

オンライン酵素センサーを用いた培養神経細胞より放出されるグルタミン酸, アセチルコリン, GABA のリアルタイム測定

鳥 光 慶 一・丹 羽 修
(NTT 基 礎 研 究 所)

1. は じ め に

虚血や細胞死におけるグルタミン酸の関与あるいは、胚における GABA の脱分極作用・低濃度域におけるマイグレーション作用など、神経伝達物質がいわゆる情報伝達だけでなく、神経組織の発達や生死に重要な役割を果たしているといった、今までの伝達物質のもつイメージとはだいぶ異なった多面的な性質が近年明らかになってきた[1-6]。また、古典的な伝達物質であるアセチルコリンは、最近になって再び記憶機構への関与が示唆されるなど注目を浴び、疾病に関係した局所的な伝達物質の濃度変化の計測を含め、神経伝達物質の挙動を調べることで益々重要になってきた。

これまで神経の挙動解析については、パッチクランプ法などの電気生理的手法を中心に詳しく調べられてきた。その一方で、伝達物質そのものを測定する試みがいろいろなされてきた。マイクロダイアリシスを用いた *in vivo* 計測、遠心分離抽出によるシナプトソームを用いた伝達物質の放出解析、など、主に HPLC を用いたオフライン計測がその大半を占める。HPLC 法は、比較的高感度で計測可能ではあるものの、過渡的応答や微小領域での濃度変化などは測定が困難である。また、蛍光法は、安定性や SN 比が悪く、高感度での計測が難しい。これに対し、カーボンファイバー電極や酵素電極などを用いたオンライン計測は、このような微小領域での過渡的応答を測定するのに最適であると考えられる。

本稿では、シナプス活動に伴う神経伝達物質放出といった微小領域における過渡的応答の計

測に焦点をあて、酵素反応を利用した電気化学オンライン計測法について述べる。我々のオンラインセンサーは、後に詳しく述べるが、(1) これまでの様に酵素を流して測定するのではなく、炭素電極上に固定する。(2) メディエーターを用いる(ここでは HRP を含むオスミウムポリマー)ことにより、センシング部の微小化、高感度化を可能にした。現在の段階では、単一シナプスでの測定は難しいが、グルタミン酸に対する検出限界は 10 nM 程度で、秒・ μm の高い測定分解能での連続測定が可能である。

2. 測定法の歴史

神経伝達物質の濃度を測定する方法は数多く報告されているが、表 1 に示す様にオフライン法とオンライン法、またはリアルタイム法に分けることができる。オフライン法は、試料を一度集めて、分析系に導入して測定を行う方法で、代表的な測定法として高速液体クロマトグラフィ (HPLC) を挙げることができる。

HPLC 法は、*in vivo*, *in vitro* の系に関わらず、従来より広く利用されてきた。インビボ測定ではマイクロダイアリシス (MD) プローブと組み合わせることにより、高分子量の妨害物質

表 1. 生体計測に利用される電気化学測定

	インビボ測定	インビトロ測定
オフライン測定	高速液体クロマトグラフィ キャピラリー電気泳動 マイクロダイアリシス	
オンライン測定 リアルタイム測定	微小電極(ガラス, カーボン, 金属) 酵素修飾微小電極 オンラインバイオセンサー	

の影響なく長期的な測定を行うことができる。グルタミン酸、アセチルコリン、 γ -アミノ酪酸(GABA)は、従来より HPLC により測定されてきた。グルタミン酸や GABA は適当な蛍光試薬により誘導化し、分離、検出を行うのが一般的である。一方、アセチルコリンでは電気化学検出器(ECD)を用い酵素カラムにより電気化学的に検出可能な過酸化水素を生成させて検出を行う。

また、最近ではキャピラリー電気泳動(CZE)装置が市販され、神経伝達物質の測定に利用した例も報告されている。HPLC 法が数マイクロリットルの試料が必要なのに対して、CZE 法ではナノやピコリットルの極微量の試料で分析を行えるため、短時間で分析に必要な量を確保することができ、MD 法でサンプリングした試料を測定する場合の時間分解能が向上する[7]。HPLC や CZE などのオフライン法は、感度が高く、定量性にも優れているが、分離に時間がかかるため、連続的な測定は困難である。神経伝達物質の様に短時間の間に濃度が変化する際には、時間分解能が問題となる。

一方、オンライン法またはリアルタイム法は、試料を分離プロセスを経ることなく連続的に測定する方法である。神経伝達物質を電気化学的手法により連続的に測定する方法は図1に示すように2つに分けることができる。いずれの方法も分離を行わずに測定を行うために検出器は

目的物質に対して高い選択性を有することが必要である。微小な金属ワイヤーやカーボンファイバーを電極に用いる方法は、測定する電極を試料近傍に近接させることができるために、最も良い時間分解能を実現できる。その反面、酵素などを修飾して使用する際には再現性が難しいことや、測定対象によっては選択性を実現するのが難しいなどの問題がある。

オンラインセンサーは、試料を連続的にサンプリングしてセンサー内に送り込むもので、この検出器として電気化学検出器は広く用いられている。オンラインセンサーはファイバー電極を用いた方法に比べ応答性は劣るが、例えば MD 法と組み合わせて用いることにより、妨害物質の影響の少ない長時間測定に適するだけでなく、高い感度を得ることができる特徴を有する。

グルタミン酸、アセチルコリンなどの測定にはファイバー電極、オンライン法何れの方法についても研究されてきた。以下に物質毎にその歴史的背景を述べる。

2.1 グルタミン酸

グルタミン酸の連続的な測定は多くの例が知られているが、その大半は神経伝達物質でなく食品用のセンサーとして研究されている。脳内計測や神経細胞への応用されたグルタミン酸センサーについて過去の研究例を表2に示す。グ

