公告本

申請日期	90. 07. 03
案　　號	90116405
類　　別	G01N 27/30, C12M 1/34, G01N 27/416, 33/483

A4
C4

（以上各欄由本局填註）

發明 ~~新型~~ 專利說明書 524973

一、發明 ~~新型~~ 名稱	中　文	細胞外記錄用電極
	英　文	"EXTRACELLULAR RECORDING ELECTRODE"
二、發明 ~~創作~~ 人	姓　名	1.岡　弘章 HIROAKI OKA 2.行政　哲男 TETSUO YUKIMASA 3.小川　龍太 RYUTA OGAWA 4.杉原　宏和 HIROKAZU SUGIHARA 5.十　克之 KATSUYUKI TSUJI 6.吉元　幸文 YUKIFUMI YOSHIMOTO
	國　籍	1-6.均日本
	住、居所	1.日本國大阪府枚方市中宮北町3-10枚方花園山莊913號室 2.日本國大阪府枚方市西船橋二丁目10-1-206 3.日本國大阪府守口市橋波東之町1-4-15帕雷拉嘉露603 4.日本國大阪府交野市幾野1-10-630 5.日本國大阪府枚方市西田宮町12-30-408 6.日本國兵庫縣尼崎市富松町一丁目18-5 101
三、申請人	姓　名（名　稱）	日商松下電器產業股份有限公司 MATSUSHITA ELECTRIC INDUSTRIAL CO., LTD.
	國　籍	日本
	住、居所（事務所）	日本國大阪府門眞市大字門眞1006番地
	代表人姓　名	中村　邦夫 KUNIO MAKAMURA

本紙張尺度適用中國國家標準(CNS) A4規格(210×297公釐)

裝 訂 線

（由本局填寫）

承辦人代碼：	
大　　類：	
ＩＰＣ分類：	

A6
B6

本案已向：

國（地區）	申請專利，申請日期：	案號：	，□有　□無主張優先權
日本	2000年03月29日	特願2000-092548	□有☑無主張優先權

有關微生物已寄存於：　　寄存日期：　　，寄存號碼：

本紙張尺度適用中國國家標準(CNS) A4規格(210×297公釐)

裝　訂　線

五、發明說明（ 1 ）

技術領域

本發明與用於細胞外記錄的多重電極有關，其在電氣生理學領域內非常有用，並且用於測量神經單位活動所產生的電位改變。

背景技藝

近來，神經元對電子裝置的適用性已經過蓬勃的研究以及醫學上的研究。在處於活動狀態下的神經元內會產生活動電位，神經元離子穿透性的變化會導致細胞內與細胞外離子濃度的改變，負責用於產生活動電位。因此，若測量到神經元周圍離子濃度改變伴隨的電位變化，就可以監測到神經元的活動。

一般會藉由微操縱器或這類裝置的幫助，將用於測量細胞外電位的玻璃或金屬(例如白金)電極放置在細胞周圍，來達成上述利用細胞活動的電位測量。另外，在細胞內會插入類似的電極，以便測量細胞內的電活動。這些傳統技術具有下列缺點：需要有電極製備這方面的技術、電極具有高阻抗因而讓訊號容易遭受外來雜訊的干擾以及若將電極插入細胞內會引起細胞或組織受傷。因此，傳統電極並不適合用於長時間監測。

爲了避免這種問題，發明者研發出一種多重電極，包含複數個由絕緣基板上的導電材料製成之微電極，以及一其上可培養細胞或組織的導線圖(日本專利特許公開出版品第6-78889號以及日本專利特許公開出版品第6-296595號)。運用此多重電極，就可在不傷害細胞或組織的情況

本紙張尺度適用中國國家標準(CNS) A4規格(210×297公釐)

五、發明說明（ 2 ）

下長時間監測神經細胞的活動。

在上述的多重電極內，電極最上方的表面包含使用電解液鍍上多孔白金黑色物(日本專利特許公開出版品第6-78889號)或使用沉積法鍍金(日本專利特許公開出版品第6-296595)的細胞。在白金黑色物電鍍的情況下，雖然非常容易將電極的阻抗調整到特定程度，例如大約50 kΩ或以下，不過電極的強度相當低，因此電極的重複使用性不高。在用沉積法形成金的情況下，強度就有所改善，但難以將阻抗降低到大約50 kΩ或以下。

發明揭露事項

本發明在於解決上述問題，本發明的目的在於提供一種具有阻抗頻率特性適合記錄細胞電子訊號的細胞外記錄電極，該電極具有低阻抗、不易受外來雜訊干擾以及容易重複使用。

本發明發現在細胞外記錄電極的生產中，只要將用於在最上層表面形成導電材料的電流密度最佳化，則可獲得表面粗糙的多孔導電材料表面因而增加表面積，如此該多孔導電材料將具有用於細胞外記錄電極的較佳特性。本發明完全以上述發現爲基礎。

本發明提供一種用於測量細胞電器生理學特性的多重電極，該多重電極包含在基板上提供的複數個微電極，以及用於將電子訊號提供給微電極或從微電極擷取電子訊號之線路部分。該微電極在其表面上具有一多孔導電材料，該導電材料係由下列各物組成之群中選出，包括金、氮化

本紙張尺度適用中國國家標準(CNS) A4規格(210×297公釐)

五、發明說明（ 3 ）

鈦、氧化銀以及鎢，並且每個微電極的阻抗都爲50 kΩ或以下。

該多孔性導電材料最好是金，並且由電流密度爲1.0至5.0 A/dm^2的電流通過10至360秒來形成。

本發明也提供一種用於測量細胞電器生理學特性的多重電極，該多重電極包含在基板上提供的複數個微電極，以及用於將電子訊號提供給微電極或從微電極擷取電子訊號之線路部分。由等效電路(具有大體上與該微電極的阻抗相同之阻抗)的靜電容量計算得出之微電極表面積大於等於微電極投射面積10倍並小於等於200倍，並且該微電極的阻抗爲50 kΩ以下。

「微電極的投射面積」一詞在此表示在導電材料形成之前微電極最上層表面的整個區域。

由氣體吸收法所測得的微電極表面積最好小於等於微電極投射面積的5 x 10^5倍。

在本發明的一個具體實施例內，該微電極以矩陣形式配置在基板上，線路部份包含連接到微電極的導線以及連接到導線末端的接點，並且以絕緣層覆蓋該導線至少一表面。

在本發明的一個具體實施例內，可利用蝕刻方式，像是RIE（反應離子蝕刻）或ICPRIE（感應耦合電漿RIE），來提供該多孔導電材料。

本發明也提供一種包含上述多重電極的整合式細胞安裝裝置，該整合式細胞安裝裝置具有一用於將細胞或組織放

本紙張尺度適用中國國家標準(CNS) A4規格(210×297公釐)

五、發明說明（ 4 ）

置在多重電極基板上的細胞安裝區域。

本發明也提供一種細胞電位測量裝置，包含上述的整合式細胞安裝裝置、一連接到該微電極用於處理輸出訊號(由細胞或組織的電器生理活動所產生)的輸出訊號處理器以及一選擇性將電子刺激提供給細胞或組織的刺激訊號提供裝置。

本發明也提供一種細胞電位測量系統，包含上述的細胞電位測量裝置、一用光監測細胞或組織的光監測裝置以及/或一用於控制細胞或組織培養環境的細胞培養裝置。

圖式簡單說明

圖1a爲顯示在比較範例內，在微電極表面上用電解液以1.0 A/dm^{2}電流密度形成的鍍金層之顯微照片，其放大率爲2500倍，圖式內的縮尺爲50 μm。

圖1b爲顯示依照本發明在微電極表面上用電解液以1.5 A/dm^{2}電流密度形成的鍍金層之顯微照片，圖式內的縮尺爲50 μm。

圖1c爲顯示依照本發明在微電極表面上用電解液以2.0 A/dm^{2}電流密度形成的鍍金層之顯微照片，圖式內的縮尺爲50 μm。

圖2a爲顯示與恆等電流刺激有關，在比較範例內以1.0 A/dm^{2}的電流密度通過電解液來形成的鍍金微電極上，細胞電位變化反應的電腦螢幕顯示之64頻道列印圖，刺激訊號供應至第29頻道。

