

ヒト iPSC 細胞由来ニューロンから放出される神経伝達物質の  
高感度リアルタイム計測法の開発

The Development of multi-electrode array to high-sensitive and real-time detection  
of neurotransmitter released from hiPSC-derived neurons

○松田直毅(東北工業大学大学院 工学研究科)

大川徳幸(東北工業大学 工学部 )

小田原あおい(東北大学 大学院医工学研究科)

鈴木郁郎(東北工業大学大学院 工学研究科)

Naoki MATSUDA (Graduate school of Engineering, Tohoku Institute of Technology)

Noriyuki OKAWA (school of Engineering, Tohoku Institute of Technology)

Aoi ODAWARA (Graduate school of Biomedical Engineering, Tohoku University)

Ikuro SUZUKI (Graduate school of Engineering, Tohoku Institute of Technology)

**Abstract: It is expected to elucidation of neurological disease mechanism using a human iPSC-derived nerve cells. However, its function evaluation system has not been established. Accordingly We focused on the release of neurotransmitters that are involved in neurological disease, and aimed the development of the carbon nanotube planar microelectrode array which can real-time measure the release of neurotransmitters in the non-invasive and highly sensitive. The fabricated CNTs-MEA showed a sensitivity capable of detecting dopamine. It was found that human iPS cells cultured on the substrate can be detected dopamine release in real time.**

**Key Words: Multi-electrode array, Carbon nanotube, neurotransmitter, real time recording, hiPSC neuron**

1.はじめに

1-1 背景

ヒト iPSC 由来ニューロンを用いた神経疾患メカニズムの解明や創薬への応用が期待されており，機能に着目した評価系の構築が重要な課題となっている．我々は，これまで神経細胞の活動電位を細胞外で非侵襲多点同時計測できる平面微小電極アレイ (MEA) 計測法を用いて，ヒト iPSC 細胞由来ニューロンの長期成熟化過程や薬剤応答性を明らかにしてきた．次のステップとして，神経ネットワークの情報伝達場であるシナプスの前部から放出される神経伝達物質をこの平面微小電極アレイで取得することができれば，これまでに無い新しい機能評価系となる可能性がある．

1-2 目的

本研究では，カーボンナノチューブ(CNT)を電極材料とした平面微小電極アレイチップを作製し，電気化学反応による神経伝達物質のリアルタイム計測法の開発を目的とした．

2.方法

2-1 神経伝達物質計測用 MEA の作製

電気化学活性種との反応箇所が多数存在する CNT を使用した．また，CNT は 1-メチル-2-ピロリドンの溶液中で超音波分散させ，脱イオン水追加後，電極サイズ  $50\ \mu\text{m} \times 50\ \mu\text{m}$  の ITO 電極上に滴下し，64 電極同時めっき器具を用いて電解メッキした．

2-2 電気化学計測

神経伝達物質としてドーパミン (DA) に着目し，作製した CNT 電極の検出感度測定および細胞から放出される DA 測定をサイクリックボルタメントリ- (CV) 計測法，およびクロノアンペロメトリー (CA) 計測法で行った．計測装置は，電気化学計測システム HZ-7000 (北斗電工) を用い，対極に Pt，参照極に Ag/AgCl 電極を用いた．

2-3 ヒト iPSC 由来ニューロンの培養と計測

作製した MEA 基板にヒト iPSC 由来 DA ニューロン (Reprocell, xCell) を  $1 \times 10^6$  cells/cm<sup>2</sup> 程度で培養し，培養 3 週目以降からドーパミン計測を行った．

3.結果と考察

3-1 CNT 平面微小電極アレイの作製

CNT 分散液を ITO 微小電極表面に電解めっきした結果，電極表面に一樣にチューブ状の形状を保った CNT がめっきされている様子が確認された (Fig.1)

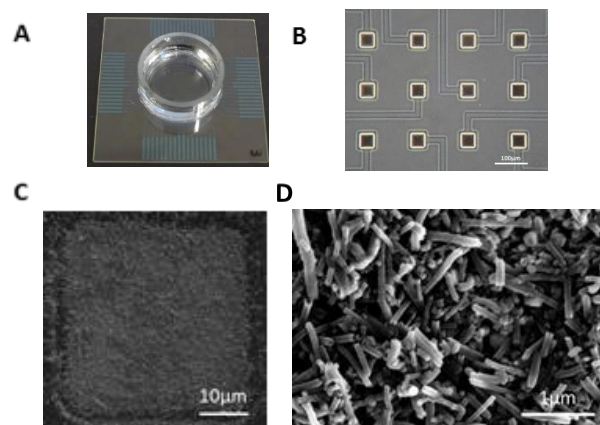


Fig.1 CNT MEA structure .

