

# Development of a Microdialysis Probe with Multichannel Microelectrodes

Yasuhiro X. Kato Non-member (NTT Corporation, xige@bri.ntt.co.jp)

Makio Kashino Non-member (NTT Corporation and JST ERATO Shimojo Project, kashino@avg.bri.ntt.co.jp)

Naoyuki Hironaka Non-member (JST ERATO Shimojo Project, hironaka@shimojo.jst.go.jp)

**Keywords :** Microdialysis probe, Microelectrodes, Micro Electro Mechanical System

To advance understanding of the mechanisms of neural interactions, including complex electrical and biochemical reactions, we designed and fabricated a microdialysis probe with multichannel neural electrodes for simultaneously recording both electrical and chemical neural signals. MEMS (micro-electro-mechanical systems) technologies were applied to fabricate the microelectrodes on the curved surface of the guide cannula of the microdialysis probe. The advantage of placing microelectrodes on the guide cannula is that, like conventional microdialysis probe, the part of membrane in the microdialysis probe can be removed and replaced without further surgery to the animal, depending on an experimental design or in the case of mechanical failure of a membrane. Because of difficulty in controlling the etching conditions to expose the microelectrodes, we applied only a wet process for this fabrication with photosensitive polyimide and electrodeposition resist. Photosensitive polyimide was used for base and insulated layers. Chromium-gold, patterned with electrodeposition resist as a sacrificial layer, was used for individual recording electrode sites, interconnect lines, and connection pads. The diameter of recording electrodes is 100  $\mu\text{m}$  and the alignments of recording electrodes are 100, 300, and 1800  $\mu\text{m}$  from the tip of the guide cannula, in order to record local field potentials in hippocampal and neocortical neurons. In biochemical studies, the fabricated microdialysis probe with multichannel electrodes has satisfied the physical properties of electro impedance and the recovery rate of neural substances of dopamine and serotonin, permitting practical use for animal experiments.

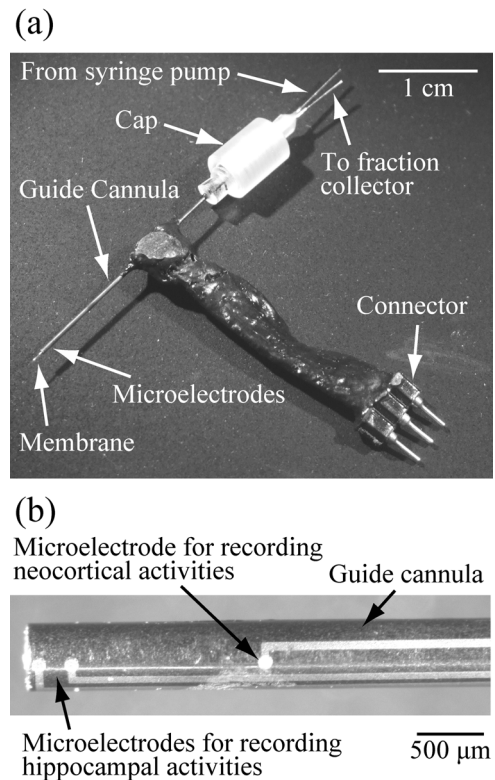


Fig. 1. Photographs of the fabricated microdialysis probe with multichannel neural electrodes. (a) Overview of the microdialysis probe with multichannel microelectrodes. (b) Magnified view of microelectrodes on the guide cannula for recording neural signals.