圖2b爲顯示在缺乏細胞時圖2a內所示的鍍金微電極雜訊

本紙張尺度適用中國國家標準(CNS) A4規格(210×297公釐)

五、發明說明（ 5 ）

程度的電腦螢幕顯示之64頻道列印圖。

圖2c爲顯示與恆等電流刺激有關，依照本發明以1.5 A/dm^2的電流密度通過電解液來形成的鍍金微電極上，細胞電位變化反應的電腦螢幕顯示之64頻道列印圖。

圖2d爲顯示在缺乏細胞時圖2c內所示的鍍金微電極雜訊程度的電腦螢幕顯示之64頻道列印圖。

圖2e爲顯示與恆等電流刺激有關，依照本發明以2.0 A/dm^2的電流密度通過電解液來形成的鍍金微電極上，細胞電位變化反應的電腦螢幕顯示之64頻道列印圖。

圖2f爲顯示在缺乏細胞時圖2e內所示的鍍金微電極雜訊程度的電腦螢幕顯示之64頻道列印圖。

圖3爲顯示本發明的微電極阻抗特性圖。

圖4a爲顯示本發明的微電極等效電路之圖式。

圖4b爲顯示本發明的微電極等效電路之圖式。

圖5爲顯示本發明的微電極等效電路之阻抗特性圖。

圖6爲顯示本發明的微電極等效電路之阻抗特性圖。

圖7爲顯示比較範例的微電極阻抗特性圖。

圖8爲顯示比較範例的微電極等效電路之阻抗特性圖。

圖9爲顯示比較範例的微電極阻抗特性圖。

圖10爲顯示比較範例的微電極等效電路之阻抗特性圖。

圖11爲本發明的電鍍鍍金微電極與傳統產品在可重複使用能力方面的使用壽命測試結果圖。

執行本發明的最佳模式

此後將詳細說明本發明的功能。

本紙張尺度適用中國國家標準(CNS) A4規格(210×297公釐)

五、發明說明（ 6 ）

（用於微電極的多孔導電材料之生產）

依照本發明的細胞外記錄用多重電極包含複數個絕緣基板上的微電極，而細胞則置於微電極上來測量細胞的電活動。

本發明的多重電極特別包含一位於微電極最上層表面上的多孔導電材料，此微電極的阻抗爲50 kΩ或以下，該微電極的阻抗較好是35 kΩ或以下、更好是25 kΩ或以下，最好是10 kΩ或以下。此處所用的阻抗定義成在50 mV的端子間電壓上以1 kHz的頻率測得之值。本發明內阻抗的最低限制值並未特別設限，但在本發明的指示中是越低越好。

吾人相信這種低阻抗遍佈於電極上提供的導電材料之多孔結構內，此處的多孔性也就是導電材料表面的粗糙或有許多微小突起與凹陷之程度。當使用顯微鏡放大觀察時，本發明的多孔導電材料表面看起來像是由直徑大約0.01-25 μm的小粒子緊密膠合起來的。當電極的最上層表面具有這種多孔結構時，表面積就可顯著增加。結果，就可達到傳統沉機法所產生平滑金表面所無法獲得的低阻抗。

如上面說明的，由電極最上層表面的表面積可定義電極最上層表面的多孔結構，例如藉由精通此技藝的人士所熟知之使用氣體吸收的BET法，可定義電極最上層表面的表面積。另外，可用根據代表微電極與溶液間之介面模式的電路之等效電路的靜電容量來計算阻抗。

本發明的多孔導電材料可用過電流密度下的電解電鍍來生產，該過電流密度較佳是1.2 A/dm^{2}範圍內的電流密度、

本紙張尺度適用中國國家標準(CNS) A4規格(210×297公釐)

五、發明說明（ 7 ）

更佳是1.0至5.0 A/dm^2，最好是1.4至2.1 A/dm^2。這可與使用大約1.0 A/dm^{2}電流密度的傳統導電材料之工業電解電鍍相比較。請注意，即是使用超過3.0 A/dm^{2}的電流密度，還是可進行多孔導電材料的電鍍。若電流密度過大，則表面會過度粗糙而難以維持所要的微電極形狀(例如方形)。在本發明內，在代表性的經歷10-360秒(最好是30-240秒)過電流密度之電流通過後可產生導電材料鍍金。若電流的通過時間過短，則不足以在微電極表面上形成導電材料電鍍。若電流的通過時間過長，微電極上導電材料的成長就會不平均，如此有部份導電材料電鍍就會迅速成長而其他則緩慢成長，並且電極的形狀就不像方形。

上述的電解電鍍情況僅供說明，因此可根據所使用的電解電鍍裝置或操作程序的需求，在可達到上述低阻抗的範圍內進行選擇性修改。

另外，本發明的多孔導電材料可用蝕刻方法獲得，例如，使用氧化劑以及溶解劑的化學蝕刻、在使用酸當成主要成份的電解液內用直流或交流電讓電解液導電的化學蝕刻或這類的蝕刻方法，藉此增加表面積。

本發明微電極的最上層表面具有上述的多孔結構，進一步，最上層表面的材料例如是金，藉以達到高強度以及低阻抗特性。因此，微電極的循環使用效率極高，導致極高的成本效益。相較於傳統電極內使用的重白金黑色物之電解電鍍，該電鍍具有低阻抗，但其強度卻也相當低，如此便禁不起重複使用。尤其是，當進行與稍後將說明的範例

本紙張尺度適用中國國家標準(CNS) A4規格(210×297公釐)

五、發明說明（ 8 ）

5內條件相同的使用壽命測試之後，本發明電極的阻抗增加率在20個循環之後相對於原來的阻抗只有30%或以下、較佳爲20%或以下並且更佳是15%或以下。

上述多孔導電材料位於本發明的微電極最上層表面之上，多孔導電材料的下層電極材料可爲任何可充分黏貼到多孔導電材料的材料，多孔導電材料的下層電極材料範例包含但不受限有，較佳是利用無電或電解液電鍍的鎳、通常使用無電電鍍的金等等。這些底層的厚度並不設限，例如鎳電鍍層的厚度大約是3000至7000埃，而在鎳電鍍層上則可提供厚度大約是300至700埃的無電金電鍍層。

在本發明的多重電極內，在基板上將以置於矩陣形式內方格交叉處上之方式提供複數個微電極。在此配置中，複數個電極的間隔都相等。因此，相鄰神經細胞的細胞本體都可放在相鄰的電極上，以偵測細胞本體之間的電子訊號轉換。

每個微電極都對外提供電子訊號，另外，將電子訊號從每個微電極擷取到外面的線路部份都連接到每個電極。具代表性的是，線路部份包含一導線，該導線連接到每個微電極並且從電極往基板週邊延伸。該線路部份可進一步包含一連接到導線末端(通常位於基板週邊)的接點。線路部份的材料範例較佳是包含銦錫氧化物(ITO)。請注意到，上述阻抗是微電極與線路部份的總體特性值，事實上，上述線路部份的組抗值與電極最上層表面的材料與尺寸所定的值比起來是微不足道的。因此，電極下層以及線路部份

本紙張尺度適用中國國家標準(CNS) A4規格(210×297公釐)

裝 訂 線

五、發明說明（ 9 ）

的材料選擇大體上是不會影響阻抗的。

具代表性的是，導線的表面會覆蓋一絕緣層，該絕緣層只提供於導線上，但較佳是在基板上除了微電極以及新鄰接點以外的整個上表面之上。絕緣層的範例較佳是包含較容易處理的聚丙烯樹脂或感光聚醯酸。

（多重電極的架構）

有關本發明的多重電極之詳細設計，只要不干擾上述多孔導電材料的形成與功能，任何已知的多重電極之結構特色（例如日本專利特許公開出版品第6-78889號）都可使用。此後，將顯示多重電極的代表性範例結構。此處所說明的具體實施例在考量到許多因素之後可選擇性進行修改，像是要測量的神經細胞特性、要測量的資料性質等等。

