

微小ナノカーボン電極を用いた細胞分泌物のリアルタイム計測技術の開発

Development of a real-time measurement technique for neurotransmitters

using nano carbon micro electrodes.

○鈴木郁郎(東京工科大学)、福田真生(東京工科大学)、後藤正男(東京工科大学)

Ikuro SUZUKI, Mao FUKUDA, Masao GOTOH, Tokyo University of Technology

Abstract: In this study, a single-wall carbon nanotube (SWCNT), multi-wall carbon nanotube (MWCNT) type-HB and type-HC electrodes were created to detect the neurotransmitters at nM concentration level via cyclic voltammetry (CV) and chronoamperometry (CA). As results, dopamine was detected at 1nM level using MWCNT type-HB electrodes and serotonin at 1nM level using MWCNT type-HC electrode in CV measurements. In CA results, dose-response relationships from 10 nM to 100 nM were observed in dopamine and serotonin. Moreover, we developed a CNT micro electrodes array chip using electroplating method and detected the neurotransmitters at 10nM concentration level. These results suggest the potential of CNT electrodes for in vitro and in vivo real-time neurotransmitter measurement.

Key Words: neurotransmitter, carbon nanotube, electrochemistry, dopamine, serotonin, adrenaline

1. はじめに

神経回路を作動させる神経伝達物質の計測技術は、極めて重要な意味を持つ。パーキンソン病や統合失調症など、神経伝達物質の放出異常で引き起こる神経疾患は多く存在し、疾患メカニズムの解明や薬の開発が待たれている。神経伝達物質を計測する手法は主にマイクロダイアリス法が用いられているが、脳内にプローブを挿入し、バッファ回収後に HPLC 等で計測するため、(i) リアルタイム計測が難しい、(ii) 長期計測が難しい、(iii) 複雑な工程を要するなどの問題点がある。そこで、本研究では、神経伝達物質を電極により電気的に検出する技術の開発を目指し、上記問題点を解決することとした。

神経伝達物質を電気的に検出する手法として、電気化学測定がある。電気化学測定の感度は、電極素材によって異なるが、近年、カーボンナノチューブ (CNT) が電気化学活性種に対して優れた特性を示すことが報告されている⁽¹⁻⁷⁾。生理活性物質の1つである神経伝達物質においても、CNT は電気化学的反応性を持つ。CNT 電極を用いた神経伝達物質計測はドーパミンで始めて行われ⁽⁸⁾、セロトニン⁽⁹⁾、ノルエピネフリン⁽¹⁰⁾など各種神経伝達物質の計測が報告されてきた。また、計測感度の上昇と検出物質選択性を持たせるために、カーボンファイバー電極に CNT を修飾させた電極や官能基を修飾させた電極が開発されている⁽¹¹⁻¹⁷⁾。しかしながら、細胞から放出される濃度である nM レベルでの検出の報告はほとんど無く、計測装置として確立されていない。

本研究では、nM レベルの検出感度を持つ、カーボンナノチューブの種類と作製条件を明らかにし、脳スライスや培養細胞において高空間分解能で神経伝達物質をリアルタイム計測可能なカーボンナノチューブ微小多電極アレイの開発を行なった。多層カーボンナノチューブ (MWCNT: Multi-wall carbon nanotube) を用いたペースト電極により 1nM ドーパミンおよびセロトニンの検出を検出できることがわかった。また、電気めっき条件を確立したことで、電極サイズ 50 μ m の CNT 多電極アレイ基板の作製に成功し、nM レベルで神経伝達物質の検出を確認した。これらのことから、CNT 多電極アレイチップを用いれば、細胞から放出される神経伝達物質をリアルタイムに計測できる可能性が示唆された。

2. 方法

2-1 CNT ペースト電極を用いた神経伝達物質計測

2-1-1 ペーストカーボンナノチューブ電極の作製

カーボンナノチューブの種類による感度特性を調べるために、単層 CNT (SWCNT: Single-wall carbon nanotube) および 2 種類の多層 CNT (MWCNT: Multi-wall carbon nanotube) 中空型 (type-HC) および竹筒型 (type-HB) を材料としたペースト電極 (BAS, 表面積: 7.07 mm²) を作製し、ドーパミン、セロトニン、アドレナリンに対する検出感度を測定した。Type-HC は中空構造、type-HB は竹筒型構造を形成しており、共に約 8 層の多層構造を有している。電子誘導材としてグラファイトパウダー (Fisher) を使用し、CNT、グラファイトパウダー、ミネラルオイルの重量比を 1:1:1 で秤量し、乳鉢に入れ、混練した。これをペースト型電極に充填し、ガラス板上で成型した。