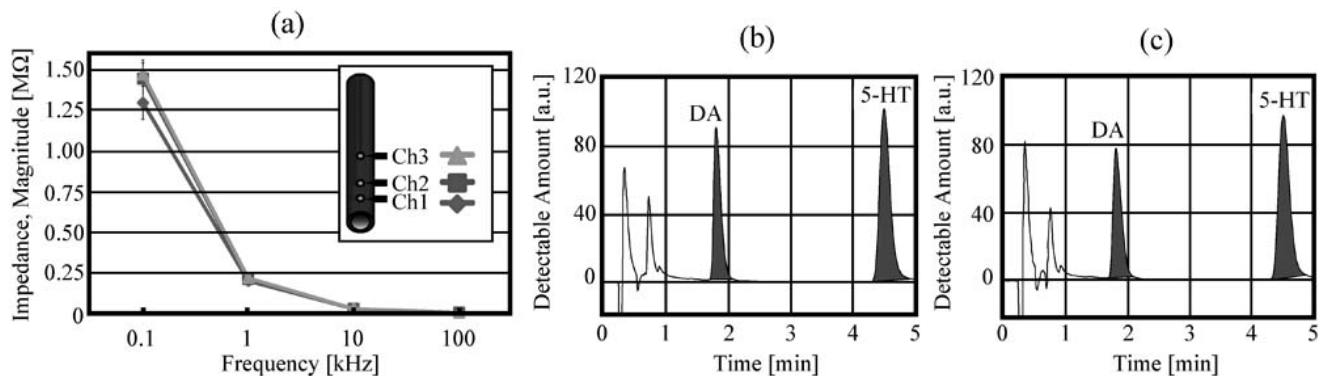


Fig. 2. Results of impedance spectroscopy and chromatogram levels of dopamine (DA) and serotonin (5-HT) in the perfusate. (a) Impedance spectroscopy results of the microdialysis probe with microelectrodes. (b) Level of DA and 5-HT without guide cannula. (c) Chromatogram level of DA and 5-HT with guide cannula.

## 多チャンネル微小電極を有するマイクロダイアリシスプローブの開発

非会員 加藤 康広\* 非会員 柏野 牧夫\*,\*\*  
非会員 廣中 直行\*\*

## Development of a Microdialysis Probe with Multichannel Microelectrodes

Yasuhiro X. Kato\*, Non-member, Makio Kashino\*\*, \*\*, Non-member, Naoyuki Hironaka\*\*, Non-member

To advance understanding of the mechanisms of neural interactions, including complex electrical and biochemical reactions, we designed and fabricated a microdialysis probe with multichannel neural electrodes for simultaneously recording both electrical and chemical neural signals. The microelectrodes were fabricated on the curved surface of the guide cannula of the microdialysis probe by using micro-electro-mechanical systems technologies. The advantage of placing microelectrodes on the guide cannula is that, like conventional microdialysis probe, the part of membrane in the microdialysis probe can be removed and replaced without further surgery to the animal, depending on an experimental design or in the case of mechanical failure of the membrane. Because of difficulty in controlling the etching conditions to expose the microelectrodes, we applied only a wet process for this fabrication with photosensitive polyimide and electrodeposition resist. Photosensitive polyimide was used for base and insulated layers. Chromium-gold, patterned with electrodeposition resist as a sacrificial layer, was used for individual recording electrode sites, interconnect lines, and connection pads. In biochemical studies, the fabricated microdialysis probe with multichannel electrodes has satisfied the physical properties of electro impedance and the recovery rate of neural substances, permitting practical use for animal experiments.

キーワード : マイクロダイアリシスプローブ, 微小電極, Micro Electro Mechanical System

Keywords : Microdialysis probe, Microelectrodes, Micro Electro Mechanical System

## 1. はじめに

脳の仕組みとところの働きの関係を理解しようとする脳科学は、近年増加傾向にあるうつ病やストレス性などの精神・神経疾患<sup>(1)(2)</sup>のメカニズム解明や治療法の確立に極めて重要な手法である。我々は、この脳の仕組みとところの働きの関係を定性定量評価するために、神経生理学手法を用いた脳多地点異種計測を可能とするプラットフォームづくりを進めている。これは我々が、脳の仕組みとところの働きの関係が、脳における神経伝達物質による化学信号と活動電位による電気信号の2つの異種信号の巧妙な連鎖によって成り立つと考えているからである。

これらの関係を分析する神経生理学研究の代表的な手法

として、定量分析には電気信号による賦活強度の計測<sup>(3)</sup>、定性分析（快・不快の情動など）にはマイクロダイアリシス法による神経伝達物質の検出<sup>(4)~(6)</sup>などが広く利用されている。本来両者は、同一個体の同部位で分析することが理想的である。しかしながら、従来の手法では、電気・化学信号の計測方法が異なるために計測部の一体化が困難であり、また、多チャンネル化とその配置も困難であった。このために別個体の同部位、同一個体でも別部位、例えば右脳に微小電極、左脳と同様な機能部位にダイアリシスプローブを留置する<sup>(7)</sup>などの方法によって計測が行われてきた。