多重電極內包含的基板較佳是由透明絕緣材料所製成，以便在培養細胞之後進行觀測。這種材料的範例包含：像是矽玻璃、鉛玻璃以及硼砂玻璃的玻璃、像是石英、聚甲基丙烯酸鹽或異量分子聚合物的無機基材以及像是聚苯乙烯和聚乙烯對苯二甲酸的透明有機基材。最好使用具有機械強度並且透明的無機基材。

基板上提供的電極之材料範例包含有，銦錫氧化物（ITO）、氧化錫、Cr、Au、Cu、Ni、Al以及Pt。在此之中，最好是ITO與氧化錫。ITO具有透明特性並且特別合適的高導電性。通常藉由在部份電極材料（具有所要的位置以及形狀）的最上層表面上提供多孔導電材料電鍍層就可產生上述的微電極。

本紙張尺度適用中國國家標準(CNS) A4規格(210×297公釐)

裝 訂 線

五、發明說明（ 10 ）

通常複數個微電極的間隔都相等，就是相鄰電極之間的距離都完全相等。相鄰電極之間的距離可在從大約10到1000 μm的範圍內。具代表性的是，電極的形狀大體上是方形或圓形，其邊緣或直徑在從大約20到200 μm的範圍內。就以上述的設定來說，若要測量的神經細胞之細胞本體(就是細胞本體、樹突與軸突)位於電極上，則非常有可能其他細胞本體(與之前細胞本體的樹突相連)會位於相鄰的電極上。

一連接到微電極的導線可遇上述相同的電極材料所製成。在此情況下，最好也是ITO。通常，這種電極材料會沉積在基板上。之後，將使用光致蝕刻劑進行蝕刻，藉以形成微電極最底層上所要的整合圖樣，以及包含一導線的線路部份。在此情況下，微電極最底層和線路部份的厚度大約是500至5000埃。

該導線配置成大體上是從該微電極往外輻射延伸，在結合此大體上輻射狀的配置後，複數個微電即將特別配置成其中心位於8 x 8方格的個別交叉點上。

覆蓋導線的絕緣層材料範例包含透明樹脂，像是聚醯酸(PI)樹脂以及環氧樹脂，而最好是感光樹脂，像是負感光聚醯酸(NPI)。例如，當使用感光樹脂當成絕緣層時，可利用由光蝕刻形成的圖樣再微電極上絕緣層部份內形成一開口，而只露出此電極。如上述的，該所提供的絕緣層將大體上覆蓋絕緣基板的整個表面，除了相鄰的電極以及與外接電路的接點以外。如此便可有效率的生產。

本紙張尺度適用中國國家標準(CNS) A4規格(210×297公釐)

裝 訂 線

五、發明說明（ 11 ）

（用於測量細胞電位的裝置與系統）

有關利用本發明多重電極來測量神經細胞或這類細胞的多種系統組件之詳細設計，只要不干擾上述多孔導電材料的形成與功能，任何已知的多重電極之結構特色（例如日本專利特許公開出版品第8-62209號）都可使用。

通常，本發明的多重電極會額外提供有助於在多重電極上進行細胞培養的結構，以及選擇性提供有助於多重電極處理的結構。此結果多重電即可提供當成整合式細胞安裝裝置。

爲了在多重電極上進行細胞培養，透過基板上的絕緣層提供可固定培養媒介的結構構件（大體上將絕緣層整個覆蓋起來）。例如，由聚苯乙烯製成的圓柱形框架可用將複數個微電極圍繞起來的方式固定在基板上，藉此獲得上述的固定結構。在此情況下，聚苯乙烯框架的內側可定義出細胞固定區域。在製備固定結構之前或之後都可在微電極的表面上形成本發明的多孔導電材料。

爲了幫助在測量細胞時多重電極的處理，例如可使用印刷電路板，該印刷電路板具有連接到微電極上接點的導線圖，用來扮演將電路連接延長到外面的角色，該連接是從微電極建立到該接點。具有適當形狀的固定器（像是將微電極夾起來的兩部份分離固定器）都可用於將印刷電路板與多重電極固定而還保有之間的連接。

整合式細胞安裝裝置可進一步與刺激訊號提供裝置和輸出訊號處理器結合，藉以獲得用來刺激多重電極上細胞的

本紙張尺度適用中國國家標準(CNS) A4規格(210×297公釐)

五、發明說明（ 12 ）

細胞電位測量裝置，並處理對刺激做出回應的輸出訊號。

此刺激訊號提供裝置可將刺激訊號提供給複數個微電極之中任何一對電極。當細胞對刺激訊號做出回應時，其他電極就會偵測到引起的電位改變，並將對應到此改變的輸出訊號輸出給訊號處理器，該輸出訊號透過適當的處理轉給顯示裝置或這類裝置。請注意，在此也可同時接收到在未收到刺激訊號而細胞內產生的自發性電位。

利用具有適當測量軟體的單一部電腦就可實現此刺激訊號提供裝置以及輸出訊號處理器，電腦螢幕上的測量軟體提供一用來設定刺激條件和這類情況的參數設定視窗、一用於記錄從細胞偵測到的電位變化並透過多個頻道即時顯示之記錄視窗，以及一用於分析記錄資料的資料分析視窗。最好是，來自電腦的刺激訊號可透過D/A轉換器轉換給多重電極，而來自細胞的輸出訊號則透過A/D轉換器轉換給電腦。

細胞電位測量裝置可進一步與光監測裝置以及細胞培養裝置結合，藉此獲得用於長期培養神經細胞，以及可穩定並精確測量神經細胞的電器生理活動之細胞電位測量系統。其中光監測裝置可包含一倒轉顯微鏡，可進一步包含一用於顯微鏡的SIT攝影機，包含高解析度顯示幕以及影像分類裝置。對於細胞培養裝置來說，任何可控制培養環境溫度、培養媒介的循環、空氣與二氧化碳的混合氣體之供應等等的裝置或組合都可使用。

範例

本紙張尺度適用中國國家標準(CNS) A4規格(210×297公釐)

五、發明說明（ 13 ）

此後將藉由圖式範例來說明本發明，但是本發明並不受限於這些範例。

（範例1）

平面多重電極的表面會在許多電流密度下鍍上電解金電鍍層（每個電極具有50 x 50 μm的中央部份會置於8 x 8方格的任一交叉點上，因此微電極的整個表面（投射面積a）was 50 x50 x 64 = 160000 μm^2）。

尤其是，將以1.0 A/dm^2、1.5 A/dm^2和2.0 A/dm^2的電流密度來形成電解金電鍍層，微電極（具有以個別電流密度所形成的金電鍍層）的阻抗將在1 kHz頻率、50 mV中間端子電壓以及計算出五次測量結果平均的條件下進行測量，結果顯示在表格1內。當電流密度增加時，每個微電極的平均阻抗都會降低。

表格1：電流密度以及平均阻抗

電流密度（A/dm^2）	平均阻抗（kΩ）
1.0	336.39 ± 78.59
1.5	22.07 ±1.95
2.0	16.56 ± 2.34

在此將以光學顯微鏡來觀察微電極的鍍金表面，顯微相片顯示於圖1a至1c內。圖1a、1b和1c爲分別用1.0 A/dm^2、1.5 A/dm^2和2.0 A/dm^2電流密度所獲得的電鍍表面之顯微相片。在1.0 A/dm^2電流密度的情況下，將獲得大致上平順的電鍍表面。相較之下，當電流密度增加時，鍍金表面的多孔性就會更加顯著，並且電極表面的面積就會增加。

本紙張尺度適用中國國家標準(CNS) A4規格(210×297公釐)

五、發明說明（ 14 ）

（範例2）

在此將確實使用範例1內所獲得的微電極表面以及老鼠hippocampus（腦部）切片，來測量喚起的電位以及噪訊等級。Hippocampus切片來自於老鼠，五歲大的雌性c57black6老鼠，用Fluothane麻醉並砍下頭部取出腦部，取下的腦部立刻放入冰鎮的Ringer溶液冷卻。然後只解剖腦部包含hippocampus的區塊，之後會利用手術刀切割獲得的腦部區塊，讓切片有250 μm的厚度，該切片會放置在微電極上並進行測試。

