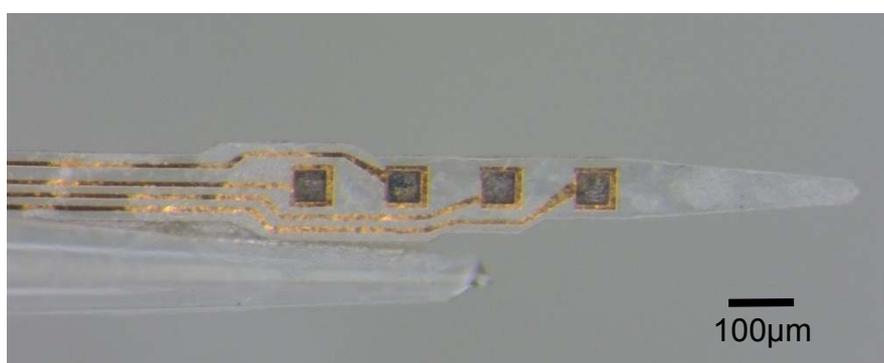


図 4-1： ガラスキャピラリー付のセンサ
上図は全体像，下図はセンサ先端の拡大像を示す。

・センサの *in vitro* キャリブレーション

生体内測定を実施するにあたり，センサは事前に *in vitro* でのキャリブレーションを行った．主な測定方法は前章に述べた方法と同様ではあるが，本キャリブレーションでは次の 2 種類のセンサを用いた 2 チャンネルの同時測定を行った．一方は電極に GluOx が塗布されたセンサであり，他方は GluOx が塗布されていないセンサである．この 2 種類のセンサを液中に設置した 10ml の生理食塩水に対し，既知の濃度のグルタミン酸溶液あるいは塩化カリウム溶液を滴下し，それに対するセンサの応答を電流値として記録した．

・脳へのセンサの刺入

本実験は麻酔下のラットを対象に実施した．麻酔は吸入麻酔薬であるイソフルランを用いた．麻酔導入後に脳部を剃毛し，イヤーパーを取り付けた上で脳定位装置（SR-8N，ナリシグ）にラットの頭部を固定した．実験中はラットの鼻付近にチューブを固定し，酸素とともに麻酔ガスを常時吸入させた．また，手術中および計測中はラットの身体下に使い捨てカイロを置き体温の保持に努めた．

脳へのセンサの刺入位置は脳定位アトラスを参考に[60]，Bregma から前方へ 2.7mm，

側方へ 1.5mm, 深さ 3.0mm とした (図 4-2). なお, この位置は前頭前皮質に該当し, グルタミン酸の活動が高くかつ応答が速い領域として報告している Burmeister らの研究に倣い決定した[23].

脳内へセンサを刺入するため, まずは頭部の皮膚を切開して頭蓋骨を露出させた. 次に顕微鏡を用いて刺入位置の基準となる Bregma を確認し, そこを基準にセンサを刺入する位置を頭蓋骨上に定め, 穿孔した. 頭蓋骨の穿孔には電動グラインダー (HP-300, 東洋アソシエイツ) を用いた. 脳表面にある硬膜はセンサ刺入の際の妨げとなるため, 注射針によってセンサの刺入位置付近を 2mm 程度切開した. 脳内へのセンサおよびガラスキャピラリーの刺入は目盛で進捗を確認しながら脳定位装置付属の手動マニピレータによって行われた.

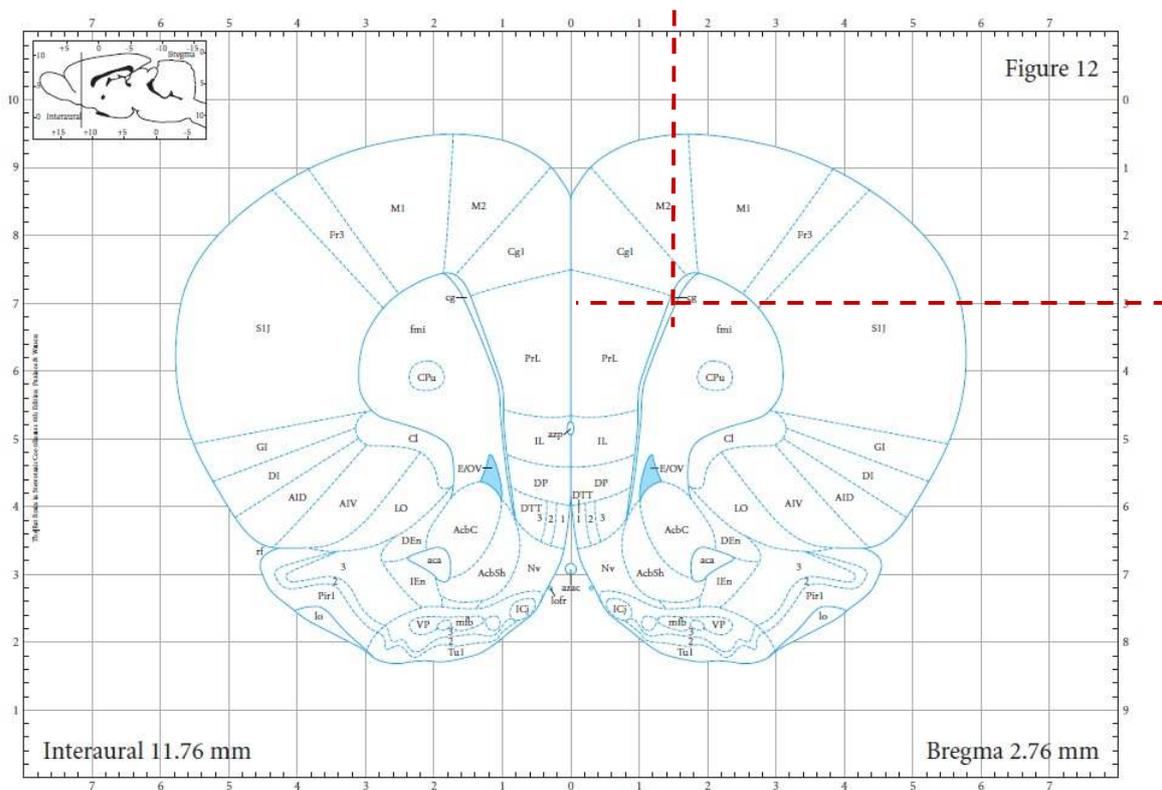


図 4-2 : センサの刺入位置 ([60]から)

刺入位置は AP: +2.7mm, ML: ±1.5mm, DV: -3.0mm とした.

・計測機器の構成と計測方法

計測機器の構成を図 4-3 に示す。脳内のグルタミン酸の計測にはポテンショスタット (ALS 802C, CH Instrument) を用いた。作用極, 対極, 参照電極の 3 極を用いたアンペロメトリー法によって計測し, 銀塩化銀電極に対して+0.7V の定電位を印加した。作用極として GluOx を塗布したセンサと, GluOx を塗布していないセンサの 2 つを脳内へ刺入し, それぞれのセンサを用いた 2 チャンネル同時計測を行った。対極とした白金線と, パリレン製の電極に銀塩化銀ペーストを塗布した参照電極は脳表面に配置した。

150mM に濃度調整した塩化カリウム溶液は 1ml シリンジ (1001LT, HAMILTON) に充填した上で電動シリンジポンプ (MSPE-3, アズワン) に備えられた。電動シリンジポンプのステッピングモーターの回転数とその駆動時間によって調整された注入量が所定のタイミングでガラスキャピラリーを通じて脳内のセンサ近傍へ注入された。



図 4-3 : 計測機器の構成

4.1.3 結果

・センサの in vitro キャリブレーション

実験に用いた 2 種類のセンサの事前 in vitro キャリブレーション結果を図 4-4 に示す。計測開始から 100 秒毎に 10 μ M, 5 μ M, 5 μ M に相当する量のグルタミン酸を順に注入し、次いで 400 秒時には 3mM 相当の塩化カリウムを注入した。その 100 秒後には改めて 10 μ M 相当のグルタミン酸を注入した。その結果、GluOx が塗布されたセンサにのみ、注入したグルタミン酸濃度に応じた電流値の上昇が認められ、その応答時間はいずれも 6 秒未満であった。さらに計測開始後 400 秒時に注入した塩化カリウムに対しては、どちらのセンサも電流値の上昇は観察されなかった。この結果から電極表面に GluOx が塗布されたセンサはグルタミン酸に対して特異的に反応し、塩化カリウムには応答しないことが確認された。

キャリブレーション結果から求めたグルタミン酸濃度と電流値の関係（検量線）を図 4-5 に示す。GluOx が塗布されたセンサは、計測を行った 0 μ M~30 μ M の範囲では、グルタミン酸濃度に応じて電流値が直線的に増加することが確認された。検量線から求められるグルタミン酸に対するセンサの感度は 15.8pA/ μ M, その検出下限は 0.3 μ M (S/N=3) と算出された。

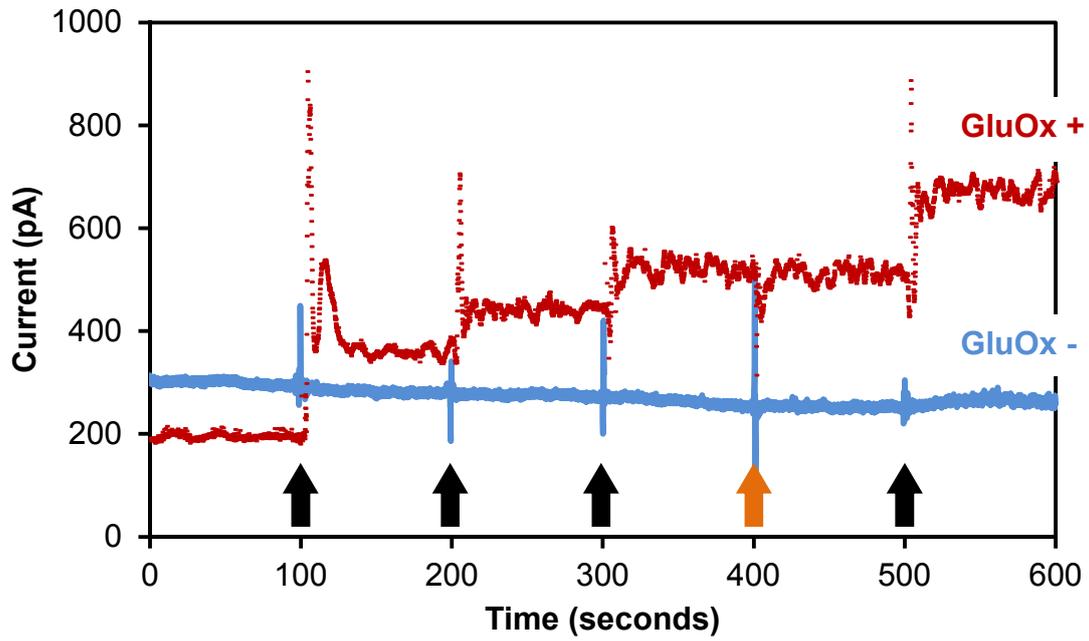


図 4-4 : in vitro キャリブレーション計測の結果
 矢印はそれぞれ黒色がグルタミン酸, オレンジ色は塩化カリウムの
 注入のタイミングを示す.

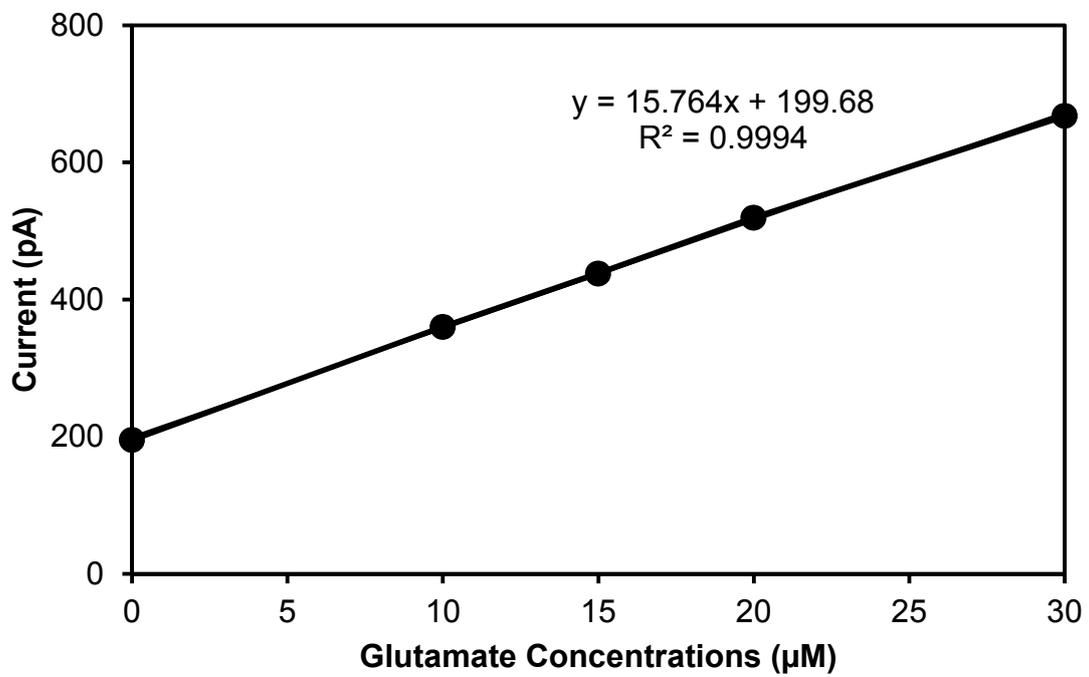


図 4-5 : グルタミン酸濃度と電流値の関係

・ in vivo 急性計測

麻酔下生体内計測において、生体内に留置した本センサのグルタミン酸に対する検出下限は $0.5\mu\text{M}$ (S/N=3) であった。これは塩化カリウム溶液注入以前に記録された電流値から求めた。