そこで、本研究では、同一個体における電気・化学信号の同時同部位計測を目指した、多チャンネル微小電極を有するマイクロダイアリシスプローブの開発を行った。これは、化学信号を計測するマイクロダイアリシスプローブのガイドカニューレの曲面上に、電気信号を計測する微小電極を形成し、従来異なる計測部を一体化したデバイスである。

## 2. 実験方法

〈2・1〉 微小電極の設計 微小電極による計測は、数

\* 日本電信電話（株）  
NTT コミュニケーション科学基礎研究所  
〒243-0198 神奈川県厚木市森の里若宮 3-1  
NTT Communication Science Laboratories,  
Nippon Telegraph and Telephone Corporation  
3-1 Morinosato-Wakamiya Atsugi-Shi, Kanagawa 243-0198

\*\* JST ERATO 下條潜在脳機能プロジェクト  
〒243-0198 神奈川県厚木市森の里若宮 3-1  
JST ERATO Shimajo Project  
3-1 Morinosato-Wakamiya Atsugi-Shi, Kanagawa 243-0198

週間から数カ月程度可能であるとの報告<sup>(8)</sup>に対して、脳内におけるマイクロダイアリスプローブの透析時間の限界は、最も普及しているエイコム社の透析プローブで2日程度だと経験的に言われている。この原因は、透析プローブの透析膜の目詰まりや留置による機械的な損傷による不具合と考えられ、取り換え可能な透析プローブを有する構造は、マイクロダイアリスプローブに不可欠の要素である。また、これまで提案されてきた微小電極をマイクロダイアリスプローブに取り付ける方法は、針電極をガイドカニューレに接着<sup>(9)</sup>したもの、カニューレに透析プローブとともに内包<sup>(10)</sup>したもの、またはマイクロドライブと一体化<sup>(11)</sup>したものなどがある。これらに取り付け方法の違いがあるものの、単に針電極を取り付けた構造であり、針電極を複数束ねるなどの多チャンネル化に伴って留置体積が増加し、侵襲性が高くなることや、計測部位の微細な配置が困難であることから実用性に乏しかった。以上を考慮し、本研究では、術後脳内へ留置するマイクロダイアリスプローブのガイドカニューレの表面上に微小電極を複数設置することを Micro-Electro-Mechanical Systems (MEMS) 技術<sup>(12)~(14)</sup>により試みた。ガイドカニューレの表面上に微小電極を薄膜形成することで、体積を増加せずとも微小電極の多チャンネル化と自在な配置を可能とした。設計寸法の指針として、微小電極の配置は、計測用電極の露出面積の直径が 100  $\mu\text{m}$ 、ガイドカニューレ先端からの電極の距離が 100  $\mu\text{m}$ , 300  $\mu\text{m}$ , 1800  $\mu\text{m}$ 、留置可能部位の長さは 10mm と設計した。これらの寸法は、ラット海馬 CA1 と新皮質における局所電場電位の検出<sup>(15)</sup>を目的として定めた。

**〈2・2〉 微小電極の作製** マイクロダイアリスプローブのガイドカニューレ曲面上への微小電極の作製は、文献 16 を応用して MEMS 技術に基づき次の手順で行った (Fig.2 参照)。まず、ステンレス製ガイドカニューレ (外径 0.5 mm, 内径 0.4 mm) の両端を、エポキシ系接着剤 (High super 5, Cemedine Co., Ltd) で封止した (Fig.2(a))。これは、