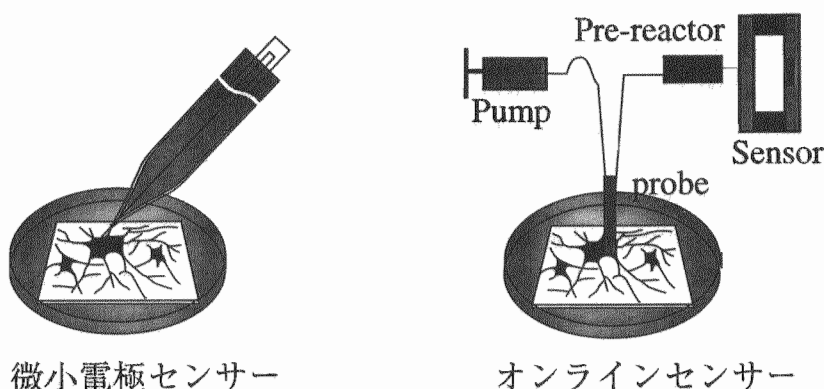


図1. 神経伝達物質の連続測定用オンラインセンサー模式図

表2. 脳神経科学への応用を目的とした電気化学式グルタミン酸センサーの例

形 状	構 造	特 徴	文 献
微小電極型	Pt/Ir ワイヤをグルタミン酸酸化酵素、高分子により修飾	脳内での刺激に応答したグルタミン酸濃度増加検出, 検出限界: $2\ \mu\text{M}$	[8]
	白金黒メッキした CF 電極上に酵素膜修飾	小脳スライスでの刺激応答性グルタミン酸放出	[9]
	炭素繊維電極上にポリピロール誘導体を重合することにより酵素を固定	$1\ \mu\text{M}$ の検出限界, インビボ計測	[10]
オンライン型	マイクロダイヤリシス (MD) プロープに電気化学セルを形成, 酵素をダイヤリシス液に入れて流す方式	インビボ計測, アスコルビン酸酸化酵素を同時に流すことにより, 影響を除去	[11]
	白金管内に酵素を固定し微小な電気化学セルを形成	インビボ用, アスコルビン酸の影響を去, 妨害物質の存在下で $0.3\ \mu\text{M}$ の検出限界	[12]
	チャンネルフロー型電気化学セル, 上流に酵素, 下流に高分子膜を修飾した白金電極	検出限界 $0.5\ \mu\text{M}$, インビボ計測虚血の研究に使用	[13,14]
	酵素反応器と西洋ワサビペルオキシターゼ (HRP) を含む高分子メディエータを修飾した炭素電極, MD プロープ利用	脳組織スライス, 単層培養細胞検出限界 $< 10\ \text{nM}$	[15]
	HRP を含む高分子メディエータとグルタミン酸酸化酵素の 2 層膜を修飾した炭素電極, ガラスキャピラリーによる微小領域からの吸引サンプリング	検出限界 $10\ \text{nM}$, ラット大脳細胞単層培養系での測定	[26-29]

グルタミン酸酸化酵素あるいはグルタミン酸ジヒドロゲナーゼを用いる方法が報告されているが, 後者は補酵素として NAD を加える必要があるため, 電気化学法を利用したセンサーでは前者を用いることが多い. ファイバー型, オンライン型のセンサーともに研究されている [8-10]. 前者の例では, G. S. Wilson らにより 1991 年にファイバー型グルタミン酸センサーを用いた脳内への測定が報告されている. 白金/イリジウムワイヤーにグルタミン酸酸化酵素を修飾したバイオセンサーを作製しており $2\ \mu\text{M}$ の検出限界が報告されている [8].

一方, ファイバー型グルタミン酸センサーを用いた培養系 (インビトロ) での測定は民谷らにより報告されている. この研究では, 白金黒をメッキした炭素繊維電極上にグルタミン酸酸化酵素により修飾し, これをラット小脳のスライス試料から放出されるグルタミン酸の測定に用い, 塩化カリウムや電気的な刺激によりグルタ

ミン酸濃度の増加が報告されている. センサーの検出限界は $1\sim 2\ \mu\text{M}$ である [9].

一方, オンラインセンサーは, ファイバー型センサーに比較し報告例が多い. 最初のオンライン型グルタミン酸センサーはオルベリー (Albery) らにより報告されている [11]. このセンサーは MD プロープを改良して中に 3 つの電極を挿入して電気化学セルとし, グルタミン酸酸化酵素を流して, MD 膜より採取されたグルタミン酸と反応させて測定を行っている. ラット脳内での計測に応用し, 同時にサンプリングされる L-アスコルビン酸を除去するために L-アスコバート酸化酵素を流して選択性を向上させている. また, Boutelle らは, 白金のチューブの中に酵素を固定して組み込み, オンラインセンサーを形成している [12]. オブレノビッチ (Obrenovich) らのグループはオンラインセンサーを虚血の研究に用いている [13,14]. センサーには白金電極をセットしたチャンネル

フローセルを用い、電極の上流側に酵素を固定する。酵素反応により生成した過酸化水素は下流側の白金電極で検出されるが、白金電極上にはポリフェニレンジアミンの膜を形成し、L-アスコルビン酸が電極上で反応するのを抑えて高い選択性を確保している。検出限界は $0.5 \mu\text{M}$ の値が得られている [13]。

オンライン型のセンサーを用いて培養系の試料を測定することも可能である。我々は、MD サンプリング膜とグルタミン酸酸化酵素を固定化した微量反応器、西洋ワサビペルオキシターゼ (HRP) を含むオスミウム錯体高分子を修飾したセンサーを作製した。センサーは 10 nM 以下の低い検出限界が得られ、ラット脳組織のスライスや培養大脳皮質細胞において刺激によるグルタミン酸の放出を計測することができた。しかしながら、オンライン型のセンサーは感度が高いものの、培養系に適用する場合 MD 膜が細胞に比べ遥かに大きく微小領域の測定が難しいことや応答が遅いなどの問題がある [15]。

2.2 アセチルコリン及び GABA

生体試料中のアセチルコリンについては、白金微小電極にアセチルコリンエステラーゼとコリン酸化酵素を固定したセンサーによる検出が報告されている [16]。しかしながら、脳神経系ではコリン濃度が高いため、アセチルコリンを選択的に検出した報告例はなかった。GABA については、GABA をグルタミン酸に変換する GABASE という酵素の反応に伴って生成する NADPH を HRP と酸素により酸化し、酸素濃度から GABA 濃度を評価するセンサーが報告されているが、その検出限界は $20 \mu\text{M}$ と高く、脳神経細胞での測定に応用するのは困難である [17]。

3. 何が測定できるか

オンラインセンサーの最大の特徴は、(1) 連続測定であるため、一過性の応答といった早い時間的な変化が測定可能である (2) サンプリング量が微量なため空間分解能が高いなどの利点がある。

一方、測定にある程度の溶液のサンプリングが必要であり、反応部までのデッドボリュームが大きいと時間・空間分解能が悪くなるといった欠点がある。しかしながら、ファイバー型センサに比べ時間分解能は劣るものの、安定で再現性に優れるため、比較的早い微小な応答まで計測可能である。

例えば、シナプス活動に参与した Ca 依存性の早い神経伝達物質の放出測定が可能である。また、連続測定法であるため、代謝に伴う Ca 非依存性の放出との区別も比較的容易である。これにより、記憶・学習といったシナプスにおける可塑的变化に伴う伝達物質の濃度変化を追うことができる。また、今後微小化を進め、サンプリング量の更なる微量化が可能となれば、単一シナプスからの伝達物質放出過程の測定もあながち夢ではない。

グルタミン酸は、伝達物質としての役割の重要性に加え、細胞毒性といった反対の面も持ち合わせている。低酸素症や低血糖症あるいは虚血は、細胞外のグルタミン酸濃度を増加させ、その濃度が生理学的に高濃度になると、細胞内カルシウム濃度上昇を引き起こすことにより細胞を死に至らせることが知られている。脳梗塞の進展にグルタミン酸濃度の上昇が重要であるという報告は多く、梅村らは MD-HPLC 法により、ラットの中大脳動脈を閉塞した場合に虚血辺縁部のグルタミン酸濃度が上昇することを測定し、脳梗塞における AMPA 受容体と NMDA 受容体の役割の違いを示唆する報告をしている [5, 6]。一方、培養細胞においても低酸素、低グルコース暴露による NMDA (早期) 及び AMPA/KA 受容体 (緩徐) の異なる変化が報告されている [21]。また、GABA は、その本来の抑制性伝達物質としての機能だけでなく、胚といった神経組織の発育段階におけるマイグレーション作用 [4]、脱分極作用 [1-3] を示すなど、その働きにまだ不明な点が多い。

グルタミン酸や GABA、アセチルコリン、ドーパミンなど様々な神経関連物質の挙動を高感度で連続的にモニタすることは、これらの生

理的、病理解析に強力なツールを提供するだけでなく、ハンチントン舞蹈病・パーキンソン病などの慢性的な神経変性疾患の診断・治療に貢献するものと考えられる[5,6,18-21]。