(A) MEA 全体像. (B)作製した CNT 電極の位相差顕微鏡画像. (C) CNT 電極の SEM 画像. (D)の拡大図(D)

3-2 ドーパミン検出感度の評価

インピーダンスの違いによる DA の検出感度を調べる為に，40 kΩ の電極と 400 kΩ の電極で DA 1 mM を CV 法で計測した (Fig.2A)．その結果，0.30V で DA のピーク電流が両電極において計測され，40 kΩ の電極では 400 kΩ に比べて 13 倍の電流値を検出した．PBS のみでは反応が見られなかった

為、作製した CNT 微小電極は DA に対して電気化学反応を示し、低インピーダンス電極がより反応性が高いことがわかった。更に、CV 計測を 4 サイクル連続に測定し、電気反応の再現性を調べた。その結果、反応ピーク電圧は誤差 0.026 mV、ピーク電流は平均 1.8nA の減衰に留まった。このことから作製した電極は感度が減衰することなく繰り返し使用できることが分かった。次に、CA 法で、CNT 電極の DA に対する濃度相関を調べた結果、10 nM で反応が見られ、100nM から顕著な線形性が得られた (Fig.2B,C)。また、100 nM DA を 100 秒毎に投与したところ、濃度に応じて階段状に電流値が上昇する様子が確かめられた (Fig.2D)。50  $\mu\text{m}^2$  の微小電極において、報告例のない高い DA 検出感度を達成した。

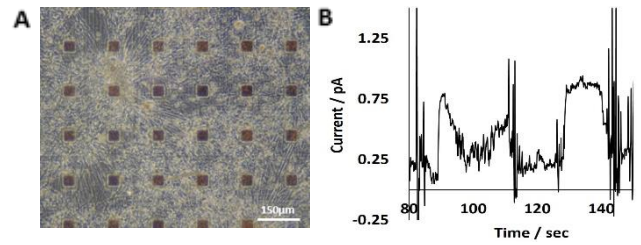


Fig.3 real-time detection of DA released from hiPSC-derived neurons

(A)MEA 上に培養した 35 日目のヒト iPSC 由来ニューロン。  
(B)ヒト iPSC 由来ドーパミンニューロンの CA 計測結果。

4.まとめ

CNT-MEA 基板の開発により、50  $\mu\text{m}^2$  の微小電極において 100 nM の低濃度ドーパミンを顕著に検出した。更に、ヒト iPSC 由来ドーパミンニューロンからドーパミン放出をリアルタイムに検出できたことから、ヒト iPSC 由来ニューロンの神経伝達物質の放出を指標とした神経疾患の解明研究や薬効評価への応用が期待できる。

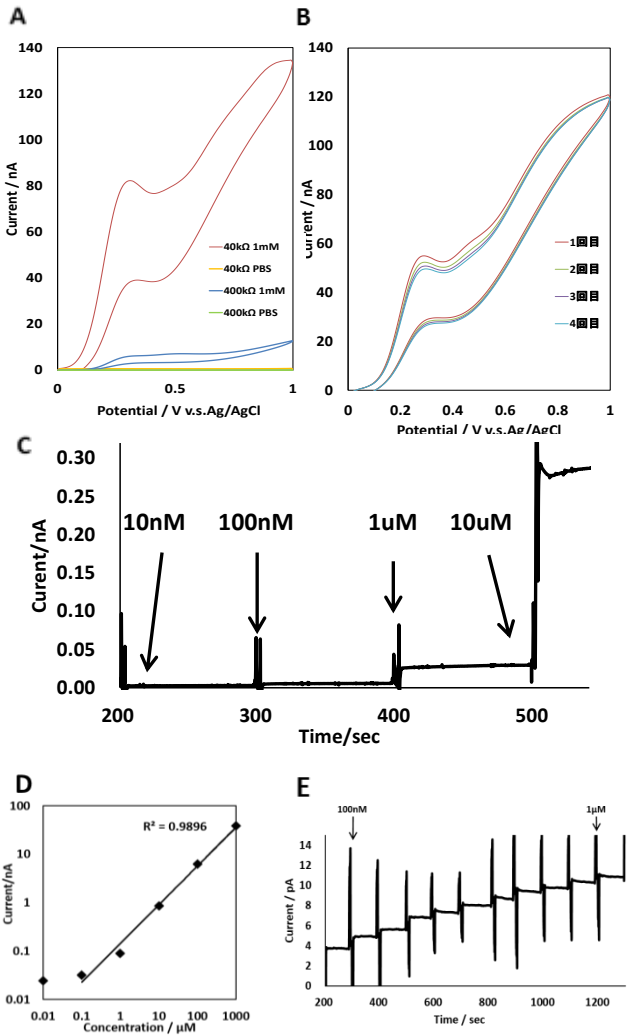


Fig.2 Electrochemical measurement.

(A)40 k $\Omega$  と 400 k $\Omega$  電極の DA 1 mM に対する CV 計測結果。  
(B)40k $\Omega$  電極の DA1mM に対する 4 連続サイクルの CV 計測結果  
(C)DA10 nM～1mM までの CA 計測結果。 (D)CA 計測による DA10 nM～1mM までの濃度相関。 (E) DA 100 nM の順次投与による電流値の変化。

3-3 ヒト iPSC 由来ニューロンの培養と計測

CNT-MEA チップ状に培養したヒト iPS 由来 DA ニューロンを培養し、培養 3 週間目以降から電気化学計測を行ったところ、DA ニューロンからの放出されるドーパミンをリアルタイムに検出することに成功した。(Fig.3B)