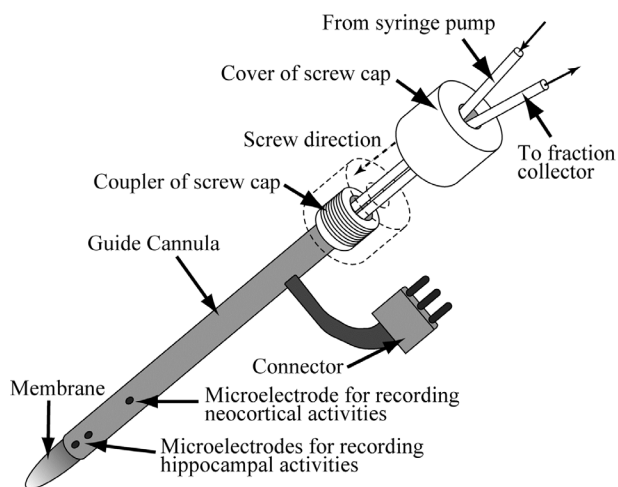
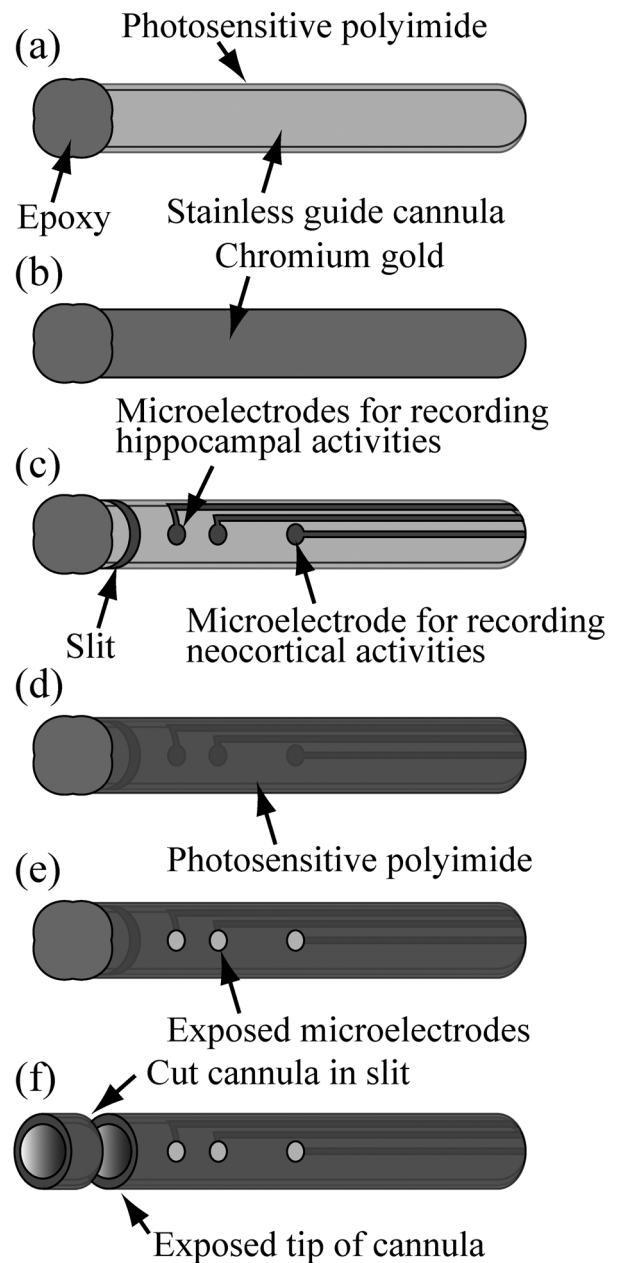


Fig. 1. Proposed design of the microdialysis probe with microelectrodes.

ガイドカニューレ内へ不要な液や異物などが流入して付着することを防ぎ、後に挿入する透析プローブの破損を抑止することが目的である。次に、ステンレス製ガイドカニューレを絶縁するために、生体適合性が高く<sup>(16)</sup>、薄膜形成が可能な感光性ポリイミド (Fujifilm Durimide 7510, Fujifilm Electronic Materials Co., Ltd.)<sup>(14)</sup>を固着した (Fig.2(a))。固着条件は、立ち上げたガイドカニューレを 2500 rpm で 60 秒のスピンコートし、プレート上にて 100  $^{\circ}\text{C}$  15 分ソフトベー



(a) The hole was covered with epoxy and photosensitive polyimide was deposited on guide cannula. (b) Chromium gold was deposited. (c) Microelectrodes, hard-wiring, and slit were patterned. (d) Photosensitive polyimide was deposited again. (e) Exposed electrode sites were patterned. (f) The guide cannula was cut in the optimal length at the slit.

Fig. 2. Schematic diagram of manufacturing process for the microdialysis probe with microelectrodes by using MEMS surface micromachining technologies.