4. 測定方法

4.1 アンペロメトリ法

本測定法は電気化学法と酵素反応を組み合わせたもので、電極上での電子の授受を電流値として検出する。図2に酸化反応の場合に電極の電位を変化させた時の電位と電流の関係を示す。電極電位を上げていくと、ある電位より目的物質が酸化され電流が流れ始める。この値は物質の種類によって異なる。電位が増加すると電極上での反応が増加するため電流は急激に増加するが、ある電位以上では一定の値を示す。これは、電極への測定対象物質の拡散が律速になるためである。拡散律速の領域では一定の電流値を示すので、この電位領域に電極電位を固定して測定を行うと、濃度に比例した電流値が再現性良く得られる。電気化学フローセルを用いたオンライン測定において、電位を変えて同じ濃度の物質を測定すると図2と類似の電位依存の曲線を得ることができる。

4.2 酵素センサー

電気化学測定では電極上で容易に酸化還元が起る物質のみ測定を行うことができる。芳香族アミンやキノン、カテコール類などが電気化

学的に容易に酸化され、神経伝達物質ではカテコールアミン類、セロトニンがこれにあたる。一方、グルタミン酸などのアミノ酸類、アセチルコリンなどの伝達物質は電極により酸化還元されにくい。このような神経伝達物質を検出するためには、酵素反応を用いて測定対象物質を分解し、電極で酸化還元する分子を生成する必要がある。

図3に我々が作製したセンサーの反応式を示す。グルタミン酸の検出にはグルタミン酸酸化酵素を用いて酸化し、生成した過酸化水素を検出する。反応には酸素が必要なので、基質濃度が高い場合は注意を要する。生成した過酸化水素は通常、白金電極を用い 500 mV (銀/塩化銀参照電極に対して) 程度の電位を印加すると容易に検出することができる。我々のセンサーでは Heller らにより合成されたオスミウム-ポリビニルピリジン錯体高分子 (Os-gel) と西洋ワサビペルオキシターゼ (HRP) により過酸化水素を検出する[22,23]。即ち、HRP で過酸化水素を還元し、酸化状態になった HRP を Os-gel を介して電極から電子を供給することにより HRP を還元して、再び過酸化水素を還元できる状態に戻す。この時電極から流れる還元電流は基質濃度に比例するため、グルタミン酸を連続的に定量することができる[15]。検出の電位は -100 ~ 0 mV に設定することができるため、生体試料中に多量に存在する L-アスコルビン酸の影響を抑えて測定を行うことができる。

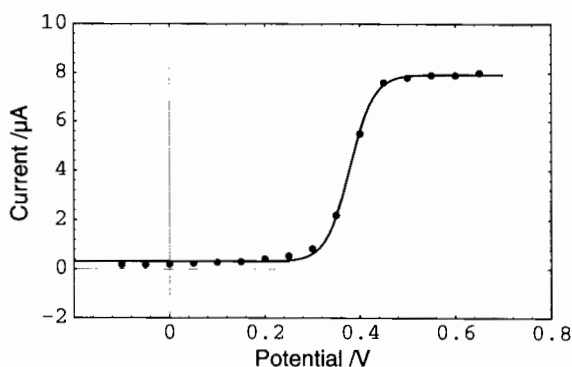


図2. 電気化学反応における電位と電流の関係

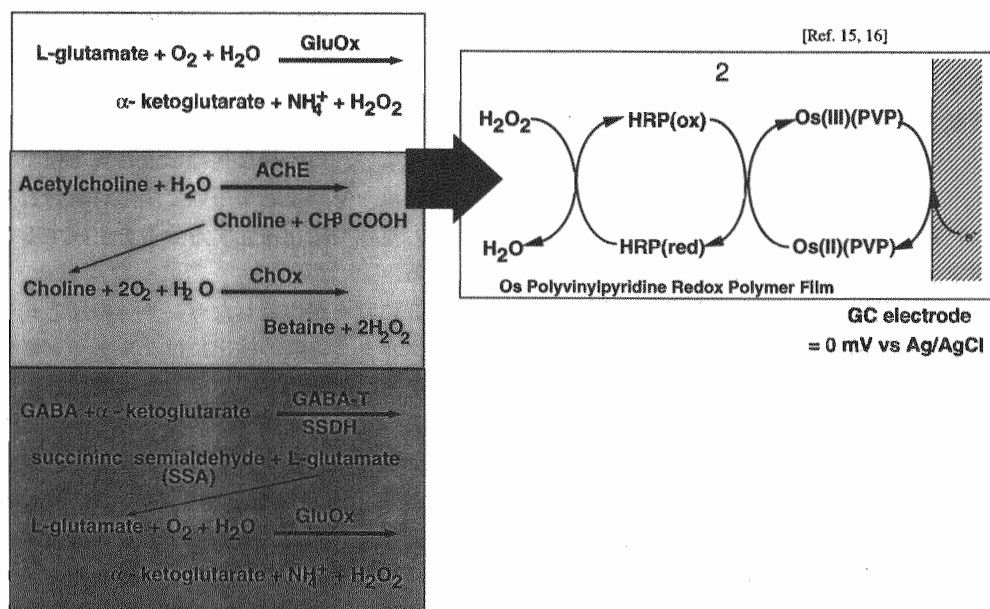


図3. グルタミン酸、アセチルコリン、GABA センサーにおける反応

アセチルコリンや GABA についても同様に酵素反応により過酸化水素を発生させて検出を行う。アセチルコリンはアセチルコリンエステラーゼによりコリンに変換し、コリン酸化酵素により酸化する[24]。GABA の測定では、ギャバナーゼという酵素によりグルタミン酸に一度変換して検出を行う[25]。

アセチルコリンや GABA を測定する際に注意しなければならないことは、測定に用いる脳神経細胞(組織)には必ず、コリンやグルタミン酸が存在することである。図3の式でも分かるように、アセチルコリンセンサーはコリンと、GABA センサーはグルタミン酸と原理的に反応する。これらの影響をなくし、高い選択性を実現するため、オンライン測定系では、酵素を修飾した電極の上流に微量容量のプレリアクターを配置した。アセチルコリンではコリン酸化酵素とカタラーゼ、GABA センサーでは、グルタミン酸酸化酵素とカタラーゼを固定したビーズを微小管に充填したものを用いた。

4.3 オンラインセンサーシステム

実際に培養細胞の測定を行うためのシステムの模式図を図4に示す。in vivo 計測では、通常 MD プロブを用いて脳内よりサンプリングを行うが、市販のプロブは長さ 1 mm 以上、直径数百マイクロメートル位あり、細胞の大きさに比べ遥かに大きい。我々のシステムではサンプリングに先端を細くしたガラスキャピラリーを用い、顕微鏡観察下でそれを細胞に近接させた。シリンジポンプを用いて吸引することにより、センサー中に細胞近傍の液を導入する[26-29]。吸引速度を大きくすると、広い範囲から溶液を集めることになるため、空間分解能が低下する。このため、低い流速で試料を導入しようとする、今度は応答性が低下する。これらの問題を解決するためにセンサーの内容積を減少させる必要がある。