センサ近傍へ 150mM の塩化カリウムを注入した際のセンサの応答を図 4-6 に示す。計測開始から 200 秒後、500 秒後、1000 秒後に順に注入された $3.3\mu\text{l}$ 、 $6.7\mu\text{l}$ 、 $10.0\mu\text{l}$ の塩化カリウム溶液に対して、いずれも一時的な電流値下降の後に、それぞれ 114pA 、 196pA 、 406pA の電流値上昇が認められた。この電流値変化量を事前に *in vitro* で計測したセンサ感度 ($15.8\text{pA}/\mu\text{M}$) に基づきグルタミン酸濃度に換算すると、その増加量はそれぞれ $7.2\mu\text{M}$ 、 $12.4\mu\text{M}$ 、 $25.7\mu\text{M}$ に相当する。計測開始から 200 秒後に注入した $3.3\mu\text{l}$ を基準にその 2 倍量、3 倍量の塩化カリウムを順に注入したが、注入量の増加を受けて電流値の上昇量は比例的に増加するものの、その変化量には注入量が正確には反映されなかった (図 4-7)。

塩化カリウムの注入によって一時的に上昇した電流値は、その後、いずれの場合も時間の経過とともに次第に下降し、塩化カリウム注入前の水準に戻った。

なお、GluOx が固定されていないセンサでは、溶液の注入時に一時的な電流値の下降のみが観察された。

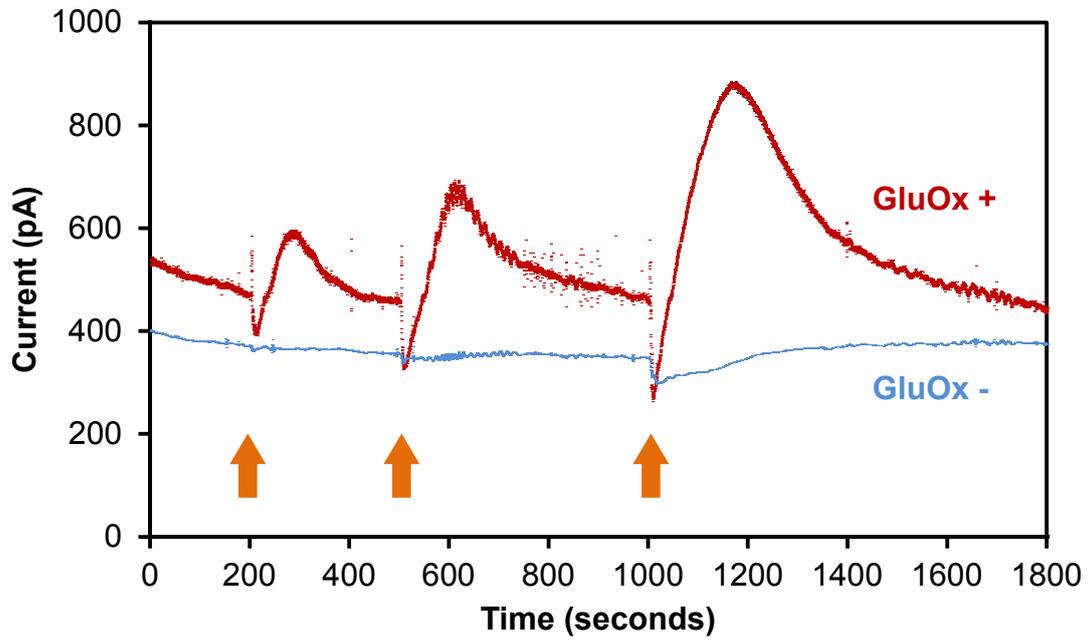


図 4-6 : 150mM 塩化カリウム注入に対するセンサ応答
 矢印は塩化カリウム注入のタイミングを示す。

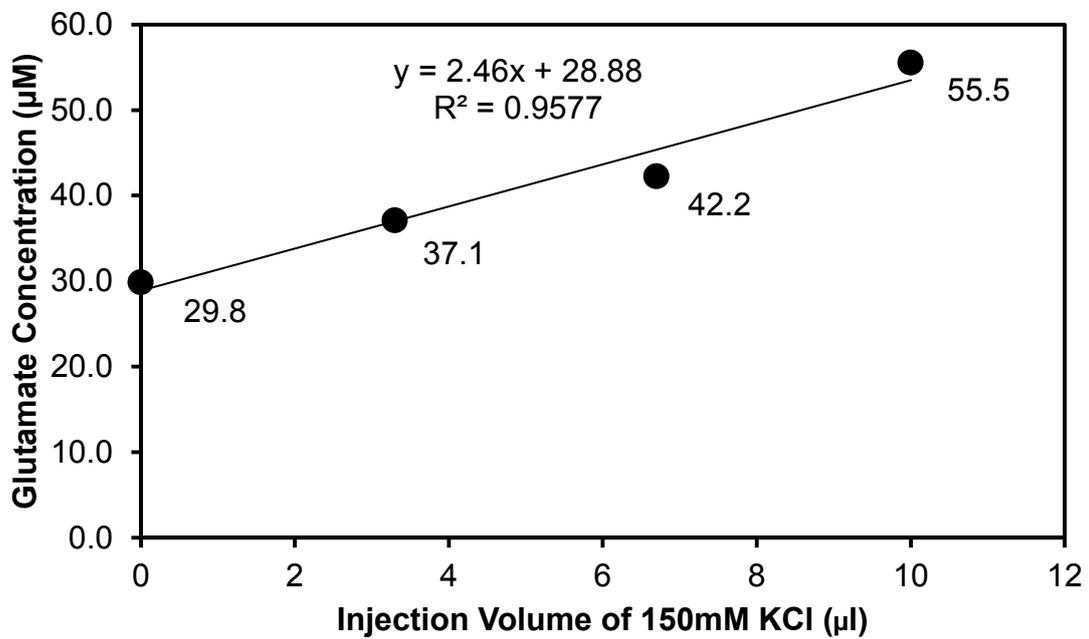


図 4-7 : 塩化カリウム注入量とグルタミン酸濃度の関係

4.2 模擬脳による検証実験

4.2.1 目的

前節では脳へ刺入したセンサ近傍への塩化カリウム注入に対するセンサの応答を観察した。記録されたセンサの応答が塩化カリウム注入によって誘発された神経細胞由来のグルタミン酸濃度の上昇を捉えた結果であるかを検証するため、模擬脳を用いて検証実験を行った。

4.2.2 実験方法

・ 模擬脳

本実験では 0.6% wt/v のアガロースゲルで作製した模擬脳内でのセンサの応答を観察した。0.6% wt/v のアガロースゲルから成る模擬脳は機械的特性が生体の脳と類似している [50]。この模擬脳はアガロース (Agarose S, ニッポン・ジーン) を生理食塩水 (大塚製薬) に溶解して加熱後、型に流し込み、室温にて冷却することで作製した。

・ 計測方法

計測には前節に記述した機器を用い、同様の計測環境を整えた。図 4-8 に模擬脳を用いた計測の様子を示した。模擬脳内には対極、参照極、そしてガラスキャピラリー付のセンサを刺入し、100 秒毎にガラスキャピラリーを通じてセンサ近傍へ 150mM の塩化カリウムを注入した。



図 4-8： 模擬脳における測定

4.2.3 結果

模擬脳へ刺入したセンサの近傍へ塩化カリウムを注入した際に記録された電流値を図4-9に示す。なお、センサの応答を比較するため、本計測の直前に記録された同一のセンサの生理食塩水中で観察されたグルタミン酸あるいは塩化カリウムに対する応答を合わせて示す。

まず、生理食塩水中で行った実験では、グルタミン酸の注入に対して電流値の上昇が認められたが、一方で塩化カリウムの注入に対しては電流値の上昇は認められなかった。

次に、模擬脳を用いた実験では、計測開始から100秒毎に3.3 μ l, 6.7 μ l, 10.0 μ l, 20.0 μ l, 20.0 μ lの150mM塩化カリウムを模擬脳内のセンサ近傍へ注入したが、いずれの注入についても電流値の変化は認められなかった。

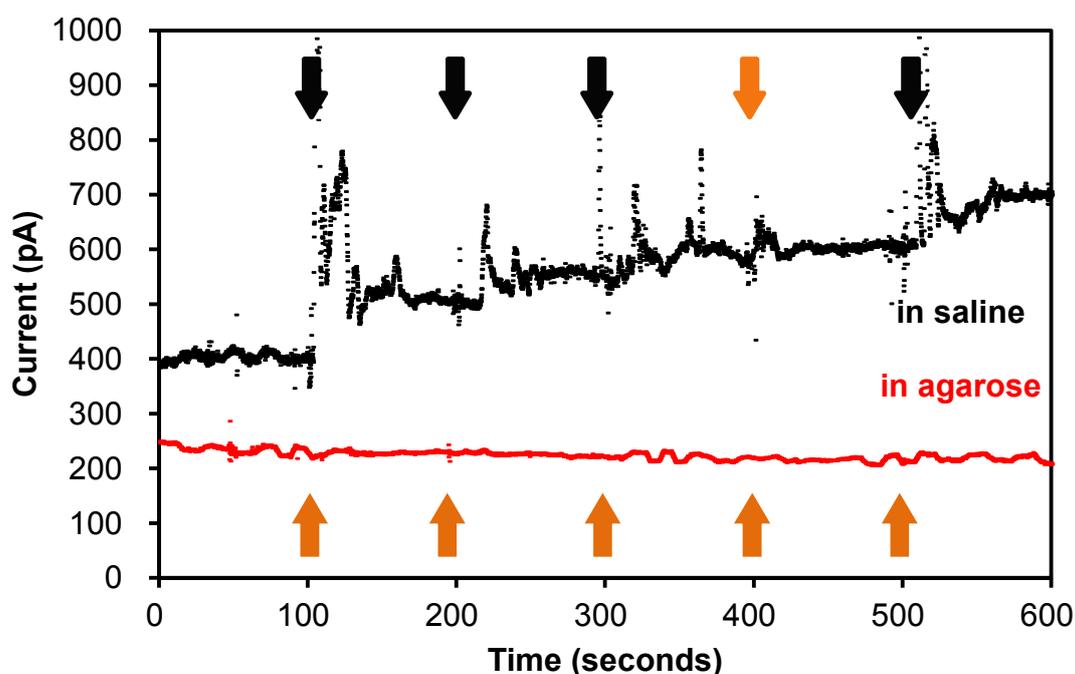


図4-9： 模擬脳内への塩化カリウム注入に対するセンサ応答
黒色矢印はグルタミン酸の注入を表し，オレンジ色矢印は塩化カリウムの注入を表す。

4.3 考察

・グルタミン酸検出下限

in vitro キャリブレーション時に記録された電流値から求めた本センサのグルタミン酸検出下限は $0.3\mu\text{M}$ 、そして、麻酔下ラットの脳内での計測では、その検出下限は $0.5\mu\text{M}$ であった。*in vivo* における検出下限が *in vitro* におけるそれよりも高い値を示したのは、*in vivo* 計測時の電流値には生体に由来するノイズが含まれていたためと考えられる。

また、前章で述べたセンサの性能検証実験では、本センサの *in vitro* での検出下限は最も良いもので $1.4\mu\text{M}$ であった。同様の作製方法であるにもかかわらず、この実験に用いたセンサの検出下限は *in vitro* において $0.3\mu\text{M}$ であり、前章で示したセンサの検出下限よりも優れていた。これは、作製したセンサの性能が均一ではない事を示している。均一な性能のセンサを作製するために、本センサの作製方法をより緻密にする必要がある。

脳内の細胞外グルタミン酸濃度を計測した先行研究を収集し、それらの計測結果を検討した Burmeister らの報告によると、安静時の脳内の細胞外グルタミン酸濃度は、グルタミン酸センサを用いた場合では $0.8\sim 45\mu\text{M}$ 、脳マイクロダイアリス法を用いた場合では $0.28\sim 29\mu\text{M}$ と示されている[52]。このように各先行研究で報告されている細胞外グルタミン酸濃度は異なり、その真の値には議論の余地がある。本センサの *in vivo* での検出下限は $0.5\mu\text{M}$ であったため、たとえ安静時の脳内の細胞外グルタミン酸濃度が $1\mu\text{M}$ 前後であったとしても、その濃度を検出できる。したがって、本センサは検出下限の点で、要求性能をほぼ達成していると言える。

・麻酔下脳内の細胞外グルタミン酸濃度

本実験では GluOx を固定したセンサと、GluOx を固定していないセンサの2種類を脳内へ刺入した。塩化カリウムを注入する前の両センサの電流値の差は、麻酔下ラットの脳内の細胞外グルタミン酸濃度を現していると考えられる。麻酔下の脳で記録された両センサの電流値の差から算出された細胞外のグルタミン酸濃度は $29.8\mu\text{M}$ である。本実験で計測されたこの値は、グルタミン酸センサを用いた先行研究で示されている値と類似している。例えば、Kulagina らは、麻酔下のラット線条体の細胞外グルタミン酸濃度を $29\pm 9.0\mu\text{M}$ と示している[14]。その他、Rutherford らは、覚醒下安静時のラット前頭前皮質の細胞外グルタミン酸濃度を $44.9\pm 4.7\mu\text{M}$ と報告している[4]。本実験で得られた値の妥当性を検証するには、実験数を増やす必要はあるものの、先行研究で報告されているこれらの計測結果は、本センサで得られた計測結果の妥当性を示している。

ラット脳内の細胞外グルタミン酸濃度については、議論が続いている。例えば、Day らは、麻酔下のラットの前頭前皮質の細胞外グルタミン酸濃度が $1.6\pm 0.3\mu\text{M}$ であったと報告している[17]。彼らが報告している値は、同領域で計測した本研究の計測結果の $1/20$ の濃

度である。一方、Dayらと同じ研究グループに属する Rutherford らの研究では、覚醒下安静時のラット前頭前皮質の細胞外グルタミン酸濃度が $44.9 \pm 4.7 \mu\text{M}$ であったと報告している[4]。彼らの研究グループ以外にも、ラット脳内の細胞外グルタミン酸濃度を計測した研究は数多く報告されているが、報告される値は様々で[16][14][22]、その見解は未だに一致していない。