在供應具有雙極脈衝（其中脈衝寬度爲100 μsec）的10 μA持續電流來測量喚起電位以及雜訊等級。如此將在刺激產生5 msec之前以及刺激產生45 msec之後測量64個電極的回應，然後顯示在具有64頻道的電腦螢幕上。結果顯示於圖2a至2f內。圖2a、2c和2e顯示在與上述持續電流刺激有關的鍍金微電極上細胞之電位改變反應（即是喚起電位）。圖2a顯示以1.0 A/dm^2的電流密度進行電解電鍍所獲得的電極之喚起電位。圖2c顯示以1.5 A/dm^2的電流密度進行電解電鍍所獲得的電極之喚起電位。圖2e顯示以2.0 A/dm^2的電流密度進行電解電鍍所獲得的電極之喚起電位。

圖2b、2d和2f顯示發生在圖2a、2c和2e內個別鍍金微電極內之雜訊等級。

從圖2a、2c和2e可看見，由較高電流密度所獲得具有多孔鍍金層的電極對於供應的刺激訊號有清晰的反應，並可用較有效的方法將持續電流刺激供應給電極，這可與用1.0

本紙張尺度適用中國國家標準(CNS) A4規格(210×297公釐)

五、發明說明（ 15 ）

A/dm^{2}電流密度的電解電鍍(圖2c和2e)所獲得之鍍金層(圖2a)相比較。尤其是，具有以1.5 A/dm^{2}電流密度所獲得的電鍍層之微電集會具有低阻抗值以及滿足的表面狀態。

至於雜訊等級，用2.0 A/dm^{2}電流密度獲得的電鍍層(圖2f)具有最低的雜訊值，並且用1.5 A/dm^{2}電流密度獲得的電鍍層(圖2d)具有第二低的雜訊值。相較之下，用1.0 A/dm^{2}電流密度所獲得的電鍍層(圖2b)具有相當程度的雜訊，並且難以精確測量神經細胞的電位改變。

(範例3)

平面微電極表面(塗上以許多種電流密度所獲得的電解電鍍金電鍍層)的頻率特性會與這些傳統產品做比較，具有分別以2.0 A/dm^{2}和1.5 A/dm^{2}電流密度所獲得的多孔鍍金表面之電極擁有與傳統電極(具有利用電解電鍍獲得的白金黑色物電鍍層)類似的頻率特性，不過，以1.0 A/dm^{2}電流密度所獲得的金電鍍層其頻率特性則顯著比傳統產品的頻率特性還差。

(範例4)

利用下列方法測量或計算微電極的表面積。

1. 利用氣體吸收法進行側量

具有在範例1內以1.5 A/dm^{2}電流密度獲得的多孔鍍金表面之微電極表面積可藉由使用CO氣體的氣體吸收法來測量，以要測量的樣品而言，將使用在1.3 mm x 1.3 mm x 1.1 mm玻璃基板上提供的64鍍金微電極(此後稱爲鍍金微電極區塊)。要用氣體吸收法測量的話，用單一個微電極當成樣

本紙張尺度適用中國國家標準(CNS) A4規格(210×297公釐)

裝 訂 線

五、發明說明（ 16 ）

品會太小。此外，將如上述利用傳統方法(電解電鍍)取代鍍金，在玻璃基板上提供64個鍍上白金黑色物的微電極(此後稱爲白金黑體電鍍微電極區塊)，用來當成比較樣品。請注意，每個樣品區塊的重量爲0.004 g。測量結果顯示在表格2內。

表格2：具有鍍金表面的電極表面積之測量結果

樣品	表面積
鍍金微電極區塊	0.02 m^2/g或以下
白金黑體電鍍微電極區塊(比較範例)	20.2 m^2/g

鍍金微電極區塊或白金黑體電鍍微電極區塊的整個表面積將寫成：

$$S' = (S - s) + \alpha s$$

其中S'代表鍍金微電極區塊或白金黑體電鍍微電極區塊(此後稱爲微電極區塊)的整個表面積；S代表在1.3 mm x 1.3 mm x 1.1 mm玻璃基版上形成電鍍層之前微電極區塊的總表面積；s代表電鍍之前微電極的表面積(投射面積)，S'代表鍍金微電極區塊或白金黑體電鍍微電極區塊的整個表面積；αs代表微電極電鍍後其表面積s以α的因數來增加，以及S-s即是除了未改變的微電極以外之微電極區塊表面積，並且電鍍只增加微電極的表面積。α的值計算如下：

$$\alpha = (S'-S)/s + 1.$$

在此案例中，S的值就是1.3 mm x 1.3 mm x 1.1 mm長方

本紙張尺度適用中國國家標準(CNS) A4規格(210×297公釐)

裝 訂 線

五、發明說明（ 17 ）

平行六邊型的表面積，即是7.41 mm^2。s的值(投射面積)爲每個尺寸爲50 μm x 50 μm的64個電極之表面積，即是0.16 mm^2。因此，依照表格2內所示的S'測量結果，所計算出來的白金黑體電鍍微電極之值爲504955。請注意，鍍金電極的α值(增加的表面積)會低於氣體吸收法的偵測限制，並且估計少於455。

2. 計算微電極的表面積

2.1. 鍍金電極的阻抗特性

具有在範例1內以1.5 A/dm^2電流密度獲得的多孔鍍金表面之微電極的阻抗可藉由將頻率連續從1 Hz改變到100 kHz來測量，在此測量中，將使用0.3 mmϕ白金導線當成反向電極，並且在1.4 wt% NaCl水溶液內進行測量。偏壓爲零伏特，並且測量電壓的幅度爲50 mV。結果顯示在圖3內。圖3是顯示阻抗測量結果的預示圖式，精通此技藝的人士就會知道，在此會以測量阻抗Z的對數(即是log|Z|)與相位角度(θ)該頻率f的對數關係來連結點畫。根據此預示圖式，測量系統可用等效電路來表示，藉此測量微電極表面積的量。

包含微電極的測量系統經過評估會等於實際上包含在ITO電路圖部份與溶液之間產生的電容、微電極介面上產生的電阻等等，除了溶液的電阻以外，微電極表面內雙電子層的電容(非常複雜的串聯與並聯)之電路。例如，圖4a顯示包含微電極的側量系統之等效電路。如4a內所示的整個等效電路之合成阻抗Z可由下式代表：

本紙張尺度適用中國國家標準(CNS) A4規格(210×297公釐)

五、發明說明（ 18 ）

$$Z=R_1+\frac{(R_2+R_3)(1-\omega^2R_2R_3C_1C_2)+\omega^2R_2R_3C_1\{R_3C_1+(R_2+R_3)C_2\}}{(1-\omega^2R_2R_3C_1C_2)^2+[\omega\{R_3C_1+(R_2+R_3)C_2\}]^2}$$

$$-j\omega\frac{(R_2+R_3)\{R_3C_1+(R_2+R_3)C_2\}-R_2R_3C_1(1-\omega^2R_2R_3C_1C_2)}{(1-\omega^2R_2R_3C_1C_2)^2+[\omega\{R_3C_1+(R_2+R_3)C_2\}]^2}\quad\cdots[I]$$

其中R_1代表ITO電路圖樣部份(並未與溶液接觸)的電阻；R_2代表ITO電路圖樣部份的電阻以及溶液的電阻；R_3代表微電極表面的電阻；C_1代表微電極表面的雙電子層之電容；C_2代表ITO電路圖樣部份以及通過絕緣膜的溶液間產生的電容，並且$\omega=2\pi f$（ω：角頻率以及f：頻率）。上述合成阻抗的絕緣值$|Z|$以及相位θ分別由$|Z|=(Z_{Re}^2+Z_{Im}^2)^{1/2}$以及$\theta=\tan^{-1}(-Z_{Im}/Z_{Re})$(其中$Z_{Re}$爲Z的眞實部份並且$Z_{Im}$是Z的想像部份)來表示。

在此，藉由改變R_1、R_2、C_1和C_2來選擇R_1、R_2、R_3、C_1和C_2(提供與圖3內所示預示圖式最類似的預示圖式)的組合，如此可模擬圖4a內所示的等效電路。圖5爲預示圖式，其中$R_1=200\Omega$、$R_2=5\ k\Omega$、$R_3=5\ M\Omega$、$C_1=0.01\ \mu F$以及$C_2=100\ pF$。很明顯的圖5內所示的結果與圖3內所示的實際測量結果一致。