酵素電極の作製について、図5(a)に示す。まず、炭素電極に HRP を含む Os-gel 溶液を導入し、溶媒蒸発法により薄膜を形成する。乾燥後、酵素を牛血清アルブミンと混合し、グルタルアルデヒド(架橋剤)と混合した後 Os-gel-

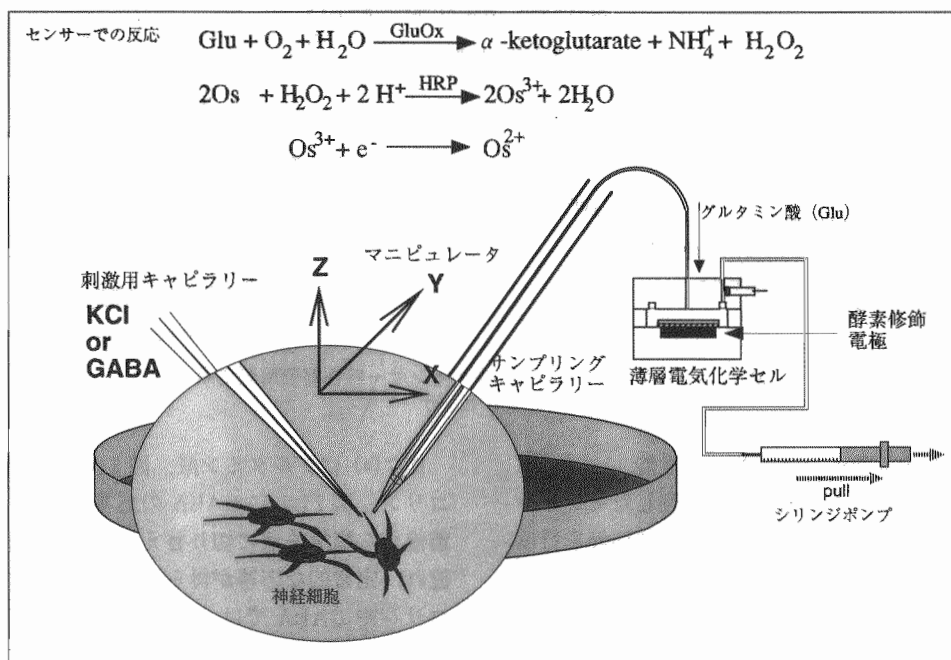


図4. オンラインセンサーによる神経伝達物質測定系概念図

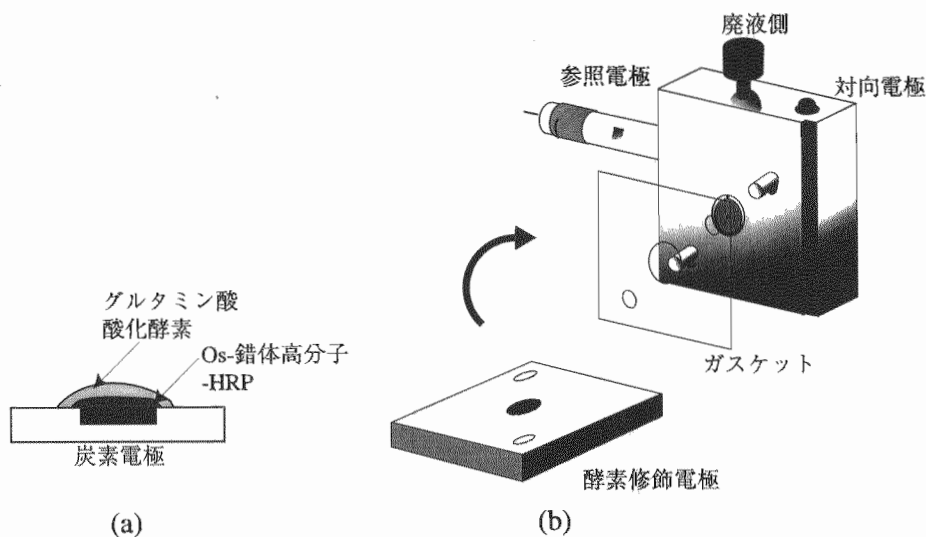


図5. グルタメートセンサーの電極部分 (a) とフローセル (b) の構造

HRP 膜上に導入して、酵素膜を形成する。酵素を修飾した電極は図5(b)のようなフローセルに装填し、サンプリング用のガラスキャピラリーとテフロンチューブにより接続した。フ

ローセルは溶液が中央から導入されるラジアルフロー型にすると内容積が小さく高い感度を得ることができる。

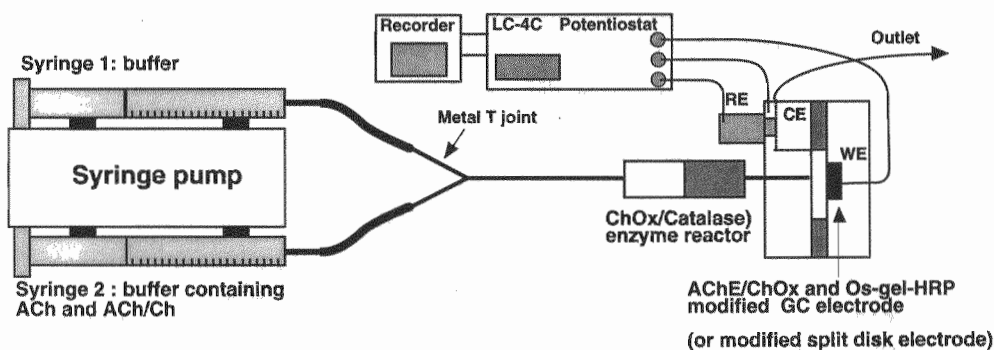
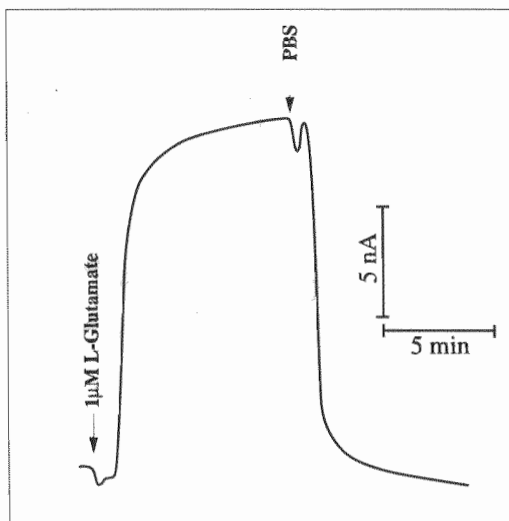


図6. 標準溶液を用いた場合のセンサー特性評価用測定系
(例: アセチルコリンセンサー)

