

## 論文の内容の要旨

論文題目 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

氏名 小竹 直樹

### 1. 序論

思考や学習，記憶に代表される脳の機能は，多数の神経細胞が形成する神経ネットワーク上を神経信号が伝達することによって成立している．そして神経細胞間の信号伝達は，その大部分が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伝達される．シナプス間隙で放出される興奮性の神経伝達物質であるグルタミン酸は，神経ネットワークの可塑的变化に関与し，記憶や学習の機序において重要な役割を果たしている．さらに，虚血による神経細胞死や鬱病など様々な脳疾患にグルタミン酸が関与することも示されてきた．

その重要性から，脳内のグルタミン酸の動態を観察する研究がなされてきたが，主な計測手法として用いられてきた脳マイクロダイアリス法では，時間的にも空間的にも分解能が十分ではなく，かつプローブを脳へ刺入，留置することによる周囲の脳組織の損傷は不可避であった．半導体集積回路作製技術から派生した微細加工技術である **Micro Electro Mechanical Systems (MEMS)** 技術の進歩にともなって開発されてきたシリコン等の硬い基板から成るグルタミン酸センサは，脳マイクロダイアリス法と比較して時間的・空間的分解能が向上し，センサの微細化によって刺入・留置による脳組織損傷の低減も図られてきた．しかしながら，同じく脳内にセンサの留置を必要とする他の研究領域を見てみると，近年急速な発展を遂げている **Brain-Machine Interface (BMI)** の研究分野においては，シリコン製の硬い神経電極では脳組織損傷の低減が不十分であると懸念され，物理的に柔軟な神経電極の開発が進められている．こうした背景から，現在のところ脳内のグルタミン酸の計測に用いられているシリコン等から成る硬い基板のセンサでは脳組織損傷の低減が十分ではないと考えられる．そこで本研究では，**BMI** 分野において先進的に開発が進む柔軟型神経電極の作製方法をベースに，脳組織損傷を低減し慢性計測に適した新たな柔軟型グルタミン酸センサを開発することを目的としている．

## 2. 柔軟型センサ基板

慢性計測に適した柔軟型センサを作製するため、その基板材料としてパリレンCを用い、また、配線には金を用いた。パリレンCは生体適合性が高く、柔軟かつ高い電気絶縁性を特長とする。最小基板幅 100 $\mu\text{m}$  の柔軟なセンサ単体を脳へ刺入するため、その基板厚を 20 $\mu\text{m}$  と設計し、50 $\mu\text{m}$ ×50 $\mu\text{m}$  サイズの4つのチャンネルを有するセンサを作製した。微細加工技術を用いて作製したセンサについて、電気絶縁性と機械的強度を検証したところ、パリレンC製のセンサ基板が金配線を被覆する絶縁層として必要な特性を有すること、そしてポリエチレングリコール等による機械的強度補強なしに、生体の脳へ刺入できる機械的強度を有していることが確認された。

## 3. 柔軟型グルタミン酸センサ

第2章で作製した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。本センサは、基板上の電極部表面に固定したグルタミン酸酸化酵素の酸化反応を利用してグルタミン酸を検出する。このセンサを作製するにあたり、センサの性能に影響を及ぼす白金黒メッキの活用、酵素の固定方法、固定する酵素量の3点について *in vitro* 実験で検証した。その結果、まず、電極の表面積はセンサの感度に影響を及ぼし、白金黒メッキによる電極表面積の拡大がセンサの感度向上に寄与することが示された。次に、酵素の固定方法では、包括法の場合に比べ、架橋法を用いて作製したセンサの感度が高く、架橋法で固定する酵素の量を2倍にした際のセンサの感度が1.4倍に向上した。これらの検討の結果、サイズ 50 $\mu\text{m}$ ×50 $\mu\text{m}$  の電極に白金黒メッキを施し、架橋法によって 320units/ml 濃度のグルタミン酸酸化酵素を固定した柔軟型グルタミン酸センサの感度は 14.0pA/ $\mu\text{M}$ 、検出下限は 1.4 $\mu\text{M}$  となり、脳内で想定されるグルタミン酸の濃度の変動を観察するに足る機能を有することが確認された。

## 4. 生体内での柔軟型センサの性能検証

第3章で作製し、*in vitro* 検証実験によって基本的な性能が確認された柔軟型グルタミン酸センサが、生体の脳内においても有用であるか否かについて、*in vivo* 動物実験で検証した。麻酔下のラットの脳を対象に行ったセンサの検証実験では、神経細胞からのグルタミン酸の放出を引き起こすと言われている塩化カリウムをセンサ近傍に注入した際に、電流値の上昇が観察され、その変化量は塩化カリウムの注入量に比例して増加した。一方、アガロース製の模擬脳を用いた対照実験では、模擬脳内に留置したセンサ近傍へ注入した塩化カリウムに対して電流値の上昇は認められなかった。この結果から、生体の脳内で観察された電流値の上昇は、ガラスキャピラリーを通じて脳内へ注入した塩化カリウムに誘発された神経細胞からのグルタミン酸の放出をセンサが捉えている可能性が示唆された。

## 5. 結論

本研究の目的は、慢性留置にともなう脳組織損傷を低減し生体の脳内でグルタミン酸を計測しうる柔軟型センサを開発することにある。センサの設計から作製および実験の結果、パリレン C を基板材料とし、金を配線として作製したセンサ基板が脳機能計測用センサとして必要な電気的および機械的特性を有していることが確認され、また、このセンサ基板上の電極部にグルタミン酸酸化酵素を固定した柔軟型センサがグルタミン酸センサとして優れた機能を有することが示された。そして、本センサが生体の脳内においても神経細胞から放出されたグルタミン酸を検出しうることが実証され、開発した柔軟型グルタミン酸センサの有用性が示された。