報告されている脳内の細胞外グルタミン酸濃度が研究によって異なる理由は、次の4つに起因すると考えられている。1つは、各研究に用いたラットの種類によって、脳内の細胞外グルタミン酸濃度が異なる可能性である。Gerhardt らの研究グループは、麻酔下の Fischer 344 rat の前頭前皮質の細胞外グルタミン酸濃度を $1.6 \pm 0.3 \mu\text{M}$ と報告しているが[17]、Long Evans rat では安静時の前頭前皮質の細胞外グルタミン酸濃度を $34.7 \pm 11.8 \mu\text{M}$ あるいは $44.9 \pm 4.7 \mu\text{M}$ と報告している[4][61]。同型のグルタミン酸センサを使用する同一研究グループから報告されたこれらの研究結果からは、ラットの種類により細胞外グルタミン酸濃度が異なる可能性が示唆される。

2つ目は、脳の領野によって細胞外のグルタミン酸濃度が異なる可能性である。例えば、覚醒下ラットの前頭前皮質の細胞外グルタミン酸濃度を $44.9 \pm 4.7 \mu\text{M}$ と報告した Rutherford らは、同研究内で、あわせて線条体での細胞外グルタミン酸濃度を $7.3 \pm 0.9 \mu\text{M}$ と示し、脳の領野によって細胞外グルタミン酸濃度が異なることを報告している[4]。

3つ目は、麻酔の影響である。麻酔下のラットの脳内の細胞外グルタミン酸濃度は覚醒時と比べて低下するとみられている。先述した Day らと Rutherford らは同じ研究グループではあるが、両者が研究報告で示した細胞外グルタミン酸濃度は異なっている。この点に関して、覚醒下のラットの脳内への麻酔薬の注入によって、安静時の細胞外グルタミン酸濃度が注入前の値の58%に減少したことから、Rutherford らは両研究の細胞外グルタミン酸濃度の相違が麻酔の影響によるものと考察している[4]。

4つ目は、計測方法の違いによる影響である。グルタミン酸センサを用いて計測された細胞外グルタミン酸濃度は、マイクロダイアリシス法を用いて計測された値よりも高くなる傾向がある。これはグルタミン酸センサが次の2点でマイクロダイアリシスプローブと異なることに起因すると考えられている。まず、マイクロダイアリシスプローブに比べ、グルタミン酸センサは、グルタミン酸を放出するシナプスに近い位置でグルタミン酸を検出できる。そして、グルタミン酸センサはマイクロダイアリシスプローブに比べて小さく作製でき、脳内留置時のデバイス周囲の組織損傷が抑えられる。この2つの要因により、グルタミン酸センサでは、シナプス間隙から細胞外へ漏れ出たグルタミン酸が拡散し、希釈される前に検出できるため、計測される細胞外グルタミン酸濃度は、マイクロダイアリシス法で計測された値よりも大きくなると考えられている[61]。

これに関連して、Oldenziel らは、デバイス留置にともなうデバイス周囲の組織損傷が、計測される細胞外グルタミン酸の濃度に影響を及ぼす2つの可能性を考察している。デバイス留置で生じた組織損傷によって、前シナプスからのグルタミン酸の放出が阻害され

ば、結果として細胞外グルタミン酸濃度は低く計測される。他方で、組織損傷によって、細胞外のグルタミン酸の濃度調整を担うグルコーストランスポーターのグルタミン酸取り込み機能が悪化すれば、その結果として細胞外にグルタミン酸が蓄積し、計測される細胞外グルタミン酸濃度は高くなる[16]。この2つのどちらの状態であれ、正常な状態での細胞外グルタミン酸濃度を計測していないことになる。どちらも、その要因はデバイス留置にともなう周囲の組織損傷であることから、正常な状態における細胞外グルタミン酸濃度を計測するためにはデバイスの低侵襲化が求められる。したがって、低侵襲化を目指して開発した本センサは、より正常な状態での細胞外グルタミン酸濃度を計測できるものと期待される。

先行研究で示された安静時の細胞外グルタミン酸濃度は $1\mu\text{M}$ 程度～ $50\mu\text{M}$ 程度と幅があり、この値の違いについては先述した複数の要因が考察されている。先行研究で示されている値を大別すると、安静時の脳内の細胞外グルタミン酸濃度は $1\mu\text{M}$ ～ $5\mu\text{M}$ 程度とする見解と数十 μM 程度とする見解の2つに分けることができる。この2つのうち、本研究の計測結果は後者の見解を支持する。

・塩化カリウム注入に対するセンサの応答

本実験では脳内での計測前に、*in vitro* キャリブレーションによって本センサがグルタミン酸に特異的に反応し、塩化カリウムには応答しないことが確認されている。したがって、脳への塩化カリウム注入に対してセンサが示した電流値の上昇は、注入された塩化カリウムに誘発されて前シナプスから放出され、シナプス間隙から漏れ出たグルタミン酸を本センサで捉えていると考えられる。ただし、液中で実施しているキャリブレーションにおいては注入された塩化カリウムは速やかに拡散するのに対して、脳内に刺入したセンサ近傍へ注入された塩化カリウムが液中と同様に速やかに拡散するとは考えにくく、記録された電流値の上昇がセンサ近傍に蓄積した高濃度の塩化カリウムに対するセンサの応答である可能性は否定できない。そこで、模擬脳を用いた検証実験を行った。その結果、模擬脳内でもセンサ近傍へ注入された塩化カリウムに対してセンサが応答することはなかった。この検証実験結果は、脳内に刺入した本センサで検出した電流値の上昇が、塩化カリウムを捉えたものではなく、グルタミン酸を捉えたものであることを示唆する。

麻酔下ラットの脳内での計測実験では、脳内に留置した本センサの近傍へ 150mM の塩化カリウム溶液を3回注入した。1回目の注入量を基準に、その2倍量、次に3倍量を注入したところ、その注入量に比例して電流値の上昇量が増加した。これは、注入した塩化カリウムの量の増加によって、前シナプスに対する刺激が大きくなった。そして、刺激の増加によって、前シナプスから放出されたグルタミン酸の量が増え、細胞外のグルタミン酸濃度も上昇したのと考えられる。Oldenziel らも、脳内への塩化カリウムの注入に対してグルタミン酸センサによる同様の計測結果を示しており、その要因を前シナプスからの

グルタミン酸の放出のみならず，アストロサイトからのグルタミン酸の放出も細胞外のグルタミン酸濃度の上昇に関わっているであろうと考察している[16].

ここで，3回の塩化カリウム注入に対するセンサの反応時間について考える．図4-10にその量が異なる3つの塩化カリウム注入に対するセンサの応答を示す．各注入から電流値のピークまで約60秒～150秒を要している．上昇局面の傾きとして現される反応速度はそれぞれ3.3 μ lにおいて2.8pA/s，6.7 μ lにおいては3.8pA/s，そして10.0 μ lにおいて4.7pA/sであった．注入量の増加にともなって反応速度は増加する傾向にはあるが，注入から3秒以内に電流値のピークに達している先行研究の結果[17]と比較すると，本実験におけるセンサの反応は遅い．本センサは，*in vitro* キャリブレーションでは注入から6秒未満で電流値の上昇が認められている．そのため，脳内でのセンサの反応時間の遅れは，注入した塩化カリウムの量が影響していると考えられる．本実験で脳内に注入した塩化カリウム量は，先行研究で注入されている量の10倍以上であった．そのため，センサ周囲に必要な以上に溜まった塩化カリウムが，脳内グルタミン酸のセンサへの到達を遅らせた可能性が考えられる．

塩化カリウムの注入により上昇した電流値はいずれも，ピークを迎えた後に注入前の水準まで低下した．*in vitro* 計測では観察されなかったこの電流値の下降は，脳に留置したセンサ近傍におけるグルタミン酸濃度の低下過程を現している．シナプス間隙から細胞外へ漏出したグルタミン酸は，脳内で拡散するだけでなく，主にアストロサイトにある2種類のグルタミン酸トランスポーターによって取り込まれる[62]．アストロサイトのこの働きによって，脳内の細胞外グルタミン酸濃度は比較的低濃度に調節されているため，通常では脳内の細胞外グルタミン酸濃度が高濃度の状態にあり続けることはなく，過剰なグルタミン酸による神経細胞障害は生じない．

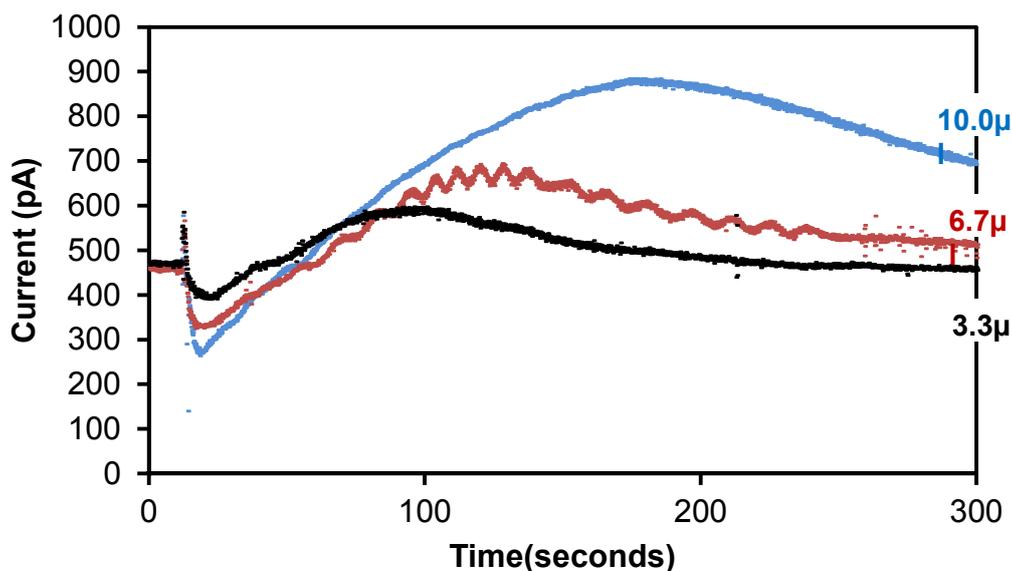


図4-10： 各塩化カリウム注入量に対するセンサの応答

・柔軟型グルタミン酸センサの有用性と応用先

麻酔下ラット脳内において、本センサの有用性を検証したところ、刺激前すなわち安静状態の細胞外グルタミン酸濃度を計測できたほか、ガラスキャピラリーを通してセンサ近傍へ注入した塩化カリウムに誘発されたとみられる細胞外のグルタミン酸濃度の変化を実時間で計測できた。これらの計測結果は本センサの脳内での有用性を示唆している。

生体の脳内で細胞外のグルタミン酸濃度を計測できた本センサは、グルタミン酸が関与する脳の異常や神経疾患における脳内グルタミン酸濃度変化のモニタリングや神経疾患の機序の解明に活用できる。例えば、脳虚血時には、脳内の細胞外グルタミン酸濃度が上昇し、その結果として周囲の神経細胞は過剰に興奮して、神経細胞障害が生じる[63]。脳内の細胞外グルタミン酸濃度の上昇は、脳虚血のみならず、統合失調症やうつ病、自閉症や強迫性障害などの精神疾患にも認められる現象である。低侵襲で安定した計測を目指した本センサを活用することで、こうした細胞外グルタミン酸濃度が関与する精神疾患と行動との関係性、あるいは、精神疾患に対する薬剤の影響を調べることもできると期待される。

他方で、本センサの新たな活用方法も提案されている。脳内の細胞外グルタミン酸濃度変化を実時間で長期安定的に計測できるようになれば、本センサは新たに BMI への活用が期待される。長谷川が、この点に言及している。従来の BMI は、神経の電気的信号を媒介する電氣的 BMI であるが、将来的には化学物質を媒介する化学的 BMI デバイスの登場が期待されている。脳の疾患の中には、脳の電氣的活動よりも化学的活動を観察した方がよい場合がある。こうした場合に、脳内の神経伝達物質を計測する本センサのようなデバイスを用いた化学的 BMI が有用な手法となる[64]。本センサを化学的 BMI に活用するためには、さらなる改良が必要ではあるが、本研究で目指してきた低侵襲かつ脳内の細胞外グルタミン酸の長期安定計測は、神経伝達物質を計測対象としたバイオセンサの新たな応用展開を創成すると期待される。

4.4 まとめ

本章では作製した柔軟型グルタミン酸センサが生体内でも有用であるかを検証した。麻酔下のラットの脳を対象に実施した *in vivo* 実験では、センサと共に脳内へ刺入したガラスキャピラリーを通じて 150mM の塩化カリウム溶液を注入した。塩化カリウムの注入を受けて、計測される電流値は上昇し、60~150 秒後に電流値のピークを迎え、その後は上昇前の値まで低下した。事前の *in vitro* キャリブレーションでは、本センサがグルタミン酸に特異的に反応し、塩化カリウムには反応しないことが確認されている。そのため、*in vivo* 実験で記録された電流値の上昇は、注入した塩化カリウムに誘発されて神経細胞から放出された細胞外のグルタミン酸を、本センサで検出していると考えられる。事前に求めた検量線に基づき記録された電流値変化量をグルタミン酸濃度に換算すると、その値は生体の脳内において妥当な濃度の範囲にあることがわかった。しかしながら、注入に対するセンサの反応時間は、先行研究の結果に示されたそれと比較すると遅い。*in vivo* におけるセンサの反応時間の遅さ、そして、センサが確かに生体由来のグルタミン酸を検出しているかについて、実験数を増やして検討を重ねる必要はあるものの、本実験の結果は、作製したパリレン製の柔軟型グルタミン酸センサの生体内での有用性を示唆する。

第 5 章 結論

本研究では、センサ留置にともなう脳組織の損傷を低減すると期待される柔軟なグルタミン酸センサを開発し、そのセンサによって脳内の細胞外グルタミン酸の濃度変化を観察した。本章ではこれまでに述べた各章をまとめ、本研究の結論とする。

第 1 章では、脳内のグルタミン酸濃度を計測するために用いられてきた計測手法が、特に低侵襲化の点で不十分であることを指摘し、その改善策として柔軟型グルタミン酸センサの必要性を論じた。

第 2 章では、まず、本研究で作製する柔軟型グルタミン酸センサの基板に要求される性能を検討した。そして、その性能を満たす基板材料としてパリレン C を採用し、あわせて基板構造を設計した。基板最小幅 $100\mu\text{m}$ 、基板厚 $20\mu\text{m}$ として設計および作製した柔軟型センサ基板が電気絶縁層として必要な性能を有し、微小でありながらも脳への刺入に必要な機械的強度を有していることが検証実験によって確認された。