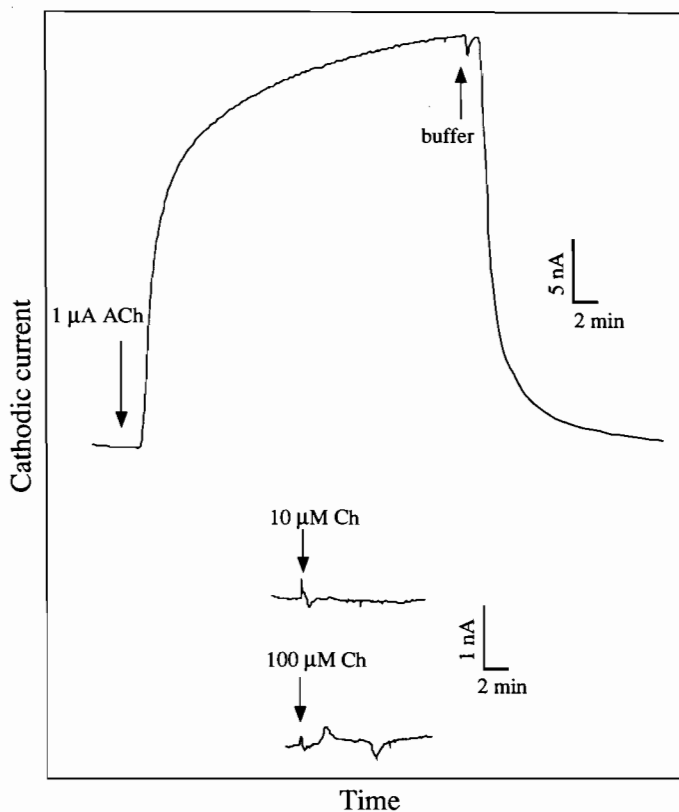
4. 4 オンラインセンサーの性能

生体試料の測定に先立ち、作製したセンサーの特性について標準試料により性能評価を行った。評価に用いた測定系を、アセチルコリンセンサーを例にとって図6に示す。測定は、2本のシリンジの一方に緩衝溶液、もう一方に所定の濃度の神経伝達物質を含む緩衝溶液を入れ、それらを交互にセンサー中に導入して測定を行った。4.2にも述べたように、フローセルの上流側にはコリンを除くための微少反応器を設けている。

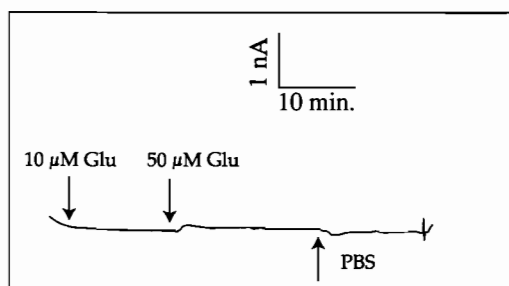
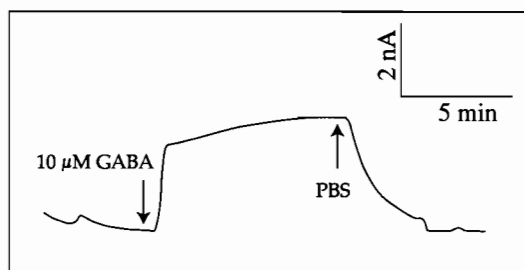
図7(a)にグルタミン酸、図7(b)にアセチルコリン、図7(c)にGABAの応答を示す。緩衝溶液から標準溶液に切り替えると、還元電流が流れ、定常的な応答が得られている。アセチルコリンやGABAでは、コリンやグルタミン酸を導入しても殆ど応答が得られずこれらの物質がブレリアクター内ではほぼ100%反応し、生成した過酸化水素が完全に消費されていることが分かる[23,24]。特に、脳内に高い濃度で存在するコリンについては、本センサーに100 μM のコリンを導入しても応答は殆ど観測さ



(a)



(b)



(c)

図7. 神経伝達物質標準溶液と妨害物質
(a) グルタミン酸, (b) アセチルコリン, (c) GABA

れず、アセチルコリンに対し極めて高い選択性
が実現できる。

図8にグルタミン酸の濃度と電流値の関
係(キャリブレーションカーブ)を示す。数十 nM

～10 μ M の広い濃度範囲で直線性が得られた。
検出限界はグルタミン酸で 10 nM, アセチル
コリンで 2.5～5 nM, GABA で 100 nM の値
が得られている。GABA の検出限界が他の 2

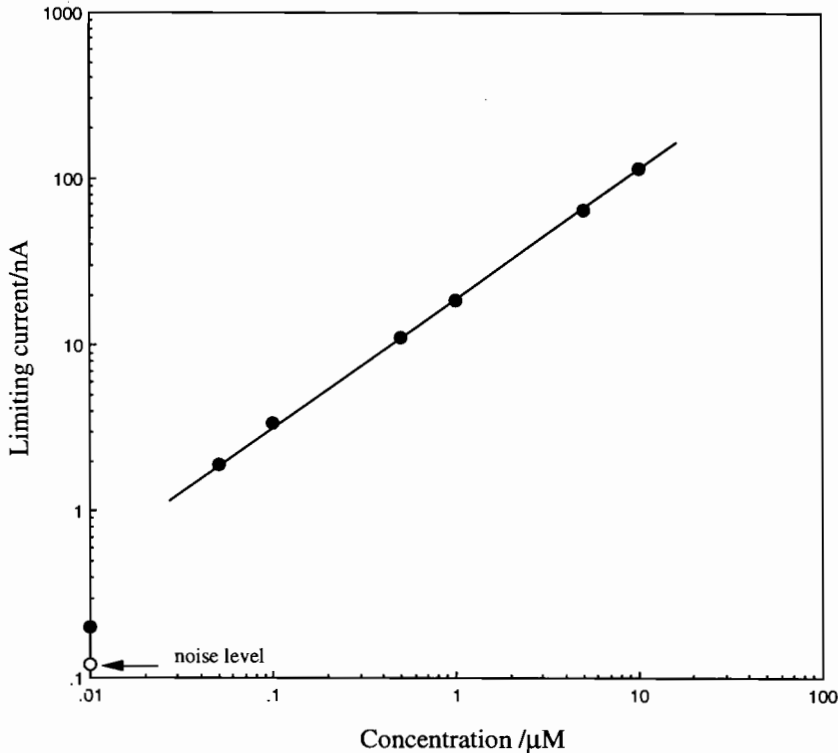


図8. グルタメートセンサーのキャリブレーションカーブ

つに比較し、高いのは酵素(ギャバーゼ)の活性が低いためと考えられる。逆にアセチルコリンでは酵素の活性が高く、1分子のアセチルコリンの酵素反応により2分子の過酸化水素を生成するため、最も低い検出限界が得られた。

5. どのようなデータが得られたか

5.1 グルタミン酸の計測

オンライン酵素センサーのグルタミン酸に対する選択性を表3に示す。ここで用いた各アミノ酸濃度はは全て 1 mM である。表より明らかなように、グルタミン酸以外のアミノ酸の選択性については 1 % 以内である。また、センサーよりグルタミン酸酸化酵素を除いた場合には、グルタミン酸標準溶液だけでなく、生体サンプルに対する反応性が消失した。また更に、グルタミン合成酵素を添加して液中よりグルタミン酸を除去した場合にも反応が消失する[26] ことなどから、この酵素センサーがグルタミン酸に

表3. グルタミン酸センサーの基質特異性

Substrate	Relative response (%)
L-Glutamic acid	100.0
L-Aspartic acid	0.68±0.14
Glycine	0.95±0.22
GABA	0.08±0.01

各基質濃度は、すべて 10 μM. 表中の値は、グルタミン酸の反応を100とした時の相対的な値で、平均±標準偏差を示す。

特異的に反応していること、そして得られた反応がグルタミン酸の変化を反映していると言える(図9)。

図10に KCl 刺激に伴って放出されたグルタミン酸の過渡応答を示す。図10(a) は P2 大脳皮質スライスより放出されたグルタミン酸をマイクロダイアリシス(MD)チューブを通して計測した結果で、(b) にオンライン酵素センサーを用いて計測した E18 由来のラット大脳皮質培養細胞からの放出の様子を示した。いずれの