2-1-2 電気化学計測

(a) サイクリックボルタンメトリー計測

作製した CNT 電極を用いて、サイクリックボルタンメトリー (CV: Cyclic Voltammetry) 法による神経伝達物質計測を行った。測定対象はドーパミン (Sigma-Aldrich)、セロトニン (Wako)、アドレナリン (Wako) とし、溶媒として pH7.4 リン酸塩 pH 標準液 (Wako) を使用した。各神経伝達物質を 0, 0.001, 0.01, 0.1, 1, 10, 100 μ M の濃度で調製し、参照電極として塩化銀、対向電極には銀を用いた。電気化学アナライザー (ALS1140A, BAS) を使用して計測した。測定条件は初期電位: -0.2 V, 高電位: 0.8 V, 低電位: -0.3 V, スキャン速度: 0.05 V/s, サンプル間隔: 0.001 V である。解析ソフトウェアは ALS-1140a を使用した。

(b) クロノアンペロメトリー (CA: Chronoamperometry) 計測

CV による神経伝達物質計測の解析結果をふまえて、実際に細胞から放出される神経伝達物質をリアルタイム計測する手法であるクロノアンペロメトリー法による計測を行った。濃度相関を計測するために、測定中 0.001, 0.01, 0.05, 0.1, 0.5, 1 μ M の濃度になるように神経伝達物質を 100 秒毎に順次添加し、スターラーを用いて各 3 秒間の攪拌を行った。神経伝達物質の濃度に依存して得られる電流値の解析は、神経伝達物質滴下 +10 秒後の値から PBS のみの電流値を差し引いた値を各濃度で検出された電流値として算出

した。

2-2 CNT 微小多電極アレイの作製および神経伝達物質計測

2-2-1 CNT 微小多電極アレイの作製

50 μ m 四方の ITO 微小多電極アレイ基板 (Alpha med scientific) を用いた。多層カーボンナノチューブを超音波分散し、電圧印加により ITO 表面に電気めっきした。

2-2-2 CNT 電極表面の電子顕微鏡観察

電気めっきにより作製した電極表面の構造を評価するために電子顕微鏡 (JSM-7700F, JEOL) にて観察した。CNT 微小電極を試料台に固定し、Pt コーター (JFC-1600, JEOL) にて白金を蒸着させた。蒸着条件は真空度: 3.00×10^{-5} Pa, 電流値: 10 mA, 蒸着時間: 35 秒 \times 3 回とした。電子顕微鏡観察は加速電圧 5 kV, エミッション 5 μ A の条件で行った。

2-2-3 CNT 微小電極を用いた神経伝達物質計測

ペースト電極と同様に、サイクリックボルタメトリー法で計測した。

3. 結果

3-1 神経伝達物質の電気化学測定

図 1 に各種 CNT 電極に対する 100 μ M 神経伝達物質 in PBS と PBS のみのボルタモグラムを重ねて示す。(A), (D), (G) は SWCNT, (B), (E), (H) は MWCNT type-HB, (C), (F), (I) は MWCNT type-HC 電極であり, (A)-(C) はドーパミン, (D)-(F) はセロトニン, (G)-(I) はアドレナリンに対する測定結果である。作製した全ての CNT 電極において 3 種類の神経伝達物質の酸化ピーク電流の検出に成功した。電子移動速度, 酸化還元電位, 反応生成物の違いから, ドーパミン, セロトニン, アドレナリンのボルタモグラム形状は CNT 電極の種類によらず固有の形状を示した。