第 3 章では、第 2 章において作製した柔軟型センサ基板を基に、グルタミン酸センサを作製した。具体的には、白金黒メッキの活用、酵素の固定方法、酵素の固定量がセンサの性能に及ぼす影響を実験的に検証した。作製した柔軟型グルタミン酸センサの検出下限は $1.4\mu\text{M}$ であり、その感度は $14.0\text{ pA}/\mu\text{M}$ まで向上した。特に単位面積当たりのセンサ感度は、既存の基板型グルタミン酸センサを上回る値を示し、作製した柔軟型グルタミン酸センサが、既存のセンサと同等以上の機能を有していることが確認された。

第 4 章では、第 3 章で作製した柔軟型グルタミン酸センサが生体の脳内でも有用であるかを *in vivo* 実験で検証した。麻酔下のラットの脳を対象に行った検証実験では、塩化カリウムの注入に対して電流値上昇が記録された。他方で、生理食塩水内あるいは模擬脳内での検証では、本センサは塩化カリウムに対して応答しないことが確認されている。したがって、ラットの脳内で観察されたこの電流値の上昇は、ガラスキャピラリーを通じて脳内へ注入された塩化カリウムによって誘発された神経細胞からのグルタミン酸の放出を、本グルタミン酸センサによって捉えているものと示唆される。

以上の結果から、本研究では、低侵襲化を実現しうる柔軟型グルタミン酸センサを設計および作製し、それがグルタミン酸センサとして優れた性能を有することを *in vitro* で確認した。さらに、生体の脳内でも細胞外のグルタミン酸濃度を計測しうることを実証し、本センサの有用性を示した。

謝辞

本稿を終えるにあたり，本研究をご指導いただきました情報理工学系研究科の満渕邦彦教授，星野隆行講師，深山理助教に感謝申し上げます．情報通信研究機構の鈴木隆文研究員（当時，情報理工学系研究科講師）には，MEMSに関することを中心に研究の初歩からご指導をいただき，研究室内のMEMS実験環境の整備に至るまで様々な点でサポートをいただきました．感謝申し上げます．

副査をお引き受けいただきました東京大学先端科学技術研究センターの生田幸士教授，高橋宏知講師にはご指導，ご助言をいただきましたことに感謝申し上げます．

東京大学生産技術研究所の竹内昌治教授にはご指導，ご助言いただくとともに，同研究室の実験装置を快く使わせていただきました．感謝申し上げます．

また，我妻玲研究員には，研究についてのご助言のみならず，様々な点で相談にのっていただきました．長らく研究室に在籍したので，ともに研究室で過ごした研究員，先輩，同輩，後輩が多く，お一方ずつ名前を挙げることはできません．日々の議論から雑談まで非常にお世話になりました．御礼申し上げます．

安原麻理さん，久保山優子さん，芥川彩子さんには，研究室の運営や生活面で大変お世話になりました．

すべての方のお名前を挙げることはできませんが，多くの方々に支えていただいたお陰で，本論文をまとめることができました．皆様に心より感謝申し上げます．

参考文献

- [1] “IDF Diabetes Atlas - 2014 update,” 2014.
- [2] L. C. Clark and C. Lyons, “Electrode systems for continuous monitoring in cardiovascular surgery,” *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, vol. 102, no. 1, pp. 29–45, 1962.
- [3] D. A. Gough, L. S. Kumosa, T. L. Routh, J. T. Lin, and J. Y. Lucisano, “Function of an implanted tissue glucose sensor for more than 1 year in animals.,” *Sci. Transl. Med.*, vol. 2, no. 42, p. 42ra53, 2010.
- [4] E. C. Rutherford, F. Pomerleau, P. Huettl, I. Strömberg, and G. a. Gerhardt, “Chronic second-by-second measures of L-glutamate in the central nervous system of freely moving rats,” *J. Neurochem.*, vol. 102, no. 3, pp. 712–722, 2007.
- [5] J. M. Hinzman, T. C. Thomas, J. J. Burmeister, J. E. Quintero, P. Huettl, F. Pomerleau, G. a Gerhardt, and J. Lifshitz, “Diffuse brain injury elevates tonic glutamate levels and potassium-evoked glutamate release in discrete brain regions at two days post-injury: an enzyme-based microelectrode array study.,” *J. Neurotrauma*, vol. 27, no. 5, pp. 889–899, 2010.
- [6] R. Chamoun, D. Suki, S. P. Gopinath, J. C. Goodman, and C. Robertson, “Role of extracellular glutamate measured by cerebral microdialysis in severe traumatic brain injury.,” *J. Neurosurg.*, vol. 113, no. 3, pp. 564–570, 2010.
- [7] N. C. Danbolt, “Glutamate uptake.,” *Prog. Neurobiol.*, vol. 65, no. 1, pp. 1–105, 2001.
- [8] S. N. Bito L, Davson H, Levin E, Murray M, “The concentrations of free amino acids and other electrolytes in cerebrospinal fluid, in vivo dialysate of brain, and blood plasma of the dog.,” *J. Neurochem.*, vol. 13, no. 11, pp. 1057–1067, 1966.
- [9] M. M. Tisdall and M. Smith, “Cerebral microdialysis: Research technique or clinical tool,” *Br. J. Anaesth.*, vol. 97, no. 1, pp. 18–25, 2006.

- [10] M. Wang, "Collection of nanoliter microdialysate fractions in plugs for off-line in vivo chemical monitoring with up to 2 s temporal resolution," *J Neurosci Methods*, vol. 190, no. 1, pp. 39–48, 2010.
- [11] K. L. Clapp-Lilly, R. C. Roberts, L. K. Duffy, K. P. Irons, Y. Hu, and K. L. Drew, "An ultrastructural analysis of tissue surrounding a microdialysis probe," *J Neurosci. Methods*, vol. 90, no. 2, pp. 129–142, 1999.
- [12] T.-H. Tsai, "Assaying protein-unbound drugs using microdialysis techniques," in *Handbook of Microdialysis*, 2007, pp. 573–587.
- [13] Y. Hu, K. M. Mitchell, F. N. Albahadily, E. K. Michaelis, and G. S. Wilson, "Direct measurement of glutamate release in the brain using a dual enzyme-based electrochemical sensor.," *Brain Res.*, vol. 659, no. 1–2, pp. 117–125, 1994.
- [14] N. V. Kulagina, L. Shankar, and A. C. Michael, "Monitoring glutamate and ascorbate in the extracellular space of brain tissue with electrochemical microsensors," *Anal. Chem.*, vol. 71, no. 22, pp. 5093–5100, 1999.
- [15] J. J. Burmeister and G. a. Gerhardt, "Self-referencing ceramic-based multisite microelectrodes for the detection and elimination of interferences from the measurement of L-glutamate and other analytes," *Anal. Chem.*, vol. 73, no. 5, pp. 1037–1042, 2001.
- [16] W. H. Oldenzil, G. Dijkstra, T. I. F. H. Cremers, and B. H. C. Westerink, "In vivo monitoring of extracellular glutamate in the brain with a microsensor," *Brain Res.*, vol. 1118, no. 1, pp. 34–42, 2006.
- [17] B. K. Day, F. Pomerleau, J. J. Burmeister, P. Huettl, and G. a. Gerhardt, "Microelectrode array studies of basal and potassium-evoked release of L-glutamate in the anesthetized rat brain," *J. Neurochem.*, vol. 96, no. 6, pp. 1626–1635, 2006.
- [18] K. M. Wassum, V. M. Tolosa, J. Wang, E. Walker, H. G. Monbouquette, and N. T. Maidment, "Silicon wafer-based platinum microelectrode array biosensor for near real-time measurement of glutamate in vivo," *Sensors*, vol. 8, no. 8, pp. 5023–5036, 2008.

- [19] O. Frey, T. Holtzman, R. M. Mcnamara, D. E. H. Theobald, P. D. van der Wal, N. F. de Rooij, J. W. Dalley, and M. Koudelka-Hep, "Enzyme-based choline and l-glutamate biosensor electrodes on silicon microprobe arrays," *Biosens. Bioelectron.*, vol. 26, no. 2, pp. 477–484, 2010.
- [20] H. Cao, A. L. Li, C. M. Nguyen, Y. B. Peng, and J. C. Chiao, "An integrated flexible implantable micro-probe for sensing neurotransmitters," *IEEE Sens. J.*, vol. 12, no. 5, pp. 1618–1624, 2012.
- [21] A. Weltin, J. Kieninger, B. Enderle, A.-K. Gellner, B. Fritsch, and G. a. Urban, "Polymer-based, flexible microsensors for glutamate and lactate for in vivo application," *Biosens. Bioelectron.*, vol. 61, pp. 192–199, 2014.
- [22] N. Vasylieva, C. Maucler, A. Meiller, H. Viscogliosi, T. Lieutaud, D. Barbier, and S. Marinesco, "Immobilization method to preserve enzyme specificity in biosensors: Consequences for brain glutamate detection," *Anal. Chem.*, vol. 85, no. 4, pp. 2507–2515, 2013.
- [23] J. J. Burmeister, K. Moxon, and G. a. Gerhardt, "Ceramic-based multisite microelectrodes for electrochemical recordings," *Anal. Chem.*, vol. 72, no. 1, pp. 187–192, 2000.
- [24] K. N. Hascup, E. R. Hascup, F. Pomerleau, P. Huettl, and G. a Gerhardt, "Second-by-second measures of L -glutamate in the prefrontal cortex and striatum of freely moving mice.," *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, vol. 324, no. 2, pp. 725–731, 2008.
- [25] V. M. Tolosa, K. M. Wassum, N. T. Maidment, and H. G. Monbouquette, "Electrochemically deposited iridium oxide reference electrode integrated with an electroenzymatic glutamate sensor on a multi-electrode array microprobe," *Biosens. Bioelectron.*, vol. 42, no. 1, pp. 256–260, 2013.
- [26] J. T. W. Kuo, B. J. Kim, S. a Hara, C. D. Lee, C. a Gutierrez, T. Q. Hoang, and E. Meng, "Novel flexible Parylene neural probe with 3D sheath structure for enhancing tissue integration.," *Lab Chip*, vol. 13, no. 4, pp. 554–61, 2013.

- [27] B. A. Wester, R. H. Lee, and M. C. LaPlaca, "Development and characterization of in vivo flexible electrodes compatible with large tissue displacements.," *J. Neural Eng.*, vol. 6, no. 2, p. 024002, 2009.
- [28] K. Lee, S. Massia, and J. He, "Biocompatible benzocyclobutene-based intracortical neural implant with surface modification," *J. Micromechanics Microengineering*, vol. 15, no. 11, pp. 2149–2155, 2005.
- [29] J. Wessberg, C. R. Stambaugh, J. D. Kralik, P. D. Beck, M. Laubach, J. K. Chapin, J. Kim, S. J. Biggs, M. A. Srinivasan, and M. A. L. Nicolelis, "Real-time prediction of hand trajectory by ensembles of cortical neurons in primates," *Nature*, vol. 408, pp. 361–365, 2000.
- [30] L. R. Hochberg, D. Bacher, B. Jarosiewicz, N. Y. Masse, J. D. Simeral, J. Vogel, S. Haddadin, J. Liu, S. S. Cash, P. van der Smagt, and J. P. Donoghue, "Reach and grasp by people with tetraplegia using a neurally controlled robotic arm," *Nature*, vol. 485, pp. 372–375, 2012.
- [31] J. C. Williams, R. L. Rennaker, and D. R. Kipke, "Long-term neural recording characteristics of wire microelectrode arrays implanted in cerebral cortex," *Brain Res. Protoc.*, vol. 4, no. 3, pp. 303–313, 1999.
- [32] D. R. Kipke, R. J. Vetter, J. C. Williams, and J. F. Hetke, "Silicon-substrate intracortical microelectrode arrays for long-term recording of neuronal spike activity in cerebral cortex," *IEEE Trans. Neural Syst. Rehabil. Eng.*, vol. 11, no. 2, pp. 151–155, 2003.
- [33] P. J. Rousche and R. A. Normann, "Chronic recording capability of the Utah Intracortical Electrode Array in cat sensory cortex," *J. Neurosci. Methods*, vol. 82, no. 1, pp. 1–15, 1998.
- [34] P. J. Rousche, D. S. Pellinen, D. P. Pivin, J. C. Williams, R. J. Vetter, and D. R. Kipke, "Flexible polyimide-based intracortical electrode arrays with bioactive capability," *IEEE Trans. Biomed. Eng.*, vol. 48, no. 3, pp. 361–370, 2001.
- [35] K.-K. Lee, J. He, A. Singh, S. Massia, G. Ehteshami, B. Kim, and G. Raupp, "Polyimide-based intracortical neural implant with improved structural stiffness," *J. Micromechanics Microengineering*, vol. 14, no. 1, pp. 32–37, 2003.