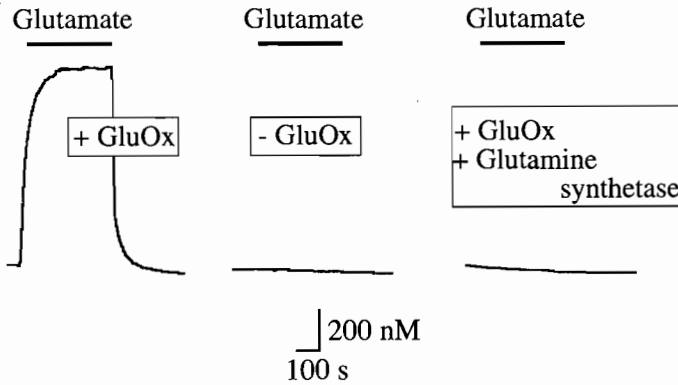


図9. グルタミン酸酸化酵素,あるいはグルタミン酸除去時のセンサーの応答

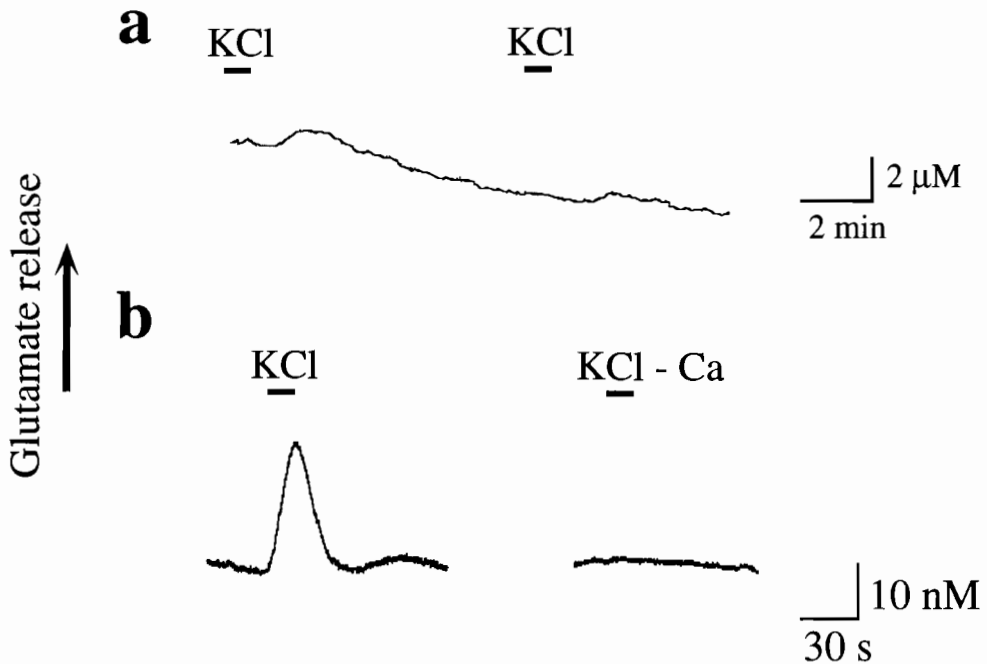


図10. KCl 刺激により, ラット培養神経細胞より放出されるグルタミン酸
(a) P2 大脳皮質スライス (MD プローブ)
(b) E18 由来の培養大脳皮質細胞 (ガラスキャピラリー)

場合も, 刺激に対し, 一過性の放出応答を示しており, オンライン酵素センサーにより, 薬理作用など, より高分解能での放出過程の計測が可能であることがわかる。

図11に GABA 添加による大脳皮質細胞からのグルタミン酸放出を示す。

ラット培養大脳皮質細胞は, GABA 添加に

対し, 一過性のグルタミン酸放出を示した。小幡ら[1]の報告以来, 胚のある時期には, 抑制性の神経伝達物質 GABA は, 神経細胞に対し脱分極作用を示すことが報告されてきた[1-3]。ここで用いたラット培養大脳皮質細胞は, 同様に GABA に対して脱分極作用を示す。従って, このグルタミン酸応答は GABA の脱分極作用

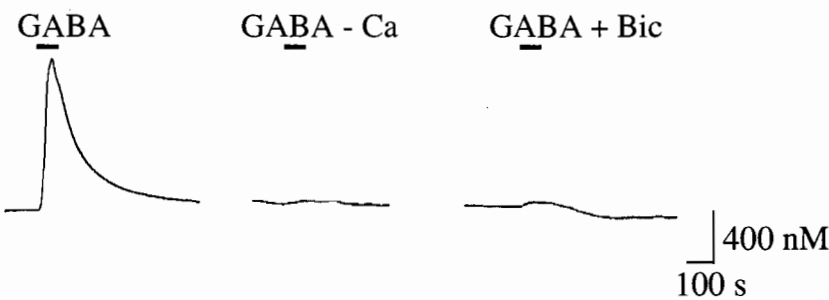


図11. GABA 添加による培養大脳皮質細胞からのグルタミン酸放出

により、生じたものであると考えられる。さらに、この応答は GABA_A のアンタゴニストであるピキュキュリンにより消失するだけでなく、TTX 感受性を示し、外液 Ca 依存性であることからシナプス活動に関与したものであると考えられる。

オンラインセンサーで得られたこのような結果を再確認する意味で、全く同様な実験条件で3分毎のサンプリングによる HPLC 測定を行い、同様の結果を得た。従って、グルタミン酸オンラインセンサーによる放出計測は信頼性が非常

に高く、グルタミン酸の放出過程を連続的に、しかも秒レベルの高時間分解能で測定できるという優れた特徴を有している [26,28]。

5. 2 アセチルコリン、GABA の計測

アセチルコリンは、その脳内や培養系での神経細胞近傍の濃度を連続的に計測した例がない。そこで、我々は培養系でアセチルコリンの連続計測を試みた。試料として、ラットの海馬スライスを用いた。図12に細胞近傍の外液を多量にサンプリングし、センサーに送り込んだ場