ク、全体を露光・現像後、350 °C 60 分のハードベイクを行った。このときの感光生ポリイミドの膜厚は、約 2 μm である。次に、クロム 500 Å と金 3000 Å を蒸着した後 (Fig.2(b))、電極部位と配線部位、またガイドカニューレの両端側に切断部の目印となるスリットラインをパターンニングした (Fig.2(c))。この際、パターンニングの犠牲層として電着レジスト (Elecoat EU-XC, Shimizu Co., ltd.) を利用した。さらに、電極部と配線部位を絶縁するために、感光性ポリイミドを上述と同条件で再度固着し (Fig.2(d))、露出する電極部位の形状にパターンニングした (Fig.2(e))。次に、ガイドカニューレ両端付近に設けたスリットラインをダイサー (DAD-2H/6T, Disco Corporation) で切断し (Fig.2(f))、0.254 mm の銀ワイヤ (No. 787000, A-M Systems, Inc.) を導電性エポキシ接着剤 (CW2400 circuitworks, Chemtronics)、銀ワイヤとコネクタをはんだづけで接続した。最後に、ねじ式のキャップを取り付けた後、銀ワイヤからコネクタ周囲をゴム接着剤 (Y-902, Teroson Corporation) で覆って絶縁した。透析プローブやダミープローブの固定はねじ式キャップで行い、必要に応じて着脱することができる (Fig.1 参照)。

**〈2・3〉 電極インピーダンスの測定** マイクロダイアリスプローブをゆっくりと 0.9%生理食塩水に浸し、室温下におけるインピーダンスの変化 (測定周波数: 0.1 kHz, 1 kHz, 10 kHz, 100 kHz) を LCR メーター (LCR HiTESTER 3522-50, Hioki) により定電圧計測 (20 mV) した。

**〈2・4〉 ダイアリス回収率の計測** 作製したマイクロダイアリスプローブのガイドカニューレに透析プローブを挿入し、神経伝達物質の回収率の評価を行った。神経伝達物質には、ドパミン (DA) とセロトニン (5-HT) を用い、作製したガイドカニューレの有無で比較した。透析プローブ (AI-25-2, Eicom Corporation) をマイクロシリンジポンプ (ESP-64, Eicom Corporation) とオートインジェクタ (EAS-20, Eicom Corporation) に接続した後、室温 25 °C において透析膜 (AI-25-2, Eicom Corporation) を、ドパミンとセロトニンがそれぞれ 100 pg/μl 含む溶液に浸した。次に、流速 2 μl/min、リンゲル液 (147 mM Na<sup>+</sup>, 4 mM K<sup>+</sup>, 2.3 mM Ca<sub>2</sub><sup>+</sup>, 155.6 mM Cl<sup>-</sup>) の灌流を 19 分間行った。回収液は、分離カラム (EICOMPAK PP-ODS, Eicom Corporation) を用いて高速液体クロマトグラフ装置 (HTEC-500, Eicom Corporation) にて分離定量を行った。なお、総回収液量は 38 μl、神経伝達物質の総回収量の理論値は、3800 pg である。