- [36] S. Metz, a. Bertsch, D. Bertrand, and P. Renaud, “Flexible polyimide probes with microelectrodes and embedded microfluidic channels for simultaneous drug delivery and multi-channel monitoring of bioelectric activity,” *Biosens. Bioelectron.*, vol. 19, no. 10, pp. 1309–1318, 2004.
- [37] K. C. Cheung, P. Renaud, H. Tanila, and K. Djupsund, “Flexible polyimide microelectrode array for in vivo recordings and current source density analysis,” *Biosens. Bioelectron.*, vol. 22, no. 8, pp. 1783–1790, 2007.
- [38] S. Takeuchi, D. Ziegler, Y. Yoshida, K. Mabuchi, and T. Suzuki, “Parylene flexible neural probes integrated with microfluidic channels,” *Lab Chip*, vol. 5, no. 5, pp. 519–523, 2005.
- [39] H. S. Sohal, A. Jackson, R. Jackson, G. J. Clowry, K. Vassilevski, A. O’Neill, and S. N. Baker, “The sinusoidal probe: a new approach to improve electrode longevity,” *Front. Neuroeng.*, vol. 7, no. April, p. 10, 2014.
- [40] Leigh R. Hochberg, M. D. Serruya, G. M. Friehs, J. A. Mukand, M. Saleh, A. H. Caplan, A. Branner, D. Chen, R. D. Penn, and J. P. Donoghue, “Neuronal ensemble control of prosthetic devices by a human with tetraplegia,” *Nature*, vol. 442, pp. 164–171, 2006.
- [41] E. G. R. Kim, J. K. John, H. Tu, Q. Zheng, J. Loeb, J. Zhang, and Y. Xu, “A hybrid silicon-parylene neural probe with locally flexible regions,” *Sensors Actuators, B Chem.*, vol. 195, pp. 416–422, 2014.
- [42] V. S. Polikov, P. a. Tresco, and W. M. Reichert, “Response of brain tissue to chronically implanted neural electrodes,” *J. Neurosci. Methods*, vol. 148, no. 1, pp. 1–18, 2005.
- [43] Y. Onuki, U. Bhardwaj, F. Papadimitrakopoulos, and D. J. Burgess, “A review of the biocompatibility of implantable devices: current challenges to overcome foreign body response,” *J. diabetes Sci. Technol.*, vol. 2, no. 6, pp. 1003–1015, 2008.
- [44] J. Subbaroyan, D. C. Martin, and D. R. Kipke, “A finite-element model of the mechanical effects of implantable microelectrodes in the cerebral cortex,” *J. Neural Eng.*, vol. 2, no. 4, pp. 103–113, 2005.

- [45] D. H. Szarowski, M. D. Andersen, S. Retterer, a. J. Spence, M. Isaacson, H. G. Craighead, J. N. Turner, and W. Shain, “Brain responses to micro-machined silicon devices,” *Brain Res.*, vol. 983, no. 1–2, pp. 23–35, 2003.
- [46] T. T. C. Tseng and H. G. Monbouquette, “Implantable microprobe with arrayed microsensors for combined amperometric monitoring of the neurotransmitters, glutamate and dopamine,” *J. Electroanal. Chem.*, vol. 682, pp. 141–146, 2012.
- [47] T. Suzuki, K. Mabuchi, and S. Takeuchi, “A 3D flexible parylene probe array for multichannel neural recording,” *First Int. IEEE EMBS Conf. Neural Eng. 2003. Conf. Proceedings.*, pp. 154–156, 2003.
- [48] W. Jensen, K. Yoshida, and U. G. Hofmann, “In-vivo implant mechanics of flexible, silicon-based ACREO microelectrode arrays in rat cerebral cortex,” *IEEE Trans. Biomed. Eng.*, vol. 53, no. 5, pp. 934–940, 2006.
- [49] J. M. Hsu, L. Rieth, R. a. Normann, P. Tathireddy, and F. Solzbacher, “Encapsulation of an integrated neural interface device with parylene C,” *IEEE Trans. Biomed. Eng.*, vol. 56, no. 1, pp. 23–29, 2009.
- [50] C. P. Foley, N. Nishimura, K. B. Neeves, C. B. Schaffer, and W. L. Olbricht, “Flexible microfluidic devices supported by biodegradable insertion scaffolds for convection-enhanced neural drug delivery,” *Biomed. Microdevices*, vol. 11, no. 4, pp. 915–924, 2009.
- [51] Y. Okubo and M. Iino, “Visualization of glutamate as a volume transmitter,” *J. Physiol.*, vol. 589, no. 3, pp. 481–488, 2011.
- [52] J. J. Burmeister, V. a. Davis, J. E. Quintero, F. Pomerleau, P. Huettl, and G. a. Gerhardt, “Glutaraldehyde cross-linked glutamate oxidase coated microelectrode arrays: Selectivity and resting levels of glutamate in the CNS,” *ACS Chem. Neurosci.*, vol. 4, no. 5, pp. 721–728, 2013.
- [53] 鈴木一路, 吉田章一郎, 渡辺正, “導電性ポリマーを用いるバイオセンサー,” *生産研究*, vol. 48, no. 3, pp. 28–33, 1996.

- [54] Y. Ikariyama, S. Yamauchi, T. Yukiashi, and H. Ushioda, "Surface control of platinized platinum as a transducer matrix for micro-enzyme electrodes," *J. Electroanal. Chem. Interfacial Electrochem.*, vol. 251, no. 2, pp. 267–274, 1988.
- [55] H. Cao and J.-C. Chiao, "Nanowire Modification to Enhance the Performance of Neurotransmitter Sensors," *J. Nanotechnol. Eng. Med.*, vol. 1, no. 4, p. 041006, 2010.
- [56] L. Qiang, S. Vaddiraju, J. F. Rusling, and F. Papadimitrakopoulos, "Highly sensitive and reusable Pt-black microfluidic electrodes for long-term electrochemical sensing," *Biosens. Bioelectron.*, vol. 26, no. 2, pp. 682–688, 2010.
- [57] L. Qiang, S. Vaddiraju, D. Patel, and F. Papadimitrakopoulos, "Edge-plane microwire electrodes for highly sensitive H₂O₂ and glucose detection," *Biosens. Bioelectron.*, vol. 26, no. 9, pp. 3755–3760, 2011.
- [58] R. J. Yu X, Munge B, Patel V, Jensen G, Bhirde A, Gong JD, Kim SN, Gillespie J, Gutkind JS, Papadimitrakopoulos F, "Carbon nanotube amplification strategies for highly sensitive immunodetection of cancer biomarkers.," *J Am Chem Soc.*, vol. 128, no. 34, pp. 11199–11205, 2006.
- [59] Y. Nishinaka, R. Jun, G. S. Prihandana, and N. Miki, "Fabrication of Polymer Microneedle Electrodes Coated with Nanoporous Parylene," *Jpn. J. Appl. Phys.*, vol. 52, no. 6, p. UNSP 06GL10, 2013.
- [60] Paxinos & Watson, *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates, 6th Edition*. 2006.
- [61] E. R. Hascup, K. N. Hascup, M. Stephens, F. Pomerleau, P. Huettl, A. Gratton, and G. a. Gerhardt, "Rapid microelectrode measurements and the origin and regulation of extracellular glutamate in rat prefrontal cortex," *J. Neurochem.*, vol. 115, pp. 1608–1620, 2010.
- [62] 田中光一, "グルタミン酸と精神疾患: モノアミンを超えて," *日本薬理学雑誌*, vol. 142, pp. 1–6, 2013.
- [63] S. Asai, Y. Iribe, T. Kohno, and K. Ishikawa, "Real time monitoring of biphasic glutamate release using dialysis electrode in rat acute brain ischemia.," *Neuroreport*, vol. 7, pp. 1092–1096, 1996.

- [64] 長谷川良平, “ブレイン-マシン インタフェースの現状と将来,” 電子情報通信学会誌, vol. 91, no. 12, pp. 1066–1075, 2008.

研究業績

First Author のもの

国際会議

- 1) N. Kotake, T. Suzuki, O. Fukayama, K. Mabuchi: A Flexible Parylene-based Glutamate Sensor, Proc. of the 5th International IEEE EMBS Conference on Neural Engineering, 314-316 (2011)
- 2) N. Kotake, T. Suzuki, O. Fukayama, S. Takeuchi, K. Mabuchi: Preliminary development of parylene flexible sensor for glutamate detection, Neuroscience2010 (2010)
- 3) N. Kotake, T. Suzuki, O. Fukayama, S. Takeuchi, K. Mabuchi: Preliminary development of parylene flexible sensor for glutamate detection, Neuroscience2009 (2009)
- 4) N. Kotake, T. Suzuki, K. Mabuchi, S. Takeuchi: A flexible parylene neural probe combined with a microdialysis membrane, Proc. of microTAS2008, 1687-1687 (2008)

国内発表

- 1) N. Kotake, T. Suzuki, K. Mabuchi: Development of in vivo flexible sensors for glutamate detection, Proceedings of Life Engineering Symposium 2015, 145-147 (2015)
- 2) N. Kotake, T. Suzuki, O. Fukayama, S. Takeuchi, K. Mabuchi: Development and Characterization of flexible L-glutamate biosensor, 第 49 回日本生体医工学会大会論文集, 48 (2010)
- 3) 小竹直樹, 深山理, 鈴木隆文, 竹内昌治, 満洲邦彦: Parylene を用いた柔軟型グルタミン酸センサの試作, 電気学会研究会資料(医用・生体工学研究会), 35-38 (2009)
- 4) 小竹直樹, 深山理, 鈴木隆文, 竹内昌治, 満洲邦彦: MEMS テトロードの立体化の検討, 第 23 回生体・生理工学シンポジウム論文集, 51-52 (2008)
- 5) 小竹直樹, 鈴木隆文, 竹内昌治, 満洲邦彦: マイクロダイアリス機能を付加した神経電極の試作, 生体医工学, 46 suppl.1, 235 (2008)
- 6) 小竹直樹, 鈴木隆文, 満洲邦彦, 竹内昌治: 神経電極へのマイクロダイアリス機能付加の試み, 電気学会研究会資料(医用・生体工学研究会), 19-20 (2008)
- 7) 小竹直樹, 鈴木隆文, 竹内昌治, 満洲邦彦: 流路を備えた神経電極のマイクロダイアリスへの応用, 電気学会 電子・情報・システム部門大会, 229-230 (2007)

First Author 以外のもの

論文

- 1) 高山 祐三, 森口 裕之, 小竹 直樹, 鈴木 隆文, 満洲 邦彦, 神保 泰彦, "神経ネットワークの in vitro 再構成", 生体医工学, 51, 3, 186-190 (2013)
- 2) Y. Takayama, N. Kotake, T. Haga, T. Suzuki, K. Mabuchi: Formation of one-way-structured cultured neuronal networks in microfluidic devices combining with micropatterning techniques, Journal of Bioscience and Bioengineering, 114(1), 92-95 (2012)
- 3) A. Wagatsuma, M. Shiozuka, N. Kotake, K. Takayuki, H. Yusuke, K. Mabuchi, R. Matsuda, S. Yamada: Pharmacological inhibition of HSP90 activity negatively modulates myogenic differentiation and cell survival in C2C12 cells, Molecular and Cellular Biochemistry, 358, 265-280 (2011)
- 4) A. Wagatsuma, N. Kotake, K. Mabuchi, S. Yamada: Expression of nuclear-encoded genes involved in mitochondrial biogenesis and dynamics in experimentally denervated muscle, Journal of Physiology and Biochemistry, 67, 359-370 (2011)
- 5) A. Wagatsuma, N. Kotake, T. Kawachi, M. Shiozuka, S. Yamada, R. Matsuda: Mitochondrial adaptations in skeletal muscle to hindlimb unloading, Molecular and Cellular Biochemistry, 350, 1-11 (2011)
- 6) A. Wagatsuma, N. Kotake, S. Yamada: Muscle regeneration occurs to coincide with mitochondrial biogenesis, Molecular and Cellular Biochemistry, 349, 139-147 (2011)
- 7) A. Wagatsuma, N. Kotake, S. Yamada: Spatial and temporal expression of hypoxia-inducible factor-1 α during myogenesis in vivo and in vitro, Molecular and Cellular Biochemistry, 347, 145-155 (2011)
- 8) 鈴木隆文, 小竹直樹, 満洲邦彦, 竹内昌治: 束状微小流路を利用した神経再生型電極の開発, 電気学会論文誌 C, 127(10), 1544-1548 (2007)
(translated to "T. Suzuki, N. Kotake, K. Mabuchi, S. Takeuchi: Regeneration-Type Nerve Electrode Using Bundled Microfluidic Channels, Electronics and Communications in Japan, 92 (4), 29-34 (2009)")

国際会議

- 1) Y. Takayama, N. Kotake, T. Haga, T. Suzuki, K. Mabuchi: Microfabrication and Microfluidics-Based Patterning of Cultured Neuronal Network, Proc. of 33rd Annual International Conference of the IEEE EMBS, 3613-3616 (2011)
- 2) N. Miyakawa, K. Majima, H. Sawahata, K. Kawasaki, N. Kotake, T. Matsuo, T. Suzuki, Y. Kamitani, I. Hasegawa: Category representation in macaque anterior inferotemporal cortex revealed with simultaneous electrocorticogram and multi-channel unit recording, Neuroscience2011 (2011)
- 3) T. Suzuki, N. Kotake, O. Fukayama, S. Takeuchi, H. Watanabe, T. Isa, H. Sawahata, H. Toda, I. Hasegawa, K. Mabuchi: Improvement of a flexible Parylene ECoG electrode for long-term stable recording, Neuroscience2010 (2010)

- 4) R. Gojo, N. Kotake, T. Suzuki, K. Mabuchi, S. Takeuchi: A flexible regeneration microelectrode with cell-growth guidance, Proc of IEEE MEMS2009, 256-259 (2009)
- 5) T. Suzuki, N. Kotake, T. Kohama, O. Fukayama, K. Mabuchi: Study on brain adaptation using rat-machine fusion systems and multi functional neural electrodes, Proc. of the 3rd International Symposium on Mobiligence, 238-241 (2009)
- 6) T. Suzuki, N. Kotake, K. Mabuchi, S. Takeuchi: Bundled Microfluidic Channels for Nerve Regeneration Electrodes, Proc. of the 3rd International IEEE EMBS Conference on Neural Engineering, 17-18 (2007)
- 7) T. Suzuki, N. Kotake, K. Mabuchi, S. Takeuchi: Flexible regeneration-type nerve electrode with integrated micro fluidic channels, Proceeding of International Conference on Microtechnologies in Medicine and Biology, 303-305 (2006)