在此，在包含微電極的測量系統內，$R_3>>R_1$、$R_3>>R_2$並且$C_2<<C_1$。因此，若假設$R_3\rightarrow\infty$並且$C_2\rightarrow 0$，則上述方程式[I]可簡化爲：

$$\lim_{R_3\rightarrow\infty}\lim_{C_2\rightarrow 0}Z=R_1+R_2-j\frac{1}{\omega C_1}=R_1+R_2+\frac{1}{j\omega C_1}\quad\cdots[II]$$

本紙張尺度適用中國國家標準(CNS) A4規格(210×297公釐)

五、發明說明（ 19 ）

若$R_1+R_2=R$並且$C_1=C$，則包含微電極的測量系統則大概就是圖4b內所示的簡單電路圖。此後，將使用圖4b內所示的等效電路進一步進行分析。

圖4b內所示的整個等效電路之合成阻抗Z可用$Z=R+(j\omega C)^{-1}$來表示，其中R代表電路圖樣的電阻；C代表微電極表面的雙電子層電阻以及$\omega=2\pi f$（ω代表角頻率並且f代表頻率）。上述合成阻抗的絕對值$|Z|$以及相位θ可分別由$|Z|=(R^2+(1/\omega C)^2)^{1/2}$與$\theta=\tan^{-1}(-\omega C/R)$來表示。

藉由改變R和C的值來選擇R和C（提供與圖3內所示預示圖式最類似的預示圖式）的組合，如此可模擬圖4b內所示的等效電路。圖6爲預示圖式，其中R=5 kΩ並且C=0.01 μF。很明顯的圖6內所示的結果與圖3內所示的實際測量結果一致。

接下來，圖7是顯示用來當成控制，並且沒有鍍金表面的微電極的實際測量阻抗值之圖式。其測量條件與測量具有上述鍍金表面的多重電極阻抗（圖3）之條件一樣。

接下來，圖8顯示利用圖4b內所示等效電路的模擬所獲得之等效電路合成阻抗結果，其中R=5 kΩ並且C=250 pF。很明顯的圖8內所示的結果與圖7內所示的實際測量結果一致。

在此，假設微電極（具有鍍金表面）的雙電子層之電容爲C_A，以及在進行鍍金處理之前的微電極雙電子層之電容爲C_B。依照上述的模擬結果，微電極的靜電容量C_A與C_B分別爲0.01 μF與250 pF，如此可獲得$C_A=40C_B$的關係。如此

本紙張尺度適用中國國家標準(CNS) A4規格(210×297公釐)

五、發明說明（ 20 ）

一般來說，靜電容量C_{ap}由$C_{ap}=\varepsilon_0\varepsilon_r S/d$（$\varepsilon_0$：眞空的介電常數；$\varepsilon_r$：介電材料的相對介電常數；S：電極的表面積以及d：介電材料的厚度）。靜電容量C_{ap}之值會與電極表面積成比例，因此，上述關係指示具有鍍金表面的微電極表面積比在鍍金之前增加40倍。

圖9是顯示以類似於具有鍍金表面的微電極之方法來實際測量具有白金黑體電鍍表面的微電極阻抗值之圖式。其測量條件與測量具有鍍金表面的微電極阻抗（圖3）之條件一樣。接下來，圖10顯示利用圖4b內所示等效電路的模擬所獲得之合成阻抗結果，其中R＝5 kΩ並且C＝0.05 μF。很明顯的圖10內所示的結果與圖9內所示的實際測量結果一致。

類似地，假設微電極（具有鍍金表面）的雙電子層之電容爲C_A，以及在進行鍍金處理之前的微電極雙電子層之電容爲C_B。依照上述的模擬結果，微電極的靜電容量C_A與C_B分別爲0.01 μF與0.05 pF，如此可獲得$C_A=200C_B$的關係。此關係指示具有鍍金表面的微電極表面積比在鍍金之前增加200倍。

依照此模擬，爲了獲得50 kΩ或以下的阻抗（此爲微電極的阻抗限制），與投射面積比較起來要使用金電鍍層增加表面積10個因數以上。

（範例5）

一以1.5 A/dm^{2}電流密度進行電解所產生具有多孔鍍金層的平面多重電極要進行使用壽命測試，以便與傳統電極

本紙張尺度適用中國國家標準(CNS) A4規格(210×297公釐)

五、發明說明（ 21 ）

（白金黑體電鍍層）做比較。在使用壽命測試中，將重複進行類似典型激烈實驗的實驗。尤其是，將重複進行範例2內說明的實驗。在實驗結束後，電極會使用膠原蛋白胨（20 u/ml）裡一整夜，然後在剝除細胞切片樣品之後用蒸餾水清洗。接著，測量微電極的阻抗。圖11是在每個實驗結束後阻抗改變的圖式。依照此結果，隨著使用次數的增加而產生的阻抗增加與變化要小於傳統電鍍層（白金黑體電鍍層）的變化與增加。

相較之下，傳統具有利用電解的白金黑體電鍍表面之阻抗會在使用17到18次之後顯著增加，如圖11內所示。如上述的，與傳統產品比較起來，具有多孔鍍金表面的電極具有較高的可循環性，並且可穩定測量到電極的電位變化。

雖然本發明以參考上述範例來說明，但本發明並不受限於這些範例。根據精通此技藝人士的知識，本發明可在不悖離本發明領域的情況下進行許多具體實施例的修改、改良與改變。

工業上的應用能力

依照本發明，用於細胞外記錄的多重電極（具有高強度）可長時間記錄神經細胞的電活動，並且重複使用。多重電極內包含的複數個微電極利用到多孔金電鍍層，所以都具有相當低的阻抗並且不降低強度。因此，就可輕易將持續電流刺激供應到多重電極，並且多重電極最適合用來監控電刺激下培養細胞的回應。

本紙張尺度適用中國國家標準(CNS) A4規格(210×297公釐)

裝 訂 線

A5
B5

四、中文發明摘要（發明之名稱：　細胞外記錄用電極　）

本發明揭示一種多重電極，包含在基板上提供的複數個微電極，以及用於將電子訊號提供給微電極或從微電極擷取電子訊號之線路部分。每個微電極的表面上都具有多孔性導電材料，並且微電極的阻抗爲50 kΩ（含）以下。該多孔性導電材料最好是金，並且由電流密度爲1.0至5.0 A/dm^{2}的電流通過10至360秒來形成。該多重電極可包含以矩陣形式在基材上提供的微電極、一連接到微電極的導線以及一連接到導線末端的電子接點。

英文發明摘要（發明之名稱：　"EXTRACELLULAR RECORDING ELECTRODE"　）

A multiple electrode includes a plurality of micro-electrodes provided on a substrate, and a wiring portion for providing an electrical signal to the micro-electrodes or extracting an electrical signal from the micro-electrodes. Each micro-electrode has porous conductive material on its surface, and the impedance of the micro-electrode is 50 kΩ or less. Preferably, the porous conductive material is gold, and formed by the passage of current at a current density of 1.0 to 5.0 A/dm^2 for 10 to 360 sec. The multiple electrode may include micro-electrodes provided on a substrate in the form of a matrix, a lead line connected to the micro-electrodes, and an electrical junction connected to an end of the lead line.