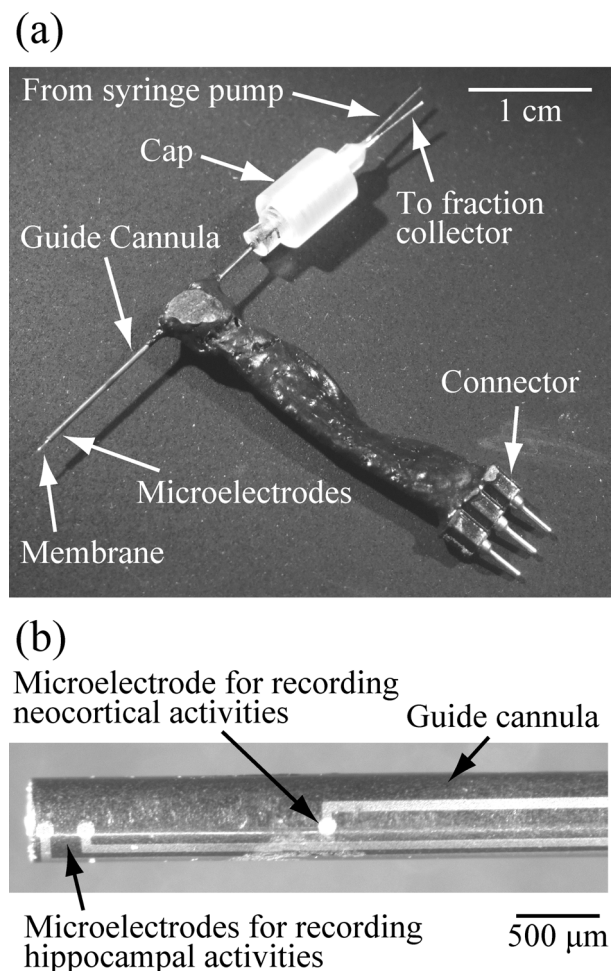
### 3. 結果と考察

**〈3・1〉 作製したガイドカニューレ** 作製した 3 チャンネルの微小電極を有するマイクロダイアリスプローブの写真を Fig.3 に示す。Fig.3 に示されるように、提案した形状に、MEMS 技術を利用して作製可能であることを示した。作製工程において、ガイドカニューレからの剥離や、サンドイッチされたポリイミドの層間剥離などはみられず、ガイドカニューレの曲面上に、十分に密着していると考えられる。また、ガイドカニューレ上に形成したパターンは、中心側

から 150 μm 程度 (300 μm 幅) より外側に向かうにつれてパターンが太くなる傾向や部分剥離が観察された。我々の作製環境では、L/S=25/25μm 迄は安定したガイドカニューレへのパターン形成が可能であることを考慮すると、理論的には 6 個まで電極を配置することができる。さらに電極数を増加する方法として、裏面への電極配置が提案できる。この場合は、片面 6 個までの電極として、表裏面で 12 個まで電極数を増加することができる。

**〈3・2〉 電極インピーダンスの測定結果** 作製した 3 本のマイクロダイアリスプローブのインピーダンスの大きさを計測した結果を Fig.4 に示した。1 kHz におけるインピーダンスの大きさの平均値 (±は標準偏差) は、先端側のチャンネル 1 では 201.4±18.2 kΩ, 中心側のチャンネル 2 では、213.9±17.9 kΩ, キャップ側のチャンネル 3 では 219.4±18.2 kΩ となった。これらの電極インピーダンスは、局所電場電位を計測するに妥当な値<sup>(16)</sup>を示した。

**〈3・3〉 ダイアリス回収率の計測結果** 作製した 1 本のマイクロダイアリスプローブに挿入した透析プローブか



(a) Overview of the microdialysis probe with multichannel microelectrodes. (b) Magnified view of microelectrodes on the guide cannula for recording neural signals.

Fig. 3. Photographs of the fabricated microdialysis probe with multichannel neural electrodes.

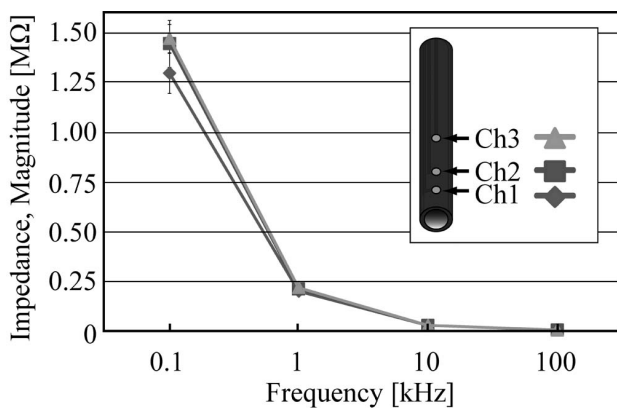
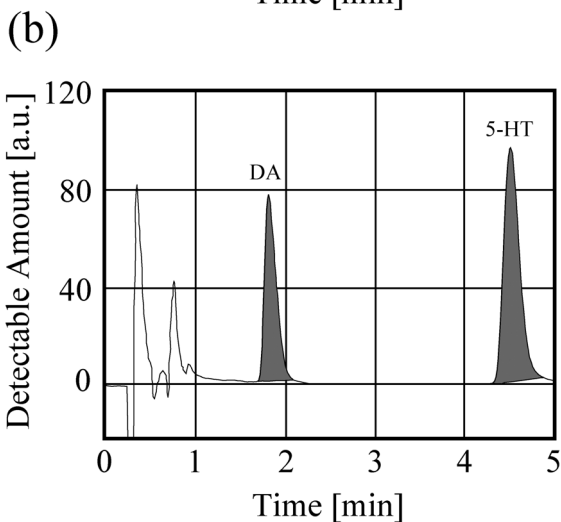
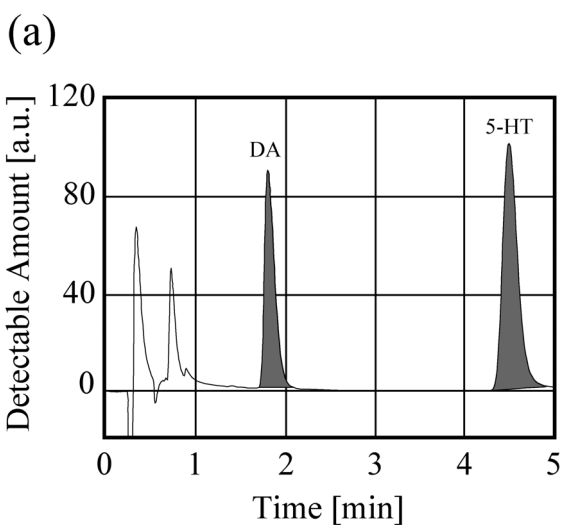