国内発表

- 1) N. Miyakawa, K. Majima, H. Sawahata, K. Kawasaki, T. Matsuo, N. Kotake, T. Suzuki, Y. Kamitani, I. Hasegawa: Category decoding from macaque anterior inferotemporal cortex with simultaneous electrocorticogram and multi-channel unit recording, 第 34 回日本神経科学大会 (2011)
- 2) H. Toda, H. Sawahata, T. Suzuki, N. Kotake, M. Horie, I. Hasegawa: Electrocorticographically distinguished multiple visual / auditory areas in rat temporal cortex with MEMS-based flexible electrode-meshes, 第 34 回日本神経科学大会 (2011)
- 3) N. Miyakawa, H. Sawahata, K. Majima, K. Kawasaki, T. Matsuo, N. Kotake, Y. Kamitani, T. Suzuki, I. Hasegawa: Category mapping of macaque anterior IT cortex using electrocorticogram (ECoG) array, 第 88 回日本生理学会大会 (2011) (査読有)
- 4) H. Sawahata, T. Suzuki, N. Kotake, K. Majima, Y. Kamitani, H. Toda, I. Hasegawa: Recording quality of a MEMS-based flexible electrode-mesh in vivo, Neuro2010 (第 33 回日本神経科学大会) (2010)
- 5) 鈴木隆文, 小竹直樹, 深山理, 満洲邦彦, 渡辺秀典, 坂谷智也, 伊佐正, 澤畑博人, 宮川尚久, 川寄圭祐, 戸田春男, 長谷川功: 柔軟皮質脳波電極の開発, 包括脳ネットワーク夏のワークショップ (2010)
- 6) 山崎博人, 小竹直樹, 伊藤孝佑, 鈴木隆文, 満洲邦彦: 流路構造を備えた神経再生型電極の開発～軸索再生の評価と電極配置の検討～, 第 24 回生体・生理工学シンポジウム, 173-174 (2009)
- 7) 鈴木隆文, 小竹直樹, 満洲邦彦, 竹内昌治: 束状微小流路を利用した神経再生型電極の開発, 電気学会論文誌 C, 127(10), 1544-1548 (2007) (査読有)
- 8) 満洲邦彦, 清田翔平, 鈴木隆文, 伊藤孝佑, 古沢竜志, 小竹直樹, 國本雅也: 感覚神経線維の電気刺激により生じる圧感覚強度の定量的検討及び皮膚圧受容器の機械的刺激時における神経活動パルス列を介した感覚強度 coding 則との比較, 第 19 回ニューログラム研究会, 2 (2006)
- 9) 鈴木隆文, 小竹直樹, 満洲邦彦, 竹内昌治: 微小流路を利用した神経再生型電極の開発, 第 21 回生体・生理工学シンポジウム論文集, 155-158 (2006)

付録 A

柔軟型センサ基板の作製工程

以下に、2枚のフォトマスクを用いて柔軟型センサ基板を作製する工程を示す。

1) 1層目のパリレン蒸着

01. パリレンコーター (PDS 2010, 日本パリレン) にて、直径 3 インチのシリコンウエハに膜厚 10 μ m のパリレン C を蒸着する。(膜厚 10 μ m : parylene-C ダイマー 7.7g)

2) 金の蒸着

02. 真空蒸着装置 (SVC-700, サンヨー電子) を用いて、パリレン C の上に金を蒸着する(膜厚 300nm : ϕ 1mm の金ワイヤー長さ 3.2cm. ウエハとワイヤーの距離は 10cm.)

3) 金配線のパターンニング

03. スピンコーター (MS-A150, ミカサ) により、金蒸着面にフォトレジスト (S1818, シップレイジャパン) をコートする。(設定 : 500rpm \cdot 10 秒, 3000rpm \cdot 30 秒)
04. 100 $^{\circ}$ C のホットプレートにて 2 分間温める。
05. マスクアライナ装置 (PEM-800, ユニオン光学) に金配線用のフォトマスク (ST-TLR6-TQZ-5009, 凸版印刷) をセットして紫外線露光する。(露光時間 : 8 秒間)
06. 露光後のフォトレジストを現像液 (NMD-3, 東京応化工業) にて現像する。
07. 純水にて 2 度洗浄し、ブロアーで乾燥させる。
08. 金エッチャント (AURUM302, 関東化学) を用いて配線部以外の金をエッチングする。
09. 純水にて 2 度洗浄し、ブロアーで乾燥させる。
10. アセトンとエタノールを用いて、ウエハに残るフォトレジストを除去する。
11. ブロアーで乾燥させる。

4) 2層目のパリレン蒸着

12. パリレン C 同士の接着性を向上させるため、酸素プラズマエッチング装置 (FA-1, サムコ) により、パリレン C 表面に対して 1 分間の酸素プラズマ処理を施す。(設定 : パワー 25W 酸素流量 10ml/分)
13. パリレンコーターにて、再びパリレン C 膜厚 10 μ m を蒸着する。(膜厚 10 μ m : parylene-C ダイマー 7.7g)

5) アルミニウムの蒸着

14. 真空蒸着装置を用いて、2層目のパリレン C 上にアルミニウムを蒸着する
(膜厚 100nm : ϕ 1mm のアルミニウムワイヤー長さは 1.6cm. ウエハとワイヤーの距離は 10cm.)

6) パリレンエッチング用アルミニウムマスクのパターニング

15. スピンコーターにより、アルミニウム表面に S1818 レジストをコートする。
(設定 : 500rpm \cdot 10 秒, 3000rpm \cdot 30 秒)
16. 100°C のホットプレートにて 2 分間温める.
17. マスクアライナ装置に電極基板用のフォトマスクをセットして紫外線露光する。
(露光時間 : 8 秒間)
18. 露光後のフォトレジストを NMD-3 にて素早く (1 分間以内) 現像する.
19. 純水にて 2 度洗浄し, ブロアーで乾燥させる.
20. 混酸アルミによってアルミ保護マスク以外のアルミニウムをエッチングする.
21. 純水にて 2 度洗浄し, ブロアーで乾燥させる.

7) パリレンのエッチング (電極基板の成形)

22. 酸素プラズマエッチング装置により, パリレンをエッチングする。
(設定 : パワー 25W 酸素流量 10ml/分 エッチング時間 75 分)

8) エッチング用アルミニウムの除去

23. アセトンとエタノールを用いて, ウエハに残るフォトレジストを除去する.
24. ブロアーで乾燥させる.
25. 混酸アルミによってエッチング用のアルミニウムを除去する.
26. 純水にて 2 度洗浄し, ブロアーで乾燥させる.

9) 電極の剥離

27. ウエハ上から電極を剥離する.

以上で, シリコンウエハ上におけるパリレン製の柔軟型センサ基板の作製工程は完了する.

付録 B 流路を有する柔軟型神経プローブ

本節では流路を付加した神経プローブについて述べる。

B.1 背景

神経活動は電気的な信号伝達のみならず、シナプスでの神経伝達物質を介した化学的な信号伝達との協調によって成り立っている。神経科学の研究において、電気的な信号計測は神経電極によって行われ、化学的な信号計測は主にマイクロダイアリスによって行われてきたが、神経の電気的活動および化学的活動の協調を調べるためには、この両計測を同一部位において同時に行うことが望まれる。しかしながら、このように電気的な計測と化学的な計測に対して、それぞれ別の計測デバイスを必要とすることから、その実現は困難とされてきた。

この課題に対していくつかの研究がなされている。例えば、Darbinらはマイクロダイアリスプローブの中に2本のワイヤー電極を組み込み、マイクロダイアリスプローブを介した薬液の注入に対するlocal field potentials (LFP)の変化をプローブ内の電極にて記録した[1]。また、加藤らは脳へのマイクロダイアリスプローブの刺入に用いるガイドカニューレ周囲に神経活動計測用の電極を設け、マイクロダイアリスプローブとその周囲に設けた神経電極がそれぞれ機能することを示した[2]。

これらの研究により、同一部位における電気的な神経信号と化学的な神経信号の同時計測の可能性が示された。

B.2 目的

マイクロダイアリスプローブと神経電極の一体化は、先行研究において実現されつつあるが、これらの方法ではマイクロダイアリス法が抱えるプローブ周囲の脳組織損傷は避けられない。そこで、本節ではパリレンを基板とした柔軟型神経電極に付加した流路を用いて神経電極とマイクロダイアリスの一体型プローブの作製を目指した(図B-1)。

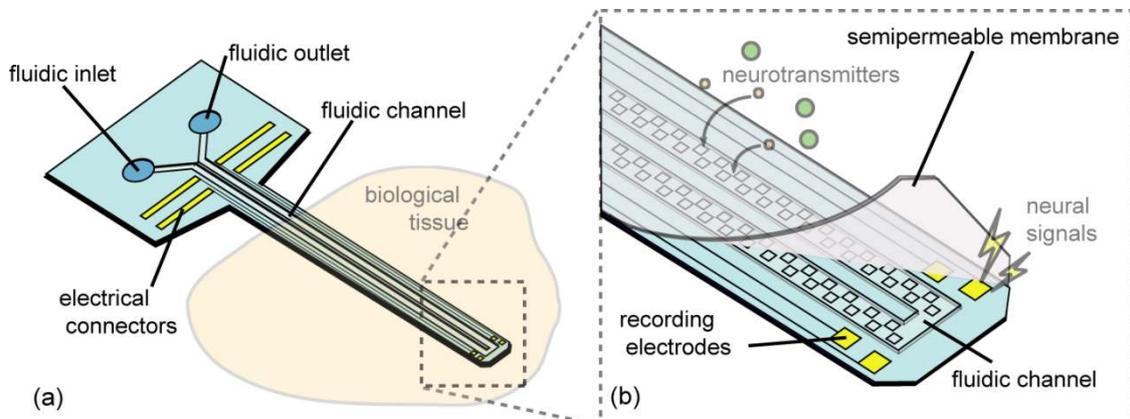


図 B-1: プローブのコンセプト (a)全体図 (b)先端拡大図

B.3 実験方法

・プローブ設計

本プローブは、パリレン製の柔軟型神経電極に対してマイクロダイアリス機能を付加するために設計した。図 B-2 に設計したプローブを示す。6mm のコネクタを含めたプローブの長さは 18mm とした。その上にプローブ先端で折り返す全長およそ 15mm の流路と、その周囲に 4 つの電極を配置した。各電極のサイズは $100\mu\text{m} \times 150\mu\text{m}$ として設計し、流路の幅は $170\mu\text{m}$ 、深さは $50\mu\text{m}$ とした。流路の形成には感光性エポキシ樹脂 (SU-8 3050, MICRO CHEM) で作製した型を利用した。これにより電極が配置されている電極基板表面に対して流路構造が凹状に形成され、結果として電極基板表面は平面が保たれる。マイクロダイアリス機能を付加するためには、流路の一部に微小孔を作製し、そこに半透膜を設ける必要があるため、それらの作製の妨げとなる基板表面の凸状流路の形成を回避した (図 B-3)。なお、半透膜は酢酸セルロースをスピコートすることによって成形した。

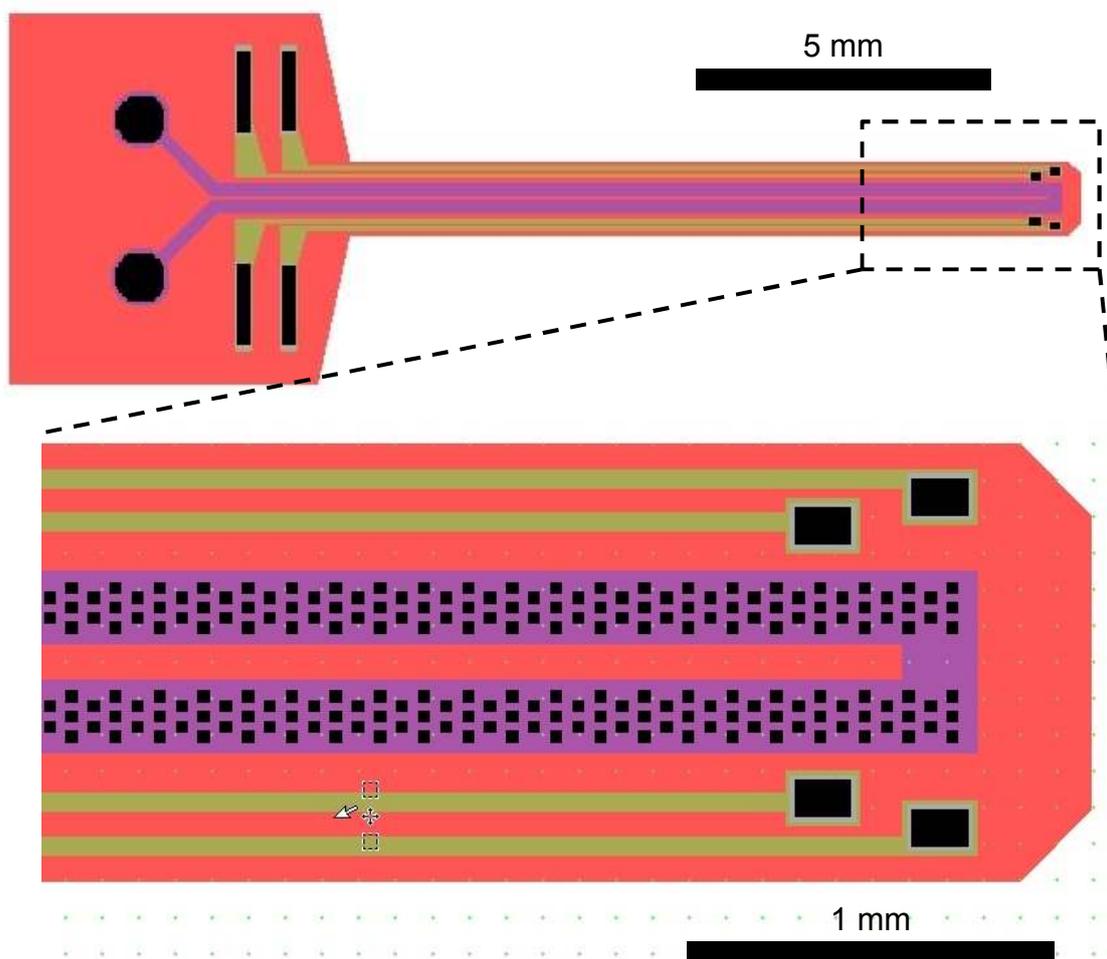


図 B-2: CAD を用いて設計したプローブ

上図は全体像を、下図は先端拡大像を示す。緑色は金配線を表し、赤色は電極基板を表す。紫色は流路を表し、その上の黒色はパリレン上に設けた貫通孔を表す。

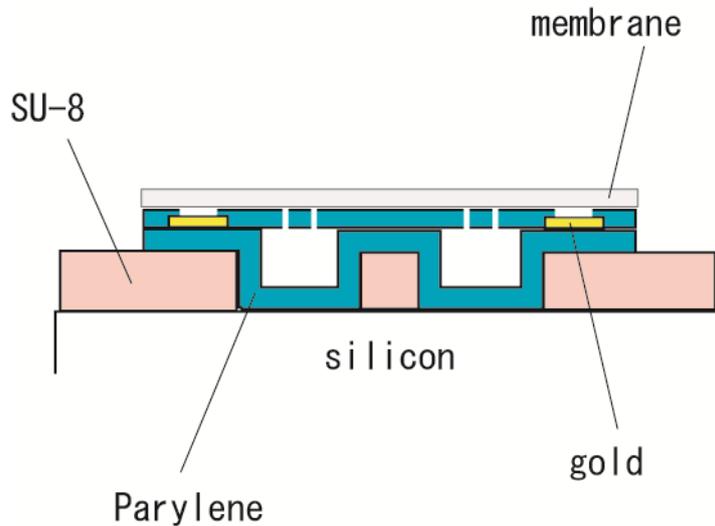


図 B-3: ウェハ上に作製するプローブの断面模式図

・ 流路形成に係るフォトレジスト塗布条件の検討

電極基板表面に対して凹状の流路を形成するためには、流路内を犠牲層となるフォトレジストで満たす必要がある。そこで、幅 $170\mu\text{m}$ 深さ $50\mu\text{m}$ に設計した流路を満たし、かつ基板表面は平面となるフォトレジストの塗布方法を検討した。検討には S1830 と THB-611P の粘性の異なる 2 つのフォトレジストを用いた。S1830 については 400, 1500rpm の 2 種類, THB-611P については 1500, 2000, 2500, 3000rpm の 4 種類の回転数にてスピコートし、露光および現像後に、レジストの形状を目視あるいは触針式表面形状測定装置 (Dektak 6M, ULVAC) によって計測した。