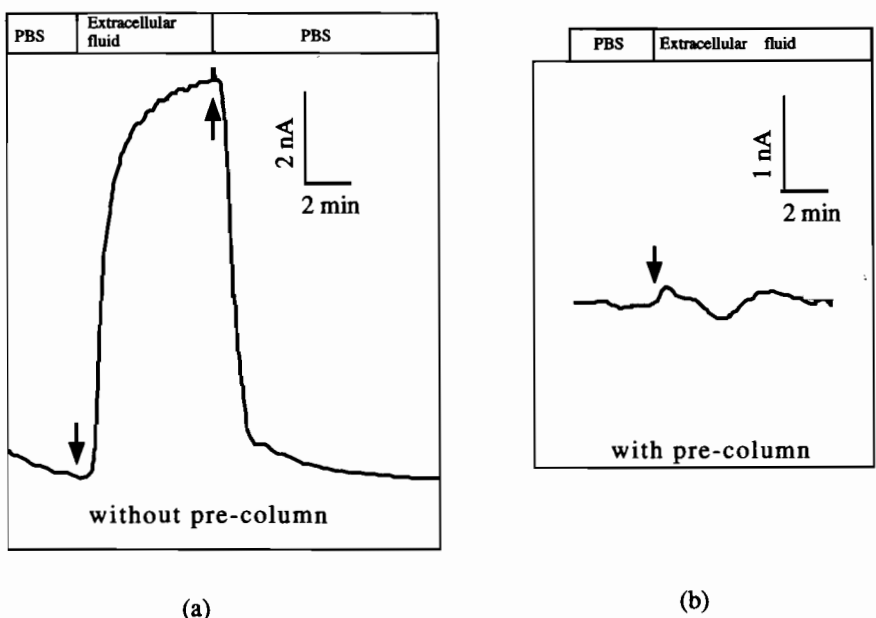


図12. ラット海馬スライスの培養液を導入した時のアセチルコリンセンサーの応答
(a) コリンを分解するプレリアクタを入れた場合
(b) プレリアクタがない場合

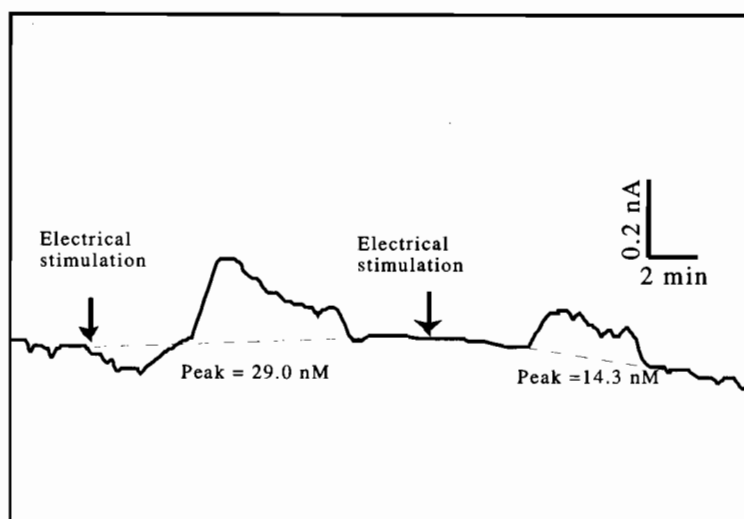


図13. 電気刺激に伴うラット海馬スライス外液のアセチルコリン濃度の増加

合の結果を示す。図12(a)はコリン酸化酵素とカタラーゼを固定化したプレリアクタを入れない場合、(b)は入れた場合の結果を示している。プレリアクタがない場合は、細胞近傍液をセンサーに送り込むと定常状態の還元電流が得られ、細胞外液のコリンがセンサーで検出されていることが分かる。一方、プレリアクタを入れると全く電流値の増大は観測されず、細胞近傍液の測定でも標準溶液と同様にコリンはプレリアクタ内で完全に分解されている[24]。

図13は、センサーを用いてラット海馬スライス近傍外液を吸引しながら、スライスを電気刺激した結果である。刺激後、10~30 nMの低濃度のアセチルコリンの増加が見られる。プレリアクタ部分の容積のため、グルタミン酸の場合に比較し、応答がブロードである。シャープな応答を得るためにはセンサーの選択性を保持したままで、内容積を減らす工夫が必要である。

一方、GABAではセンサーにより100 nMレベルの測定が可能になったものの、培養系でのGABA濃度が低いために、より一層のセンサーの高感度化が必要とされる。

6. 将来の展望

以上述べてきた様に、オンラインセンサーは

今までのHPLCを中心としたオフライン計測に代わり、神経伝達物質の計測を安定に且つ高感度で実現できるものである。その特徴である連続測定や高い測定分解能は、シナプスレベルでの神経伝達物質の放出過程を測定できるだけでなく、ごく近い将来、単一シナプスといった極微小領域から放出される神経伝達物質を、より高い時間分解能で測定することが可能となるものと考えられる。

この実現のためには、4.3で述べた様に、センサーの内容積を減らす必要がある。しかしながら、従来の方法ではサンプリングキャピラリーとフローセルの接続の部分に μL 程度のデッドボリュームが生じることやフローセルのサイズが大きくなり、顕微鏡下でセルを試料近傍に配置することが困難なため、応答時間がかかる。

近年、半導体の作製技術やマイクロマシン技術を用いてセンサーやHPLCのカラムなどをガラスの基板上に作製する方法が盛んに研究されている[30]。我々は、ガラス基板に形成した微細な流路と酵素を修飾した薄膜電極基板を張り合わせ、ガラスキャピラリーを接続した微量の一体型センサーを開発している。図14にその概略図を示す[31]。このような手法を用いて作製するセンサーでは内容積を簡単に減らすこと

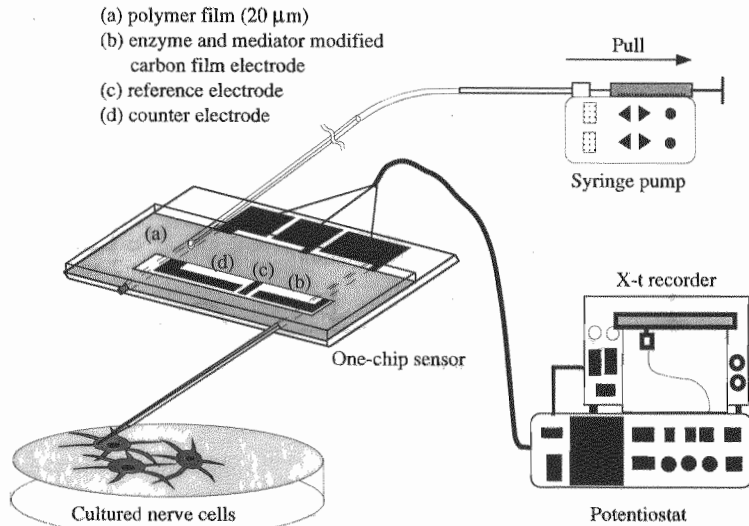


図14. マイクロマシン技術により作製した、微量グルタメートセンサーの構造

ができるだけでなく、センサーの重さも1g程度まで軽くでき、顕微鏡用のマニピュレータに容易に取り付けることができる。この様に時間空間分解能に優れたセンサーは、一細胞レベルでの迅速な測定を可能にするものと期待される。

一方、神経活動を細胞のネットワークレベルで理解するには刺激が神経回路をどのように伝搬するかを測定する必要がある。既に細胞の膜電位や、カルシウム濃度において光学的手法により神経回路全体をイメージングする方法や、Caged化合物を用いた刺激法[32]などが報告/確立されている。神経伝達物質についても、セロトニンなど自家蛍光の強度が大きい分子について、細胞から放出される物質のイメージングが報告されている[33]。光に対する感度がないグルタメートやGABAは、センサーをマルチチャンネル化することにより、信号の伝達に伴って変化する伝達物質の濃度を神経回路全体で測定できると考えられる。その実現にはマイクロメーターオーダーのセンサーを再現性良く基板上に配列することが必要で、酵素などの有機物を集積化する技術の開発が求められている。

さらにセンサーの微小化は、グルタミン酸、

アセチルコリン、GABAといった多種の神経伝達物質に対する異なったセンサーの集積化を可能にするだけでなく、これら物質の同時測定により、神経伝達物質間相互の働きを調べることも可能となるものと考えられる。