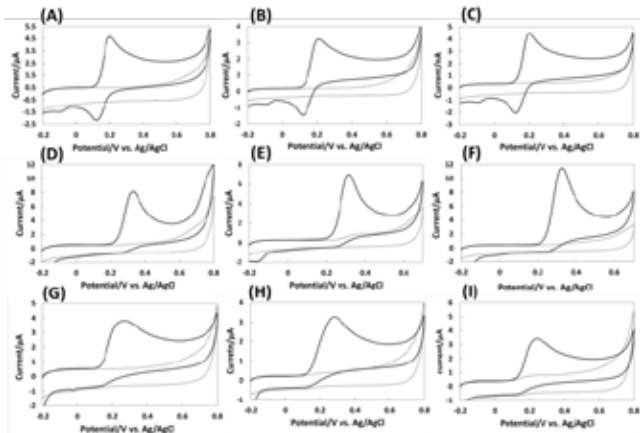


Fig.1 Comparative cyclic voltammograms of different carbon nanotube electrodes and different neurotransmitters. Solid lines show 100 μ M neurotransmitters in PBS (pH 7.4) and dot line no neurotransmitter in PBS. Vertical columns compare the types of CNT electrodes: SWCNT (panels A, D, and G), MWCNT type-HB (panels B, E, and H), and MWCNT type-HC (panels C, F, and I). Horizontal rows compare different compounds: dopamine (panels A-C), serotonin (panels D-F), and adrenaline (panels G-I).

図 2 に同一電極によるドーパミンとセロトニンに対する神経伝達物質計測の濃度相関を示す。(A) は MWCNT type-HB 電極を用いてドーパミン計測したボルタモグラム

であり, (C) は MWCNT type-HC 電極を用いてセロトニン計測したボルタモグラムである。酸化ピーク電流の値は低濃度から順に, ドーパミン計測では 0.64, 0.97, 2.05, 5.76, 16.28 μ A となり, セロトニン計測は 0.014, 0.048, 0.25, 1.33, 6.27 μ A となった。図 2(C), (D) は測定結果から作成した検量線であり, r 値がそれぞれ 0.987 と 0.999 となったことから, 10 nM から 100 μ M までの神経伝達物質とピーク電流値の間に強い相関があることがわかった。SWCNT 電極では, nM レベルの酸化ピーク電流は観察されなかった。

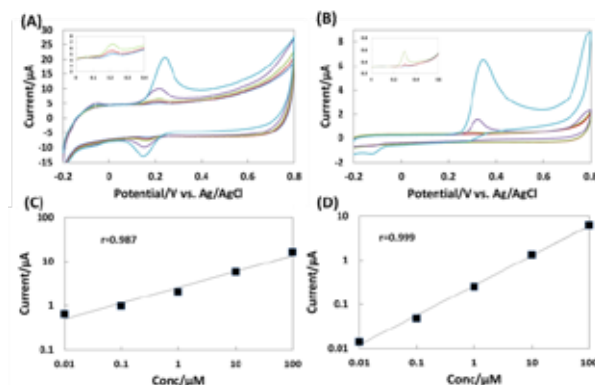


Fig.2 Cyclic voltammograms of various concentrations of dopamine using MWCNT type-HB electrode (A) and serotonin using MWCNT type-HC electrode (B). The inset in (A) shows the magnified response of oxidation peaks in 10 nM, 100 nM, and 1 μ M dopamine. The inset in (B) shows the magnified response in 10 nM, 100 nM, and 1 μ M serotonin. Lower graphs show the plot of oxidation peak height versus dopamine concentration (C) and serotonin concentration (D) in logarithmic scale.

図 3 は神経伝達物質 1 nM を測定したボルタモグラムである。(A) は MWCNT type-HB 電極を用いたドーパミン, (B) は MWCNT type-HC 電極を用いたセロトニンに対する測定結果を示している。ボルタモグラムが示すように, 酸化ピーク電流が観察され, 電流値はドーパミンが 1.23 μ A, セロトニンは 0.047 μ A であった。これらの結果から, 1 nM という非常に低濃度の神経伝達物質を検出可能であることがわかった。

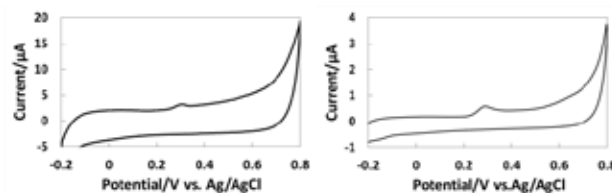


Fig.3 Cyclic voltammogram of 1 nM neurotransmitter. (A) CV of MWCNT type-HB in 1 nM dopamine in PBS (pH 7.4). (B) CV of MWCNT type-HC in 1 nM serotonin.