・ 半透膜のコート条件の検討

半透膜は酢酸セルロース、アセトン、ホルムアミドを 17:60:23 の割合で混合した高粘性調整液をウェハ上へスピコートすることで成膜した。スピコーターの回転数を 1000, 2000, 3000, 4000, 4500, 5000rpm の 6 種類設定し、パリレンを蒸着したウェハ上へ各回転数でコートした半透膜の膜厚を触針式表面形状測定装置で計測した。

・ プローブ作製

本プローブの作製には、SU-8、金配線、流路内犠牲層、アルミマスクのそれぞれをパターンニングするための 4 枚のフォトマスクが必要である。CAD を用いてこれら必要なフォトマスクパターンを設計し、電子線描画装置によってフォトマスクへ描画する。その後、描画されたパターンは現像およびクロムのエッチングを経て 4 枚フォトマスクが作製された。

ウェハ上におけるプローブ作製の工程を図 B-4 に示すとともに、その概要を以下に述べる。

まず、感光性エポキシ樹脂 (SU-8 3050, MICRO CHEM) を用いて流路の成形に必要な深さ $50\mu\text{m}$ の溝をウエハ上に成形した (図 B-4a). 型にはパリレン剥離剤を塗布し、その表面にパリレン C を $15\mu\text{m}$ 蒸着した後、厚さおよそ 300nm の金を真空蒸着し、フォトマスクを用いたパターニングによって金配線を成形した. ここで SU-8 の型によって作られた深さ $50\mu\text{m}$ のパリレン製の溝内をフォトレジスト (THB-611P, JSR) で満たすため、ウエハ全面にフォトレジストをスピコートし、パターニングを行った (図 B-4b). そして、再び厚さ $10\mu\text{m}$ のパリレン C を蒸着した (図 B-4c). 次に、真空蒸着装置にて厚さおよそ 100nm のドライエッチング保護マスク用アルミニウムを蒸着およびパターニングし、その保護マスクを用いた酸素プラズマエッチングにて厚さ $25\mu\text{m}$ のパリレン C を削った. このエッチングによって電極となる金が表面に露出し、プローブの外形が成形される (図 B-4d). ここで、プローブはウエハ上に残したまま、ウエハごとアセトンに浸し、流路内に満たしたフォトレジストを除去した (図 B-4e). その後、プローブに半透膜を付加するため、酢酸セルロース、アセトン、ホルムアミドを 17:60:23 の割合で混合した高粘性調整液をウエハ上へスピコートし、約 4°C の冷水に 2 時間浸漬することで膜に含まれる溶剤を除去した後、膜を緻密化するために 90°C の熱湯に 10 分間浸漬した. (図 B-4f). 乾燥の後、プローブからはみ出た半透膜はプローブ外形に沿って切除し、ウエハ上からプローブを剥離した (図 B-4g).

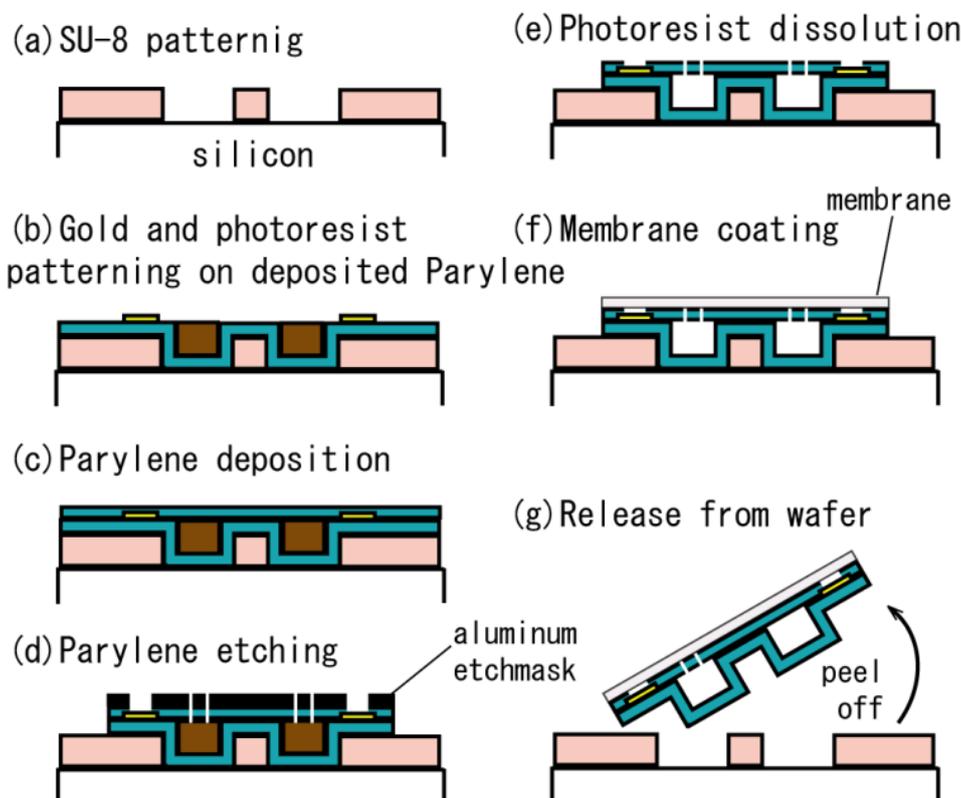


図 B-4: 柔軟型神経電極の作製工程

B.4 作製結果

・流路形成に係るフォトレジストの塗布条件の検討

SU-8 の型を設けたウエハ上にパリレン $15\mu\text{m}$ を蒸着した後，その表面に S1830 を回転数 1500rpm にてスピコートしたが，深さ $50\mu\text{m}$ の溝はフォトレジストで満たされなかった．そこで，回転数を 400rpm に下げてコートしたところ，溝はフォトレジストで満たされたものの，露光後の現像は出来なかった．

回転数 1500rpm にて THB-611P をスピコートし，露光および現像した後のフォトレジストの形状測定結果を図 B-5 に示す．さらに，検討した各回転数における成膜結果を図 B-6 に示す． 1500rpm ， 2000rpm におけるフォトレジストの形状は基板表面に対して凸状となり，その頂点の高さはそれぞれおよそ $+23\mu\text{m}$ ， $+8\mu\text{m}$ であった．一方， 2500rpm ， 3000rpm ではその形状は凹状となり，基板表面からの高さはそれぞれ $-13\mu\text{m}$ ， $-16\mu\text{m}$ となった（図 B-6）．

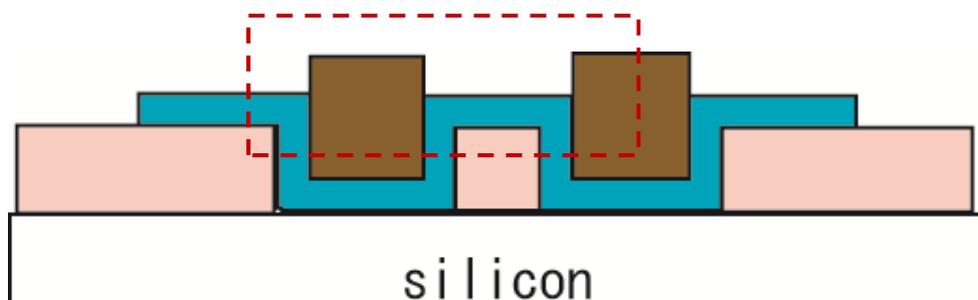
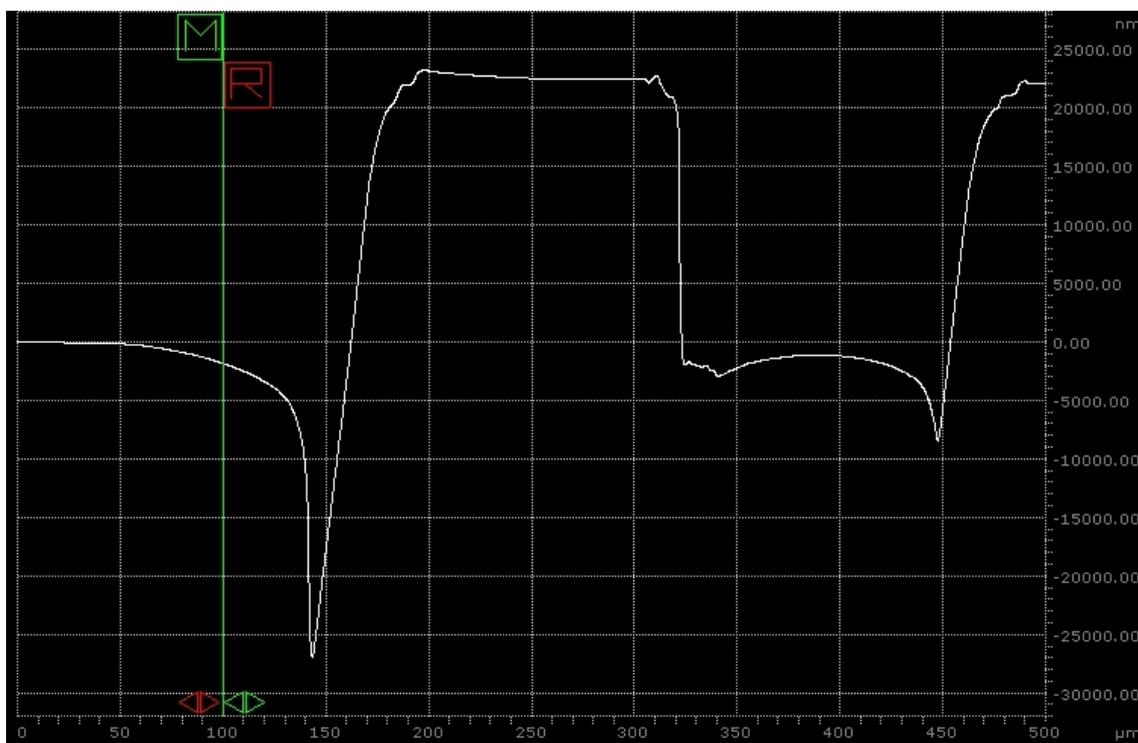


図 B-5： 流路部のフォトレジスト膜厚

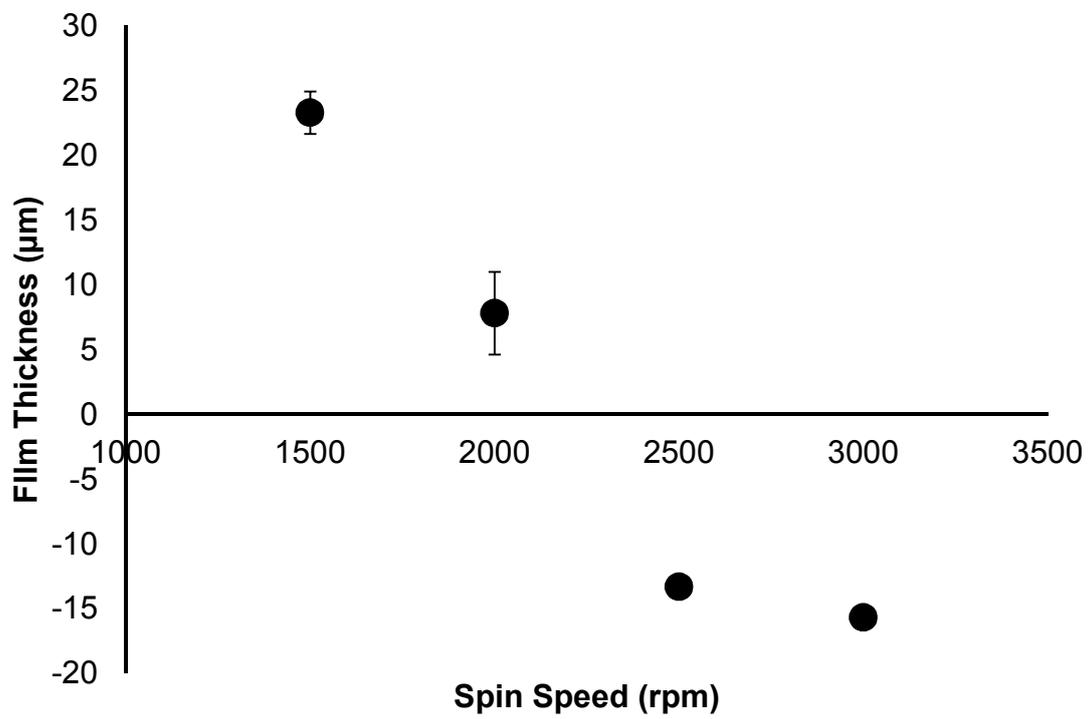


図 B-6 : スピンコーターの回転数とフォトレジスト膜厚の関係

・半透膜のコート条件の検討

図 B-7 にスピコーターの回転数と半透膜の膜厚の関係を示す。回転数の増加にともなう成膜される膜厚は薄くなる傾向にあり、その膜厚は 1000rpm ではおよそ 25 μm 、5000rpm においては 12 μm であった。なお、回転数 5000rpm では常に成膜できるわけではなく、スピコート中に半透膜がウエハ上からの剥離することがあった。