文 献

- [1] Obata K, Oide M, Tanaka H: Excitatory and inhibitory actions of GABA and glycine on embryonic chick spinal neurons in culture, *Brain Res.*, **144**: 179-184, 1978.
- [2] Walton MK, Schaffner AE, Barker JL: Sodium channels, GABA_A receptors, and glutamate receptors develop sequentially on embryonic rat spinal cord cell, *J. Neurosci.*, **13**: 2068-2084, 1993.
- [3] Torimitsu K, Kawana A, Barker JL: GABA_A receptor-mediated, Cl^- -dependent potentials changes and Ca_i^{2+} responses in chick embryonic telencephalic cells change with time in culture, *Soc. Neurosci.*, **19**: 1147, 1993.
- [4] Behar TN, Schaffner AE, Colton CA et al.: GABA-induced chemokinesis and NGF-induced chemotaxis of embryonic spinal cord neurons, *J. Neurosci.*, **14**: 29-38, 1994.
- [5] Umemura K, Gemba T, Mizuno A et al.: Inhibitory effect of MS-153 on elevated brain glutamate level induced by the rat middle cerebral artery occlusion, *Stroke*, **27**: 1624-1628, 1996.
- [6] Umemura K: A novel photochemical model of

- the middle cerebral artery for thrombosis research and evaluation of anti-thrombotic agents, *Folia Pharmacol Jpn* **109**: 175-185, 1997.
- [7] Lada MW and Kennedy RT: Quantitative in vivo monitoring of primary amines in rat caudate nucleus using microdialysis coupled by a flow-gate interface to capillary electrophoresis with laser induced fluorescence detection, *Anal. Chem.*, **68**: 2790-2797, 1996.
- [8] Hu Y, Mitchell KM, Albahadily FN, Michaelis EK and Wilson GS: Direct measurement of glutamate release in the brain using a dual enzyme-based electrochemical sensor, *Brain Res.*, **659**: 117-125, 1994.
- [9] Tamiya E, Sugiura Y, Amou Y, Karube I, Ajima A, Kato RT and Ito M: Direct monitoring of glutamate released from cerebellar neurons using platinized carbon disk microelectrode modified with glutamate-oxidase-bound membrane, *Sensors & Materials* **7**: 249-259, 1995.
- [10] Cosnier S, Innocent C, Allien L, Poitry S and Tsacopoulos M: An electrochemical method for making enzyme microsenors. Application to the detection of dopamine and glutamate, *Anal. Chem.*, **69**: 968-71, 1997.
- [11] Albery WJ, Boutelle MG and Galley PT: The dialysis electrode—a new method for in vivo monitoring, *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* **1992**: 900-901, 1992.
- [12] Berners MOM, Boutelle MG and Fillenz M: On-line measurement of brain glutamate with an enzyme/polymer-coated tubular electrode, *Anal. Chem.*, **66**: 2017-2021, 1994.
- [13] Zilkha E, Obrenovitch TP, Koshy A, Kusakabe H and Bennetto HP: On-line monitoring using microdialysis coupled to enzyme-amperometric analysis, *J. Neurosci. Meth.*, **60**: 1-9, 1995.
- [14] Ueda Y, Obrenovitch TP, Lok SY, Sarna GS and Symon L: Changes in extracellular glutamate concentration produced in the rat striatum by repeated ischemia, *Stroke*, **23**: 1125-1131, 1992.
- [15] Niwa O, Torimitsu K, Morita M, Osborne P and Yamamoto K: Concentration of extracellular L-glutamate released from cultured nerve cells measured with small volume online sensor, *Anal. Chem.*, **68**: 1865-1870, 1996.
- [16] Navera EN, Suzuki M, Tamiya E, Takeuchi T and Karube I: Nafion-coated carbon fiber for acetylcholine and choline sensor, *Electroanalysis*, **5**: 17-22, 1993.
- [17] Mazzei F, Botre F, Lorenti G and Porcelli F: Peroxidase based amperometric biosensors for determination of γ -aminobutyric acid, *Anal. Chim. Acta*, **328**: 41-46, 1996.
- [18] Benveniste H, Drejer J, Schousboe A et al.: Elevation of the extracellular concentration of glutamate and aspartate in rat hippocampus during transient cerebral ischemia monitored by intracerebral microdialysis, *J Neurochem* **43**: 1369-1374, 1984.
- [19] Choi DW: Glutamate neurotoxicity and diseases in the nervous system, *Neuron* **1**: 623-634, 1988.
- [20] Wahl F, Obrenovitch T, Hardy A et al.: Extracellular glutamate during focal cerebral ischemia in rats: time course and calcium dependency, *J Neurochem* **63**: 1003-1011, 1994.
- [21] Choi DW: 4th IBRO Congress of Neuroscience Abstr **18**: 1995.
- [22] Vreeke M, Maidan R and Heller A: Hydrogen peroxide and B-nicotinamide adenine dinucleotide sensing amperometric electrodes based on electrocal connection of horseradish peroxidase redox centers to electrodes through a three-dimensional electron relaying polymer network, *Anal. Chem.*, **64**: 3084-3090, 1992.
- [23] Huang T, Yang L, Gitzen J, Kissinger PT, Vreeke M, Heller A: Detection of basalacetylcholine in rat brain microdialysate, *J. Chromatogr.*, **494**: 297-302, 1995.
- [24] Niwa O, Horiuchi T, Kurita R and Torimitsu K: On-line electrochemical sensor for selective continuous measurement of acetylcholine in cultured brain tissue, *Anal. Chem.*, **70**: 1126-1132, 1998.
- [25] Niwa O, Kurita R, Horiuchi T and Torimitsu K: Small volume on-line sensor for continuous measurement of γ -aminobutyric acid, *Anal. Chem.*, **70**: 89-93, 1998.
- [26] Torimitsu K and Niwa O: Real-time detection of GABA-induced synaptic glutamate release in cultured rat cortex, *NeuroReport*, **8**: 1353-1358, 1997.
- [27] Niwa O, Horiuchi T and Torimitsu K: Continuous monitoring of L-glutamate released from cultured nerve cells by online sensor coupled with micro-capillary sampling, *Biosens. & Bioelect.*, **12**: 311-319, 1997.
- [28] Torimitsu K, Kurita R and Niwa O: Enzyme-based real-time detection of synaptic glutamate release modulated by GABA and neurotrophins in cultured rat neurons, *Neural Dev.*, 474-480, 1998.
- [29] Torimitsu K, Kurita R and Niwa O: Real-time detection of synaptic glutamate release induced by GABA and neurotrophins in cultured rat cortex, *J. Neurochem.*, **69**: S64, 1997.
- [30] Manz A, Graber N and Widmer HM: Miniaturized total chemical analysis systems; A novel concept for chemical sensing, *Sensors & Actuators, B1*: 244-248, 1990.
- [31] Niwa O, Kurita R, Horiuchi T, Tabei H and Torimitsu K: Microfabricated sensor for con-

tinuous measurement of glutamate, Anal. Sci., in press.

- [32] Torimitsu K and Niwa O: Direct detection of uncaged glutamate and the laser photostimulation of cultured rat cortex, NeuroReport, **9**:

599-603, 1998.

- [33] Tan W, Parpura V, Haydon PG and Yeung ES, Neurotransmitter imaging in living cells based on native fluorescence detection, Anal. Chem., **67**: 2575-2579, 1995.