3-2 神経伝達物質のリアルタイム計測

作製した CNT 電極を用いて CA 法による神経伝達物質の濃度相関を計測した結果を図 4 に示す。電圧は, 酸化電位付近である 0.3 V に固定し, 100 秒毎に順次神経伝達物質の濃度を上昇させて計測した。(A) は MWCNT type-HB 電極によるドーパミン, (B) は MWCNT type-HC 電極によるセロトニンの測定結果である。神経伝達物質投与による拡

散の影響を排除するために、投与時に3秒間ゆっくりとスターラーにて攪拌し、解析は神経伝達物質滴下時+10秒後の電流値を検出した。図4(A), (B)に挿入したグラフは、ドーパミンおよびセロトニン 10 nM 投与による拡大波形である。攪拌の影響により3秒間ノイズがあるが、投与後に電流値が上昇していることがわかる。また、(C), (D)はそれぞれドーパミン、セロトニンの計測結果に対する検量線であるが、 r 値が 0.993, 0.991 となっており、10 nM から 100 μ M 投与において神経伝達物質と電流値には強い相関があることがわかった。同じ実験を3回繰り返したところ、ほぼ同様の結果となったことから再現性を有していることも確認された。

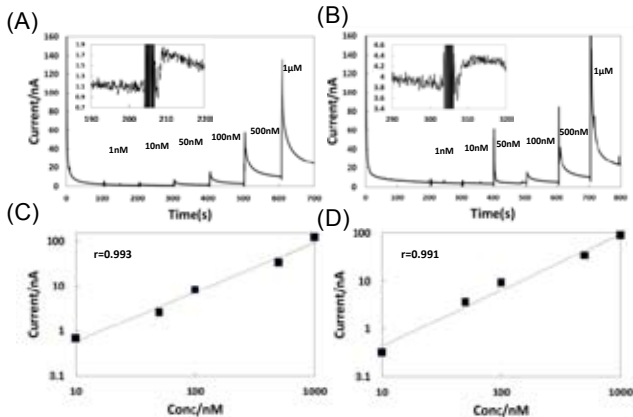


Fig.4 Amperometric responses of MWCNT electrodes after subsequent addition of neurotransmitters in a PBS (pH 7.4). (A) Responses of the MWCNT type HB after addition of dopamine. (B) MWCNT type-HC after addition of serotonin. Inset: the corresponding calibration curves of 10 nM dopamine (A) and 10 nM serotonin (B). Signals generated for increasing concentrations of dopamine (C) and serotonin (D).

3-3 CNT 微小多電極アレイ

ナノチューブの分散化条件と電気めっき条件を検討した結果、めっきした電極表面の構造制御が神経伝達物質を高感度に計測するために必須であることがわかった。図5は、めっきした CNT 微小多電極アレイチップと表面構造の電子顕微鏡写真である。小さい粒子で構成され、粒子間に多くの空間が存在する構造が高い検出感度を示すことがわかった。

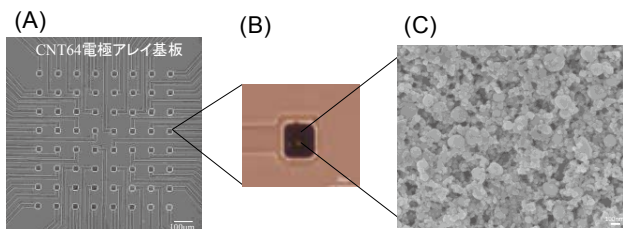


Fig.5 CNT multi-electrodes array. (A) Overview of 64ch CNT electrodes. (B) Phase contrast image of single electrode. (C) SEM image of CNT electrode surface.

3-4 CNT 微小多電極アレイを用いた神経伝達物質計測

図6に1mMドーパミンを微小電極で測定したサイクリックボルタモグラムを示す。微小電極特有のピーク電流が検出され、また再現性もあったため、連続計測に耐えうる

電極であることがわかった。ITO のみの電極や従来の白金黒電極ではピーク電流は観察されなかった。図7は、ドーパミン 100nM、10nM の計測結果である。100nM の検出は4つの微小電極を同時に使用し、10nM の検出は7電極を同時に使用した。低濃度のピーク電流の検出には、電極面積に依存することがわかった。

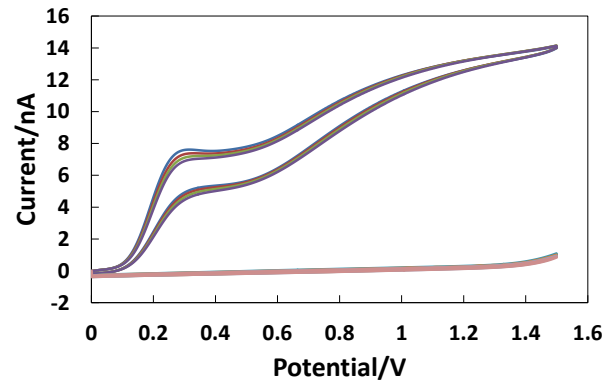


Fig.6 Cyclic voltammogram of 1 mM dopamine using a CNT electrode and a ITO bare electrode.