本紙張尺度適用中國國家標準(CNS) A4規格(210×297公釐)

裝 訂 線

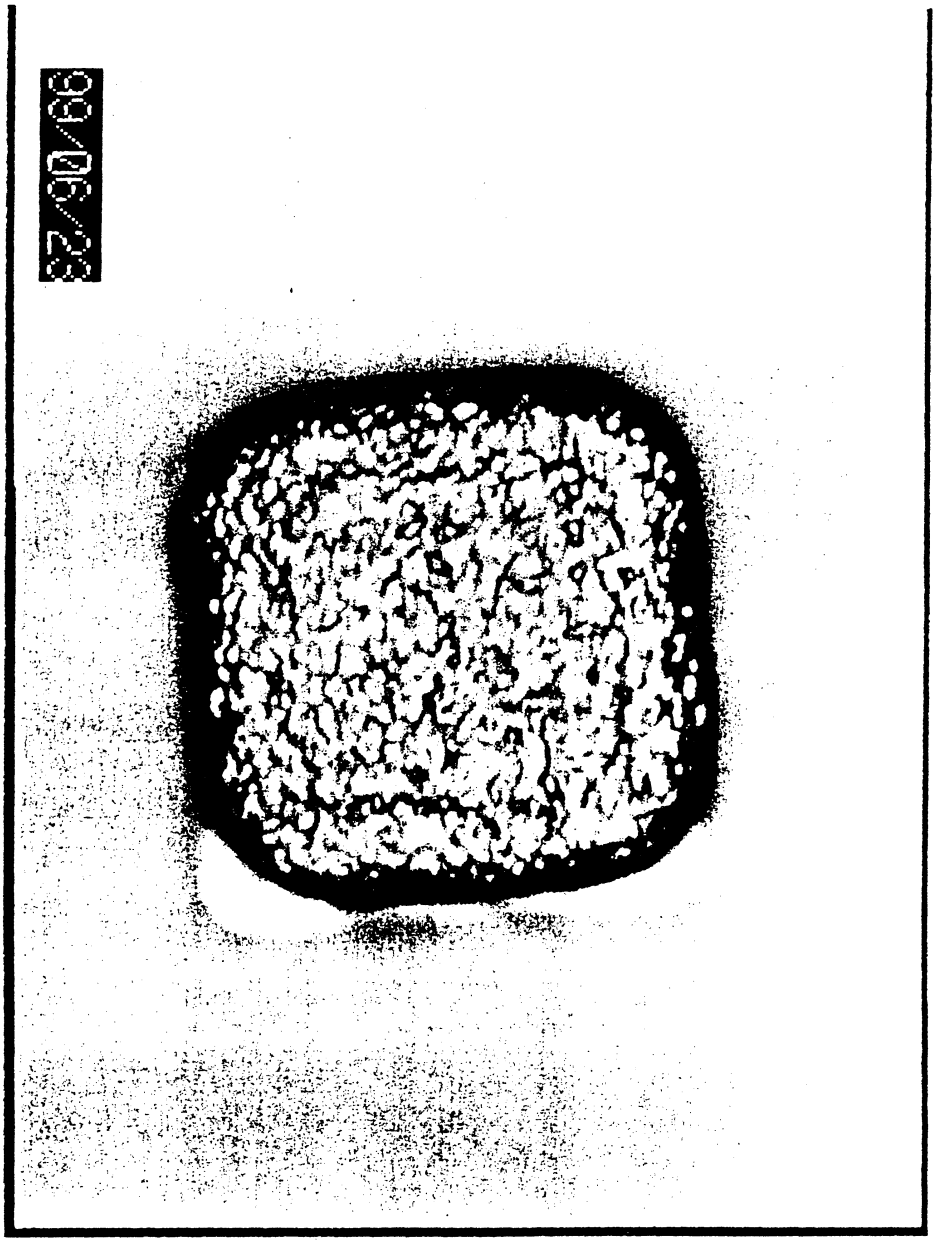


圖 1a

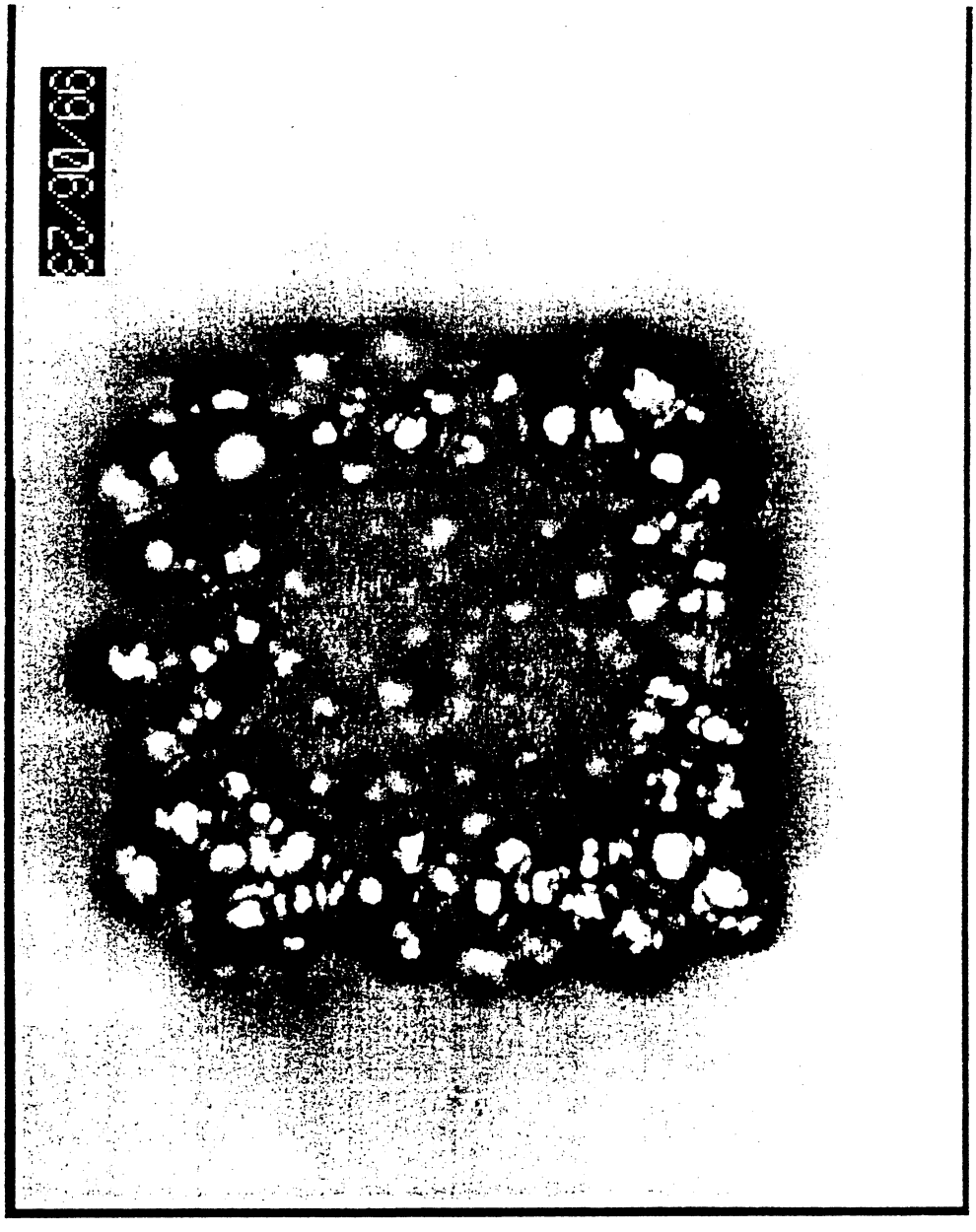


圖 1b

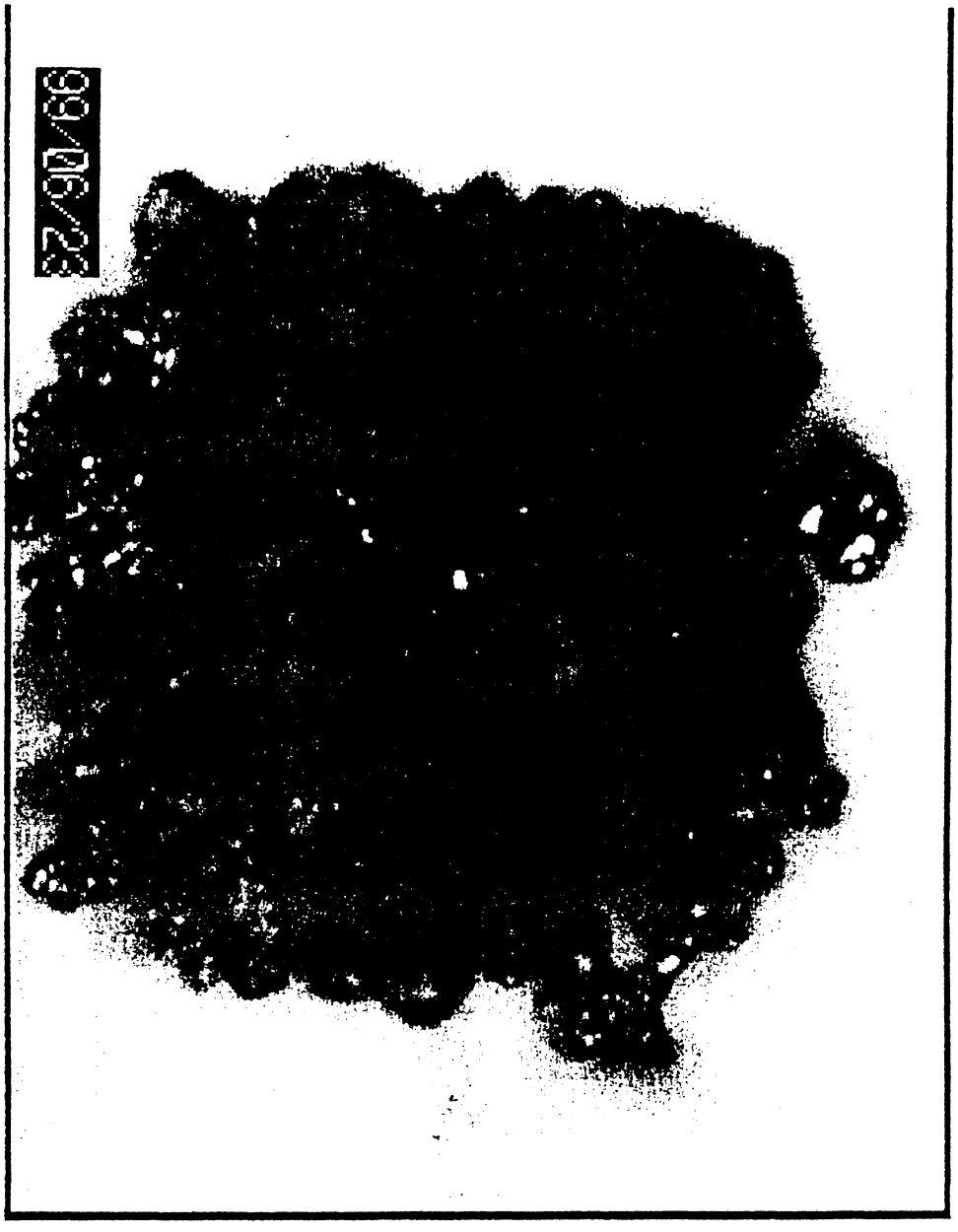


圖 1c

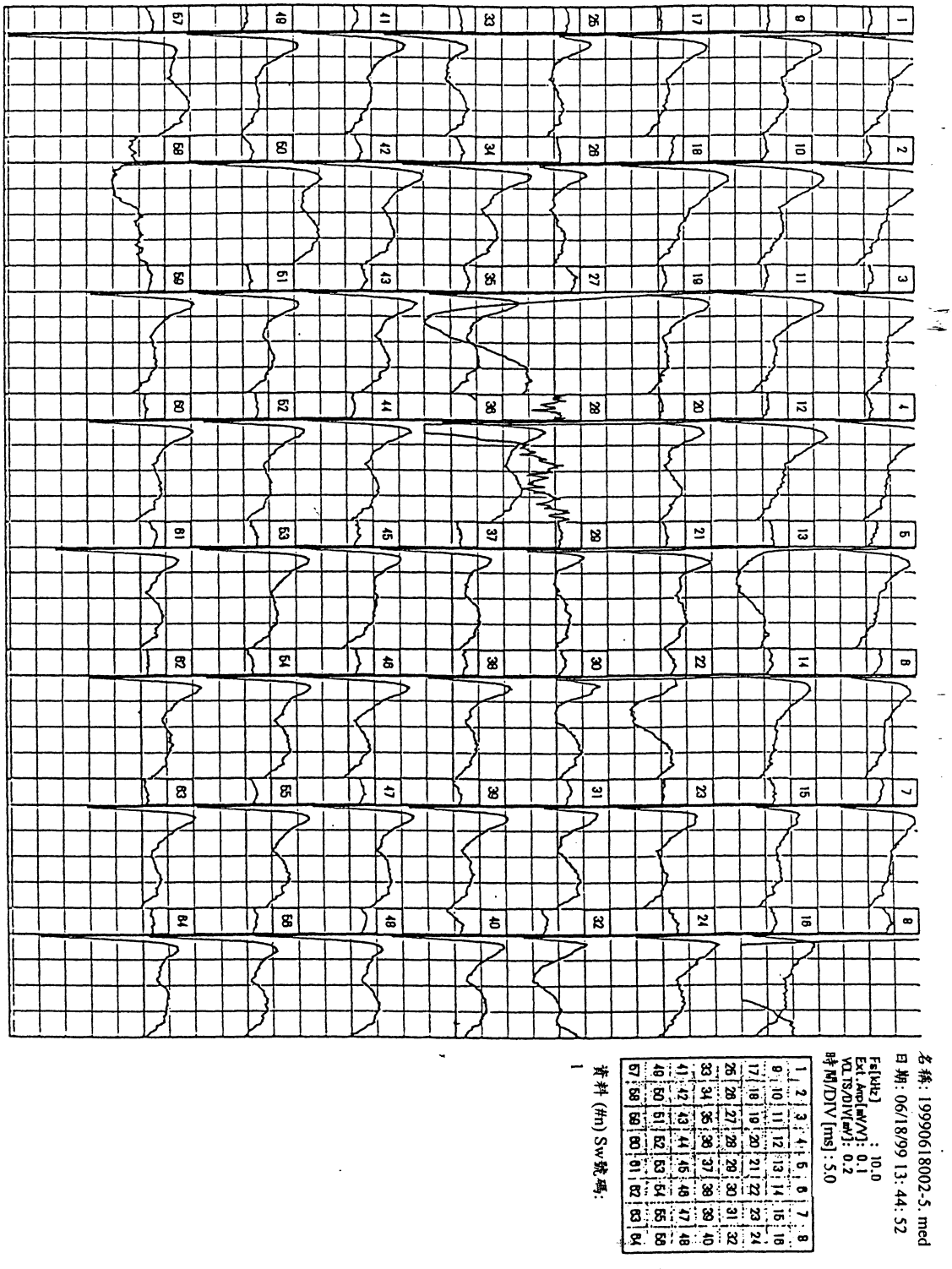

名稱: 19990618002-5. med
日期: 06/18/99 13:44:52
Fs[kHz] : 10.0
Ext.Amp[mV/V]: 0.1
VOLTS/DIV[mV]: 0.2
時間/DIV [ms] : 5.0
1 2 3 4 5 6 7 8
9 10 11 12 13 14 15 16
17 18 19 20 21 22 23 24
25 26 27 28 29 30 31 32
33 34 35 36 37 38 39 40
41 42 43 44 45 46 47 48
49 50 51 52 53 54 55 56
57 58 59 60 61 62 63 64
資料 (#n) Sw號碼:
1

