

オンラインセンサーによる培養神経細胞からのグルタメート放出測定

* このドキュメントは、ビー・エー・エス（株）主催による EC セミナーの抄録です。
EC セミナーに関してのお問い合わせは、sales@basj.com にお願ひ致します。

NTT 基礎研究所 丹羽 修

1. 目的

神経伝達物質のリアルタイム測定は脳神経系の情報処理機構解明の為に重要である。神経伝達物質の一つであるグルタミン酸は脳内海馬における記憶（長期増強）に関わりをもつと言われており、その量の変化をリアルタイムで高感度に計測する様々な方法が研究されている。我々は、ラディアルフローセルと酵素カラムを用いてオンラインセンサーを作製した。今回はこのセンサーの特性とマイクロダイヤリシス膜などのサンプリングプロブと組み合わせた培養細胞系での刺激に应答したグルタミン酸放出測定について報告する。

2. 実験

電極として 3、或いは 6 mm 径のグラッシーカーボン電極（ビーエーエス製）、及びリング/ディスク薄膜炭素薄膜電極を使用した。酵素（グルタミン酸酸化酵素、ヤマサ醤油：GluOx）はビーズに固定化した後ピークチューブに充填した。電極上にはメディエータとして西洋ワサビペルオキシターゼ（HRP）を含むポリビニルピリジン-0s 錯体（0s-gel-HRP）を修飾した(1)。検出の模式図を図 1 に示す。グルタメートは酵素によって酸化され、発生した過酸化水素は HRP によって還元される。反応によって酸化された HRP は電極から 0s ポリマーを介して電子が供給されることにより再び還元体に戻される。電極からの還元電流の大きさを連続的にモニターすることによりグルタメート濃度を測定することができる。実際の測定は 2 本のシリンジポンプを使用し、一方で緩衝溶液、他方でグルタミン酸標準溶液を送液して行い、センサーの感度、検出限界等を評価した。

測定試料としてラットエンブリオの脳皮質神経細胞を薄膜電極アレイを有する基板上に培養した。図 2 に示すように薄膜電極を用いた電氣的または KCl により刺激し、マイクロダイヤリシスプロブにより連続して細胞近傍のグルタミン酸をサンプリングしセンサーにより濃度変化を測定した。

3. 結果

グルタミン酸のリン酸緩衝生理食塩水溶液をセンサーに送液すると定常状態の還元電流が再現性良く得られた。1 μM のグルタメートを流速 16 μl

/min で送液した時最大 24 nA の電流値が観測され、センサーを通過した試料の内、94%以上が酵素反応及び電極反応を起こしていることが分かった。図3に電流値の濃度依存性について示す。1 μ M 以下の低濃度領域で良い直線性が得られ、7.6 nM (S/N = 3) の低い検出限界が得られた。図4にラット神経培養細胞近傍にサンプリングプローブをおき、細胞外液のグルタメート濃度変化を測定した結果を示す。顕微鏡視野内の1～数個の細胞を KCl 刺激すると、細胞近傍の溶液で Sub- μ M オーダーのグルタミン酸の増加が観測された(2)。電気刺激に対しても同様な結果が得られ、本センサーにより刺激に応答したグルタミン酸放出を培養系において再現性良く検出できることが分かった。

4 参考文献

- (1) L. Yang, E. Janle, T. Huang, J. Gitzen, P.T. Kissinger, M. Vreeke and A. Heller, Anal. Chem., 1995, 67, 1326.
- (2) O. Niwa, K. Torimitsu, M. Morita, P. G. Osborne and K. Yamamoto, Anal. Chem. in press