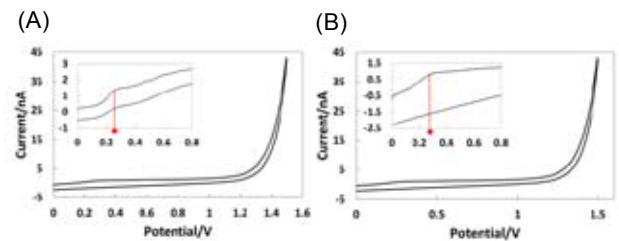


Fig.7 Cyclic voltammogram of 100 nM dopamine using four CNT electrodes (A) and 10 nM dopamine using seven CNT electrodes (B).

図8はセロトニン 10nM を7電極で計測した結果である。7電極を用いてPBSのみを計測した電流値に比べて、セロトニン 10nM 計測時に明らかな電流上昇が観察された。

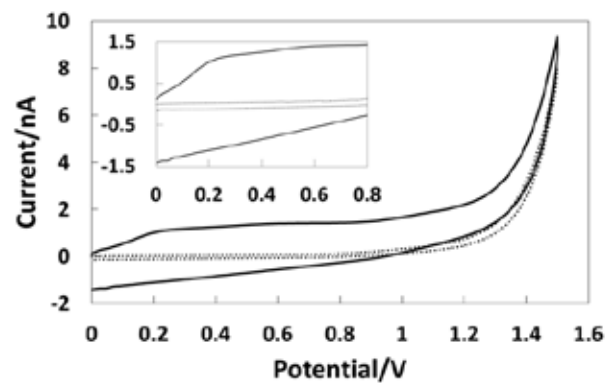


Fig.8 Cyclic voltammogram of 10 nM serotonin using seven CNT electrodes. Dot line shows only PBS.

4. 考察およびまとめ

MWCNT type-HC および type-HB 電極を用いて、1 nM ~ 10 nM の濃度で神経伝達物質の電気化学的検出に成功した。MWCNT にて 1nM レベルの低濃度検出に成功したが SWCNT では 100 nM 以下の検出が難しかったため、CNT の種類に依存して感度特性が異なることが明らかとなったが、CNT の構造や純度に依存した感度特性は十分調べられていない。今後、神経伝達物質に対してより高感度を示す

CNTの発見が期待される。また、ペースト電極の検出感度には電極の作製状態が大きく関与することもわかった。100 nM以下の検出では、MWCNT電極においても、計測不可能な電極があり、特に1 nMの検出においては、作製した電極の検出確率は30%程度であった。その原因は、人為的にCNT、グラファイト、ミネラルオイルを混練しているため、作製毎に表面構造にばらつきが生じるためだと考えられる。再現性がある電極を作製するためには、CNTの凝集状態を均一化する機械的な作製法を確立する必要がある。

カーボンナノチューブの電気めっき技術を検討したことにより、電気めっき法を用いたCNT微小電極アレイ基板の開発に始めて成功した。また、CNT微小電極を用いて10nMの濃度におけるピーク電流の検出および電流の増大が観察された。これらの結果は、神経機能で重要となる神経伝達物質をリアルタイムで計測できる可能性を示唆しており、これまでにない新しい計測技術として多に発展が期待できる。しかしながら、単一微小電極ではnMレベルの検出が難しかったことから、今後は電極サイズを検討して行く必要がある。今後、ピーク電流が検出される酸化電位に固定して、脳スライスなどを用いて細胞から放出される神経伝達物質を計測する予定である。

謝辞

本研究の一部は、科学技術振興機構「研究成果最適展開支援プログラム」、および、科学研究費補助金「若手研究B」、および、日本私立学校振興・共済事業団「学術研究振興資金（若手研究者奨励金）」、および、カシオ科学振興財団「研究助成」によって行われた。