Fig. 4. Impedance spectroscopy results for the microdialysis probe with microelectrodes.



(a) Chromatogram levels of DA and 5-HT without guide cannula. (b) Chromatogram levels of DA and 5-HT with guide cannula.

Fig. 5. Chromatogram levels of dopamine (DA) and serotonin (5-HT) in the perfusate.

らのドパミン回収率は21.2% (809.18 pg), セロトニンの回収率は21.6% (821.29 pg)であった (Fig.5(b)参照)。ガイドカニューレ無し (透析プローブのみによる回収) では、ド

パミン回収率は21.3% (812.66 pg), セロトニンの回収率は21.1% (803.31 pg)であり (Fig.5(a)参照), ガイドカニューレ有りと同等の回収率を示した。また, 膜長2 mmの透析プローブにおけるドパミンとセロトニンの回収率として, 15~20%前後は妥当<sup>(17)</sup>であることから, ガイドカニューレの加工による回収率への不具合は見受けられず, 動物実験への使用に十分耐え得ると考える。

#### 4. おわりに

本研究では, 従来実現が困難であった神経活動の電気・化学信号の同部位・同時計測を目指した, 多チャンネル微小電極を有するマイクロダイアリスプローブの試作を行った。試作したマイクロダイアリスプローブによる生化学評価では, 動物実験への使用に耐え得る結果を示した。今後は, 動物実験による機能評価を進めたい。

#### 謝辞

本研究における生化学実験の一部は, 日本科学技術振興機構 ERATO 下條潜在脳機能プロジェクト 田中智子研究員より御支援をいただいた。本研究の一部は, 日本科学技術振興機構 ERATO 下條潜在脳機能プロジェクトの助成を受けた。ここに記して謝意を表す。

(平成21年2月20日受付, 平成21年8月24日再受付)