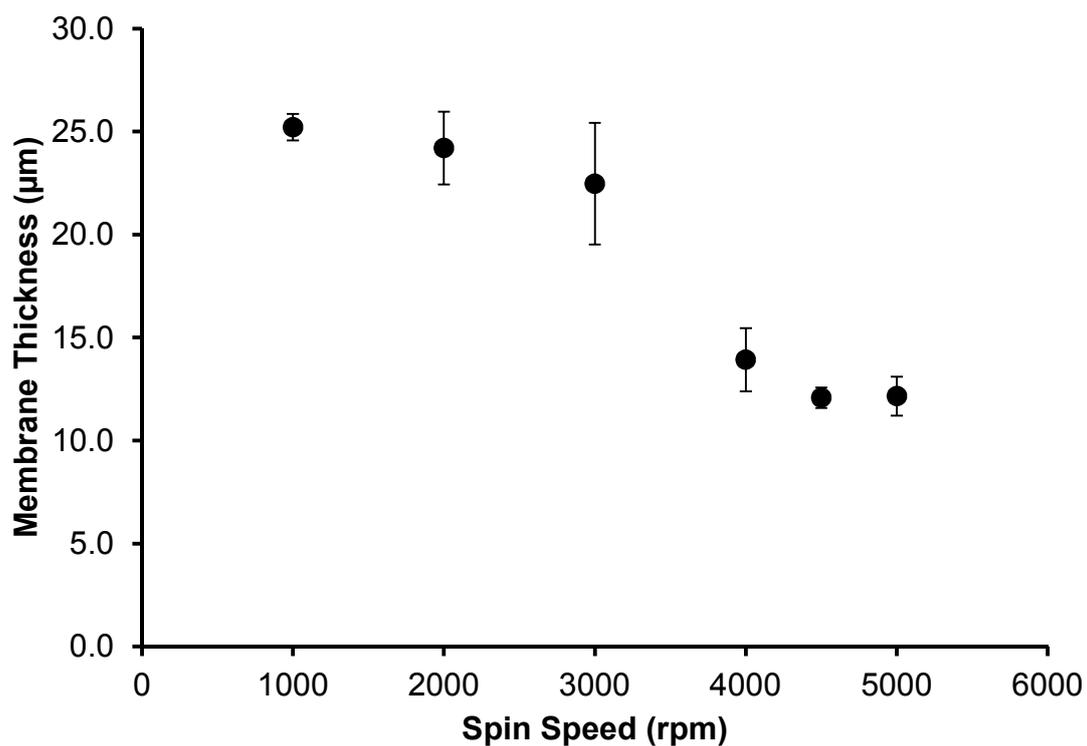


図 B-7： スピコーターの回転数と半透膜膜厚の関係

・プローブの作製結果

図 B-8 に作製したプローブの全体像 (a), 先端拡大像 (b), 電子顕微鏡にて観察した断面画像 (c) を示す. パリレン C で作製したプローブの全長は 18mm (図 B-8a), 電極と流路を配したプローブ先端部の幅は 1.2mm であった (図 B-8b). 流路の幅は 170 μm , 深さは 50 μm として設計したが, 作製中に触針式表面形状測定装置で測定した流路の深さは測定箇所によって異なり, その値は 43~55 μm の範囲内であった. さらに流路断面はテーパ状になっており, その幅は流路の底で 140 μm 程度, 基板表面付近では 200 μm 程度であった. ウエハからプローブを剥離した後, 電子顕微鏡にてプローブ断面を観察したところ, 流路内が中空になっている事が確認されたが, その深さは 24 μm , 幅は 165 μm と作製中に触針式表面形状測定装置で計測された値とは異なる (図 B-8c).

デバイス表面に酢酸セルロース溶液を回転数 3000rpm でスピコートした結果, 流路上に膜厚約 15 μm の半透膜を形成することはできたが, パリレンに対する半透膜の接着性が十分ではなく, 液漏れをともなわずに流路に液体を灌流させることはできなかった.

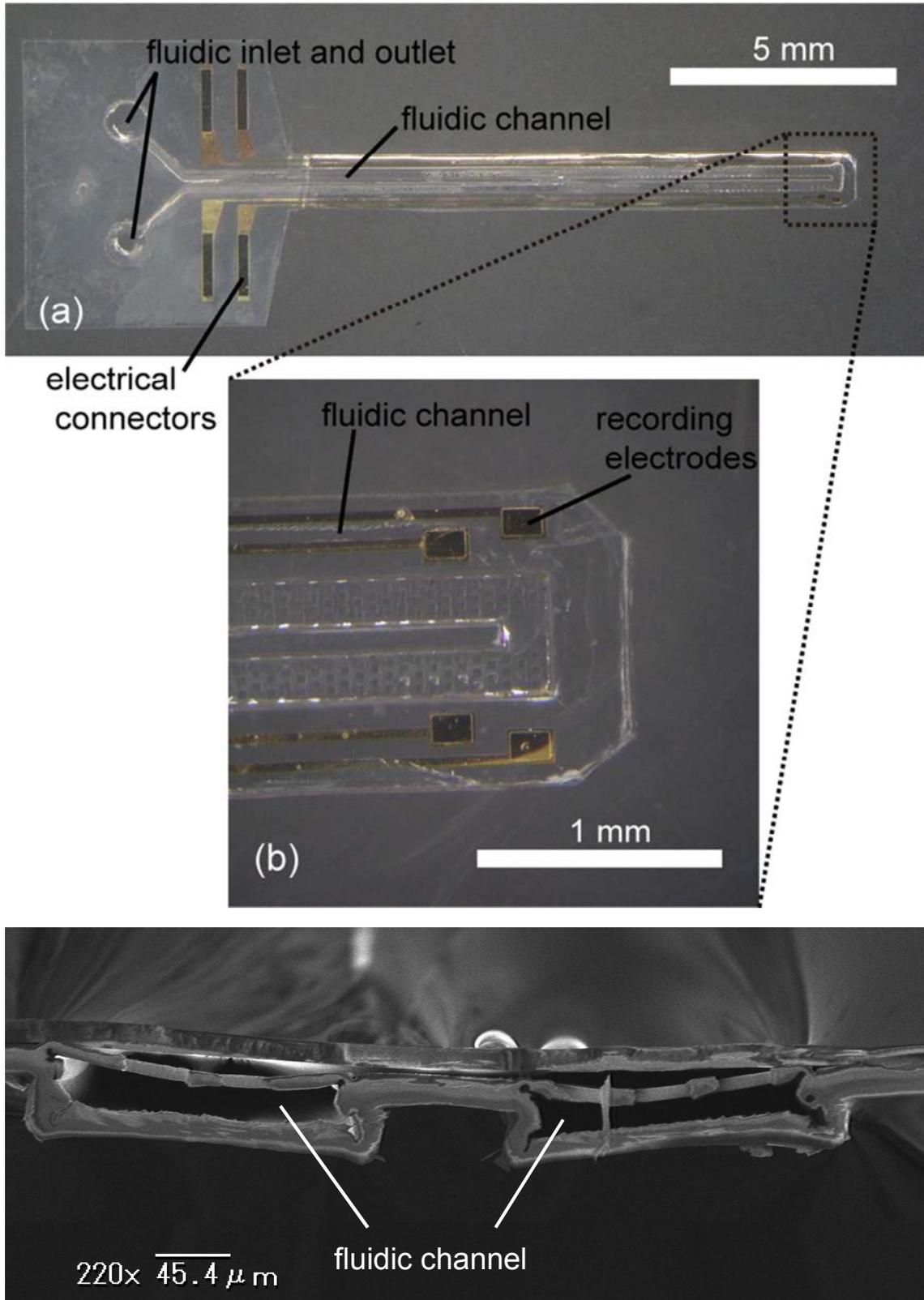


図 2-13： 作製された神経プローブ

(a)プローブ全体図 (b)プローブ先端拡大図 (c)プローブの断面図

B.5 考察

・プローブの作製について

先述の作製方法によって提案する神経プローブを形成することはできたが、パリレンと半透膜の接着性が悪く、本プローブのマイクロダイアリス機能の評価するには至らなかった。本プローブを作製するためにはパリレンと半透膜とを強固に接着する方法を見出す必要である。

・流路の作製について

本研究では、パリレン製の流路はSU-8の型を用いて作製した。この作製方法によって流路は電極基板に対して凹上に形成できることから、その作製上のリスクが軽減され、さらに高さのある流路も作製可能となる。

パリレンを材料とした流路は過去に Takeuchi ら[3], Foley ら[4]によって報告され、ともに同様の作製方法が用いられている。その方法は、平面のパリレン薄膜上にフォトレジストをパターニングし、その上から再びパリレンを蒸着した後にフォトレジストを除去するものであり、基板に対して凸状の流路が形成される。パリレン製のデバイスでは、その成形のために酸素プラズマによるエッチングが不可欠であるが、凸状に形成された流路を含むデバイスをエッチングする場合には次の2つの条件を満たす必要がある。

一つ目の条件は、立体的に形成された流路に対してエッチングの際の保護層となるアルミニウムが蒸着できることである。真空蒸着法では基本的にはウエハに対して水平な面のみアルミニウムが蒸着され、ウエハに対して垂直に存在する面には蒸着されにくい。そのため流路形成のためには粒子の回り込みによって流路の側壁にもアルミニウムが成膜できるスパッタ装置が適している。2つ目は、この保護用アルミニウムをパターニングする際にレジストが流路の側壁をも隈無くコートできることが条件となる。

この2つの条件が満たされない限り、流路における角や側壁にもあるべきアルミニウムはプロセス中になくなり、その部分のパリレンが等方性エッチングである酸素プラズマに直に曝される。結果的に流路の角や側面のパリレンはエッチングされ、流路構造は崩壊する。先行研究において流路が形成できたのは流路の高さが10 μm 程度と低く、その流路の角や側面がフォトレジストに覆われていたために、パリレンが直に酸素プラズマに曝されなかった結果だと考えられる。仮に、先行研究と同様の作製方法で高さ30 μm の流路を形成しようとする、エッチングに必要な先述の2つの条件を満たすことができず、流路は崩壊する。

30 μm 以上の高さを持つ流路を形成するためにはいくつかの方法が考えられるが、その一つがSU-8を用いた流路の作製法である。この作製方法に特有の利点は厚膜レジストの膜厚に依存しない点である。流路形成後に有機溶剤で溶解できる厚膜レジストは、その膜厚が最大でも40 μm 程度であるため、たとえエッチングに必要な先述の2条件を満たしたとしても、凸型に形成できる流路の高さは最大40 μm となる。一方、SU-8は後に溶解はできな

いものの、その膜厚は最大 2mm とされているため、この方法によって最大 2mm までの十分に深さのある流路を作製することもできる。そして、パリレンエッチングのための保護用アルミニウムを蒸着する面は流路の高さに関係なく、平面が保たれるため酸素プラズマエッチングによって流路が崩壊する危険はない。

・ 神経電極へ付加するに適した流路

薬液注入に対する神経活動を計測するために神経電極等の近傍に流路を設けたデバイスの開発がいくつか報告されている[3][4][5]。これらのデバイスにおいて、薬液が放出される流路先端と活動計測用電極の距離は 200~500 μm と示されており、さらには、その流路の先端が電極とは異なる方向を向いて設けられているデバイスもある。放出された薬液は脳内で拡散し、周囲の神経細胞を刺激するため、薬液に対する応答を 500 μm 離れた神経電極で計測することは可能と考えられるが、理想的には神経電極のより近傍に、かつ電極に面した神経細胞に対して薬液を放出することが望まれる。Buzsaki らの報告では、神経電極によって計測できるのは電極から 140 μm 以内の神経細胞の活動に限られると示されていることから[6]、薬液の放出も電極から 140 μm の範囲内で行われることが望ましい。

本研究にて行った SU-8 を用いた流路の作製方法では、流路の直上に神経電極を配置できるため、従来の統合型デバイスでは不可能であった神経電極から 140 μm 以内、かつ電極に面する神経細胞に向けた薬液放出を実現でき、薬液注入による神経活動を計測するためには有用なデバイスになりうると考えられる。

B.6 参考文献

- [1] O. Darbin, L. Newton, T. Wichmann, A new probe to monitor the effects of drugs on local field potentials, *J. Neurosci. Methods.* 155 (2006) 291–295
- [2] Y.X. Kato, M. Kashino, N. Hironaka, Development of a Microdialysis Probe with Multichannel Microelectrodes, *IEEJ Trans. Electron. Inf. Syst.* 129 (2009) 2189–2193
- [3] S. Takeuchi, D. Ziegler, Y. Yoshida, K. Mabuchi, T. Suzuki, Parylene flexible neural probes integrated with microfluidic channels., *Lab Chip.* 5 (2005) 519–523
- [4] C.P. Foley, N. Nishimura, K.B. Neeves, C.B. Schaffer, W.L. Olbricht, Flexible microfluidic devices supported by biodegradable insertion scaffolds for convection-enhanced neural drug delivery, *Biomed. Microdevices.* 11 (2009) 915–924.
- [5] S. Metz, a. Bertsch, D. Bertrand, P. Renaud, Flexible polyimide probes with microelectrodes and embedded microfluidic channels for simultaneous drug delivery and multi-channel monitoring of bioelectric activity, *Biosens. Bioelectron.* 19 (2004) 1309–1318
- [6] G. Buzsáki, Large-scale recording of neuronal ensembles., *Nat. Neurosci.* 7 (2004) 446–451