参考文献

- (1) Wang J, Liu G, Jan MR : "Ultrasensitive electrical biosensing of proteins and DNA: carbon-nanotube derived amplification of the recognition and transduction events", *J Am Chem Soc.*, Vol.126, pp.3010-3011, 2004.
- (2) Wang SG, Zhang Q, Wang R, Yoon SF : "A novel multi-walled carbon nanotube-based biosensor for glucose detection", *Biochem Biophys Res Commun.*, Vol.3, pp.572-576, 2003.
- (3) Gong K, Dong Y, Xiong S, Chen Y, Mao L : "Novel electrochemical method for sensitive determination of homocysteine with carbon nanotube-based electrodes", *Biosens Bioelectron.*, Vol.2, pp.253-259, 2004.
- (4) Lin Y, Lu F, Tu Y, Ren Z : "Glucose biosensors based on carbon nanotube nanoelectrode ensembles", *Nano Lett.*, Vol.4, pp.191-195, 2004.
- (5) Tang H, Chen J, Yao S, Nie L, Deng G, Kuang Y : "Amperometric glucose biosensor based on adsorption of glucoseoxidase at platinum nanoparticle-modified carbon nanotube electrode", *Anal Biochem.*, Vol.331, pp.89-97, 2004.
- (6) Li G, Liao JM, Hu GQ, Ma NZ, Wu PJ : "Study of carbon nanotube modified biosensor for monitoring total cholesterol in blood", *Biosens Bioelectron.*, Vol.10, pp.2140-2144, 2005.
- (7) Kurusu F, Tsunoda H, Tomita A, Kadota A, Kayahara N, Karube I, Gotoh M : "The advantage of using carbon nanotubes compared with edge plane pyrolytic graphite as an electrode material for oxidase-based biosensors", *Analyst.*, Vol.12, pp.1292-1298, 2006.
- (8) Britto PJ, Santhanam KSV, Ajayan PM : "Carbon nanotube electrode for oxidation of dopamine", *Bioelectrochem Bioenerg.*, Vol.41, pp.121-125, 1996
- (9) Wu K, Fei J, Hu S : "Simultaneous determination of dopamine and serotonin on a glassy carbon electrode coated with a film of carbon nanotubes", *Anal Biochem.*, Vol.318, pp.100-106(2003)
- (10) Li Y, Umasankar Y, Chen SM : "Multiwalled carbon nanotubes with poly(NDGACHi) biocomposite film for the electrocatalysis of epinephrine and norepinephrine", *Anal Biochem.*, Vol.388, pp.288-295, 2009.
- (11) Jacobs CB, Vickrey TL, Venton BJ : "Functional groups modulate the sensitivity and electron transfer kinetics of neurochemicals at carbon nanotube modified microelectrodes", *Analyst.*, Vol.17, pp.3557-3565, 2011
- (12) Viry L, Derre A, Poulin P, Kuhn A : "Discrimination of dopamine and ascorbic acid using carbon nanotube fiber microelectrode", *Phys Chem Chem Phys.*, Vol.34, pp.9993-9995, 2010.
- (13) Abbaspour A, Noori A : "A cyclodextrin host-guest recognition approach to an electrochemical sensor for simultaneous quantification of serotonin and dopamine", *Biosens Bioelectron.*, Vol.26, pp.4674-4680, 2011.
- (14) Kim SK, Ahmed MS, Jeong H, You JM, Jeon S : "Determination of serotonin on a glassy carbon electrode modified by electropolymerization of meso-tetrakis(2-aminophenyl)porphyrin and single walled carbon nanotubes", *J Nanosci Nanotechnol.*, Vol.11, pp.2407-2412, 2011.
- (15) Zhao J, Zhang W, Shrrrell P, Razal JM, Huang XF, Minett AJ, Chen J : "Carbon nanotube nanoweb-bioelectrode for highly selective dopamine sensing", *Appl. Mater. Interfaces.*, -pp.44-48, 2012.
- (16) Li Y, Liu X, Liu X, Mai N, Li Y, Wei W, Cai Q : "Application of multi-walled carbon nanotubes modified carbon ionic liquid electrode for electrocatalytic oxidation of dopamine", *Colloids Surf B Biointerfaces.*, Vol.88, pp.402-406, 2011.
- (17) Koehne JE, Marsh M, Boakye A, Douglas B, Kim IY, Chang SY, Jang DP, Bennet KE, Kimble C, Andrews R, Meyyappan M, Lee KH : "Carbon nanofiber electrode array for electrochemical detection of dopamine using fast scan cyclic voltammetry", *Analyst.*, Vol.9, pp.1802-1805, 2011.