#### 文献

- (1) 厚生労働省:「平成13年度版 厚生労働白書」, ぎょうせい (2001)
- (2) 内閣府:「平成19年度版 障害者白書」, 佐伯印刷 (株) (2007)
- (3) JJ. Tecce JJ: “Contingent negative variation (CNV) and psychological processes in man”, *Psychol Bull*, Vol.77(2), pp.73-108 (1972)
- (4) L. Hernandez, BG. Stanley, and BG. Hoebel: “A small, removable microdialysis probe”, *Life Sci*, Vol.39(26), pp.2629-37 (1986)
- (5) N. Hironaka, K. Tanaka, Y. Izaki, K. Hori, and M. Nomura: “Memory-related acetylcholine efflux from rat prefrontal cortex and hippocampus: a microdialysis study”, *Brain Res*, Vol.901(1-2), pp.143-50 (2001)
- (6) 吾郷由希夫・松田敏夫:「長期隔離飼育マウス脳の無拘束マイクロダイアリス法」, *日本薬理学雑誌*, Vol.122(2), pp.135-140 (2003)
- (7) T. Tanaka and N. Hironaka: “Implication of dopamine D1A and D2 receptors in hippocampus in the conditioning of the rewarding effect of cocaine”, *CINP*, Munich Germany (2008)
- (8) RJ. Vetter, JC. Williams, JF. Hetke, EA. Nunamaker, and DR. Kipke: “Chronic neural recording using silicon-substrate microelectrode arrays implanted in cerebral cortex”, *IEEE Trans Biomed Eng*, Vol.51, No.6, pp.896-904 (2004)
- (9) M. Gruss, M. Bredenkötter, and K. Braun: “N-methyl-D-aspartate receptor-mediated modulation of monoaminergic metabolites and amino acids in the chick forebrain: an *in vivo* microdialysis and electrophysiology study”, *J Neurobiol*, Vol.40, No.1, pp.116-35 (1999)
- (10) TP. Obrenovitch, J. Urenjak, and E. Zilkha: “Intracerebral microdialysis combined with recording of extracellular field potential: a novel method for investigation of depolarizing drugs *in vivo*”, *Br J Pharmacol*, Vol.113, No.4, pp.1295-302 (1994)
- (11) N. Ludvig, PE. Potter, and SE. Fox: “Simultaneous single-cell recording and microdialysis within the same brain site in freely behaving rats: a novel neurobiological method”, *J Neurosci Methods*, Vol.55, No.1, pp.31-40 (1994)
- (12) KD. Wise and K. Najafi: “Microfabrication techniques for integrated sensors and Microsystems”, *Science*, Vol.254, pp.1335-1342 (1991)

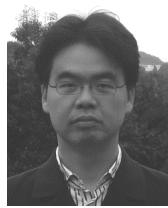
- (13) 赤松直樹・鈴木隆文・満洲邦彦・藤田博之・金 範俊・竹内昌治:「神経電位計測用フレキシブルシリコンプローブアレイ」, 電学論 E, **123**, 12, pp.571-576 (2003-12)
- (14) 加藤康広・牧勝 弘・古川茂人・柏野牧夫:「容易かつ廉価な多チャンネル柔軟神経電極の作製法の開発」, 生体医工学, Vol.46, No.5, pp.522-528 (2008)
- (15) G. Paxinos and C. Watson C: “The rat brain in stereotaxic coordinates, Ed 6”, Academic Press (2007)
- (16) Y. Sun, SP. Lacour, RA. Brooks, N. Rushton, J. Fawcett, and RE. Cameron : “Assessment of the biocompatibility of photosensitive polyimide for implantable medical device use”, Biomed Mater Res A, Published Online (2008)
- (17) エイコム情報 No.17, (株) エイコム, No.17 (2004)

**加藤 康広**



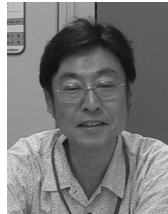
(非会員) 1975年7月31日生。2007年東京大学大学院工学系研究科博士課程修了。同年より、日本電信電話(株)NTTコミュニケーション科学基礎研究所 リサーチ・アソシエイト。神経インタフェース、聴覚生理学、福祉工学などの研究に従事。日本生体医工学会、日本神経科学学会、日本 DDS 学会、日本音響学会会員。博士(工学)。

**柏野 牧夫**



(非会員) 1964年7月7日生。1989年東京大学大学院人文科学研究科修士課程修了。同年、日本電信電話(株)入社。2003年より同所人間情報研究部感覚運動研究グループ主幹研究員・グループリーダー。JST ERATO 下條潜在脳機能プロジェクト潜在聴覚処理研究グループリーダー、東京工業大学大学院総合理工学研究科物理情報システム専攻連携教授を兼務。専門は聴覚を中心とした心理物理学、認知脳科学。日本音響学会、Association for Research in Otolaryngology 他会員。博士(心理学)。

**廣中 直行**



(非会員) 1956年7月2日生。1984年東京大学大学院人文科学研究科博士課程単位取得退学。(財)実験動物中央研究所付属前臨床医学研究所・行動薬理研究室主任研究員、理化学研究所脳科学総合研究センター・情動機構研究チーム研究員、専修大学文学部心理学教授を経て、2005年よりJST ERATO 下條潜在脳機能プロジェクト嗜癲行動研究グループリーダー。専門は実験心理学・精神薬理学。日本薬学会、日本神経精神薬理学会、日本精神神経学会他会員。博士(医学)。