圖 2a

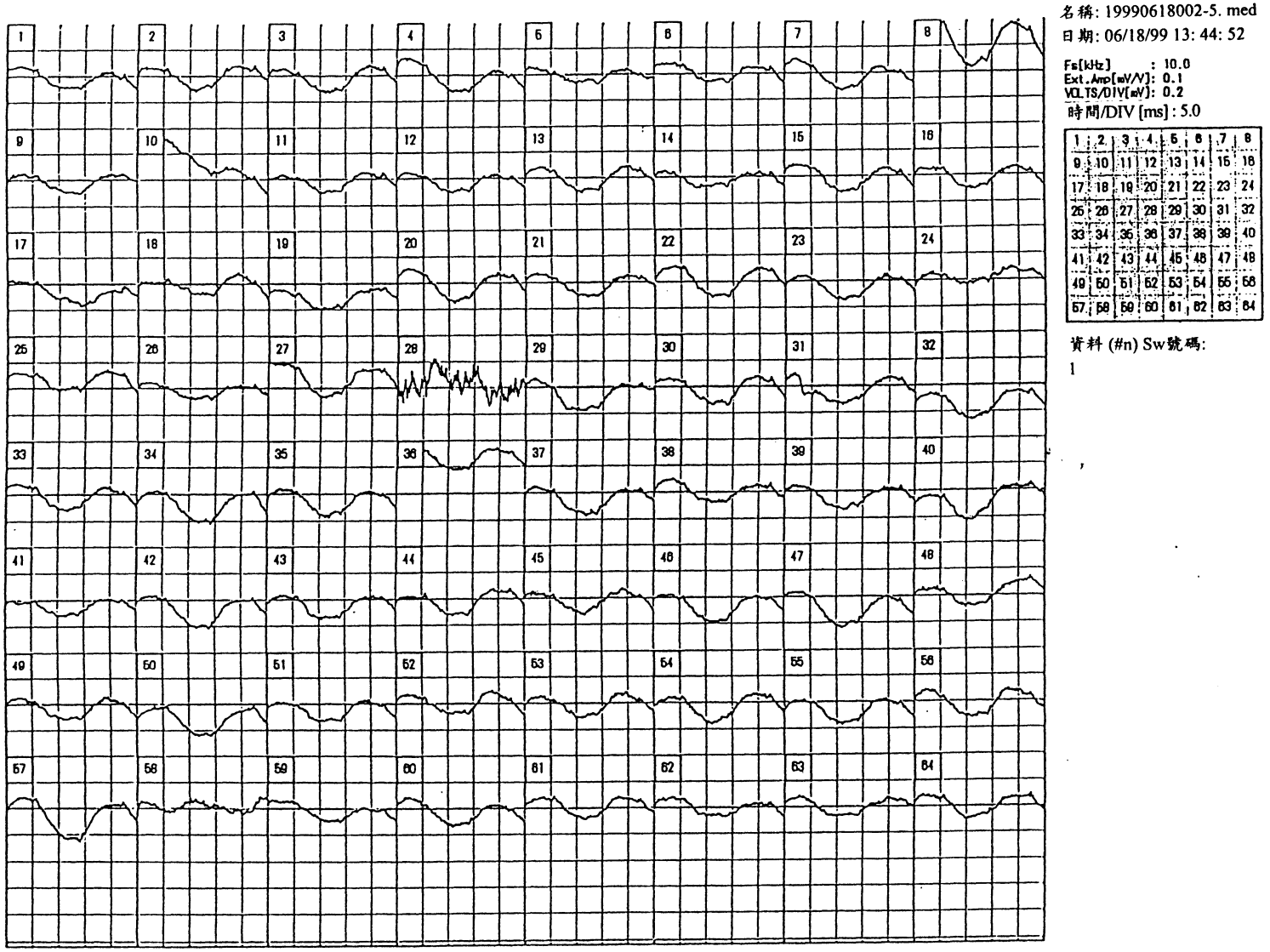

名稱: 19990618002-5. med
日期: 06/18/99 13: 44: 52
Fs[kHz] : 10.0
Ext.Amp[mV/V]: 0.1
VOLTS/DIV[mV]: 0.2
時間/DIV [ms]: 5.0
1 2 3 4 5 6 7 8
9 10 11 12 13 14 15 16
17 18 19 20 21 22 23 24
25 26 27 28 29 30 31 32
33 34 35 36 37 38 39 40
41 42 43 44 45 46 47 48
49 50 51 52 53 54 55 56
57 58 59 60 61 62 63 64
資料 (#n) Sw號碼:
1

圖 2b

524973

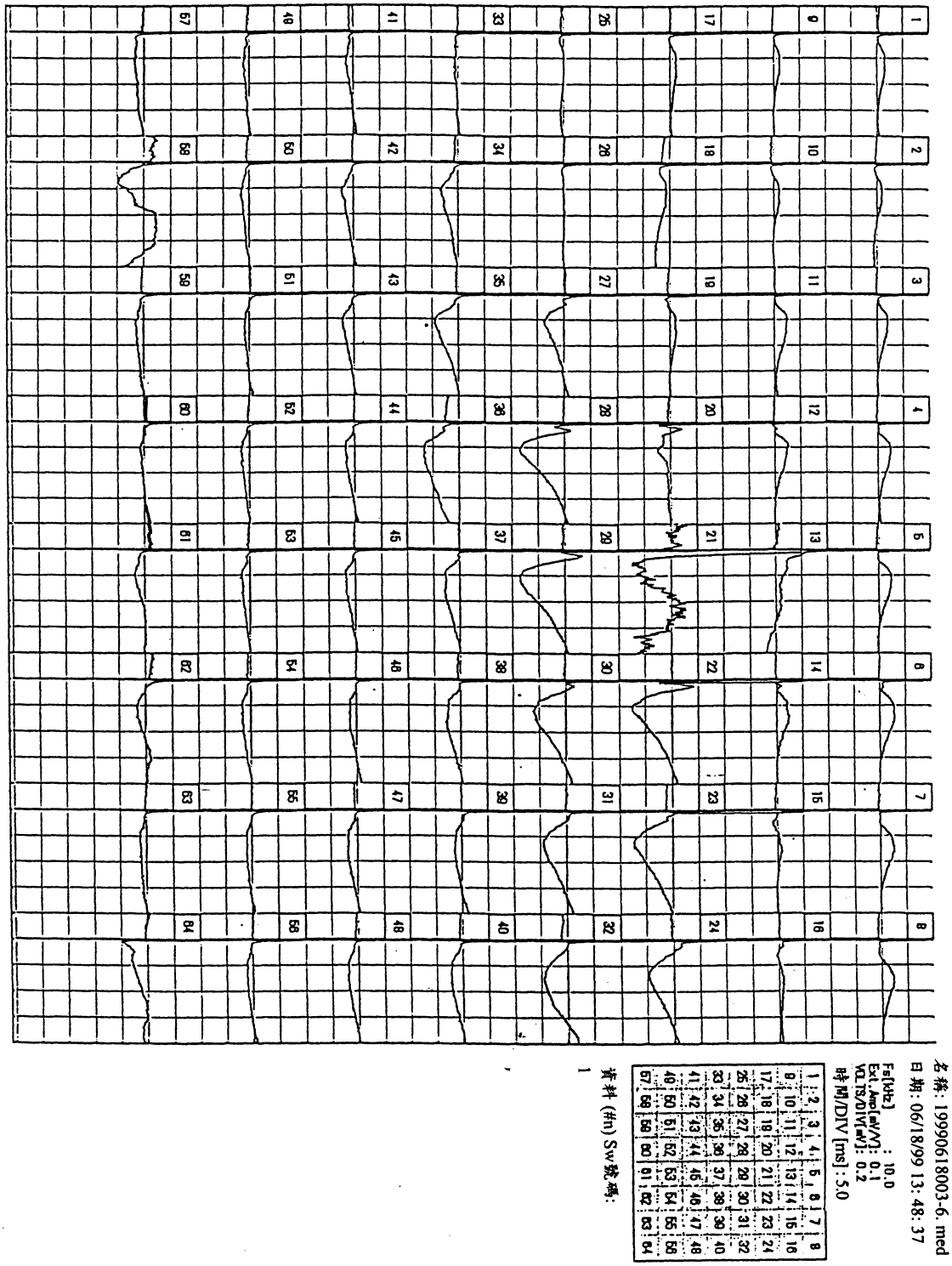

名稱: 19990618003-6. med
日期: 06/18/99 13:48:37
Fs[kHz] : 10.0
Ext.Amp[mV/V]: 0.1
VOLTS/DIV[mV]: 0.2
時間/DIV [ms] : 5.0
1 2 3 4 5 6 7 8
9 10 11 12 13 14 15 16
17 18 19 20 21 22 23 24
25 26 27 28 29 30 31 32
33 34 35 36 37 38 39 40
41 42 43 44 45 46 47 48
49 50 51 52 53 54 55 56
57 58 59 60 61 62 63 64
資料 (#n) Sw號碼:
1

圖 2c

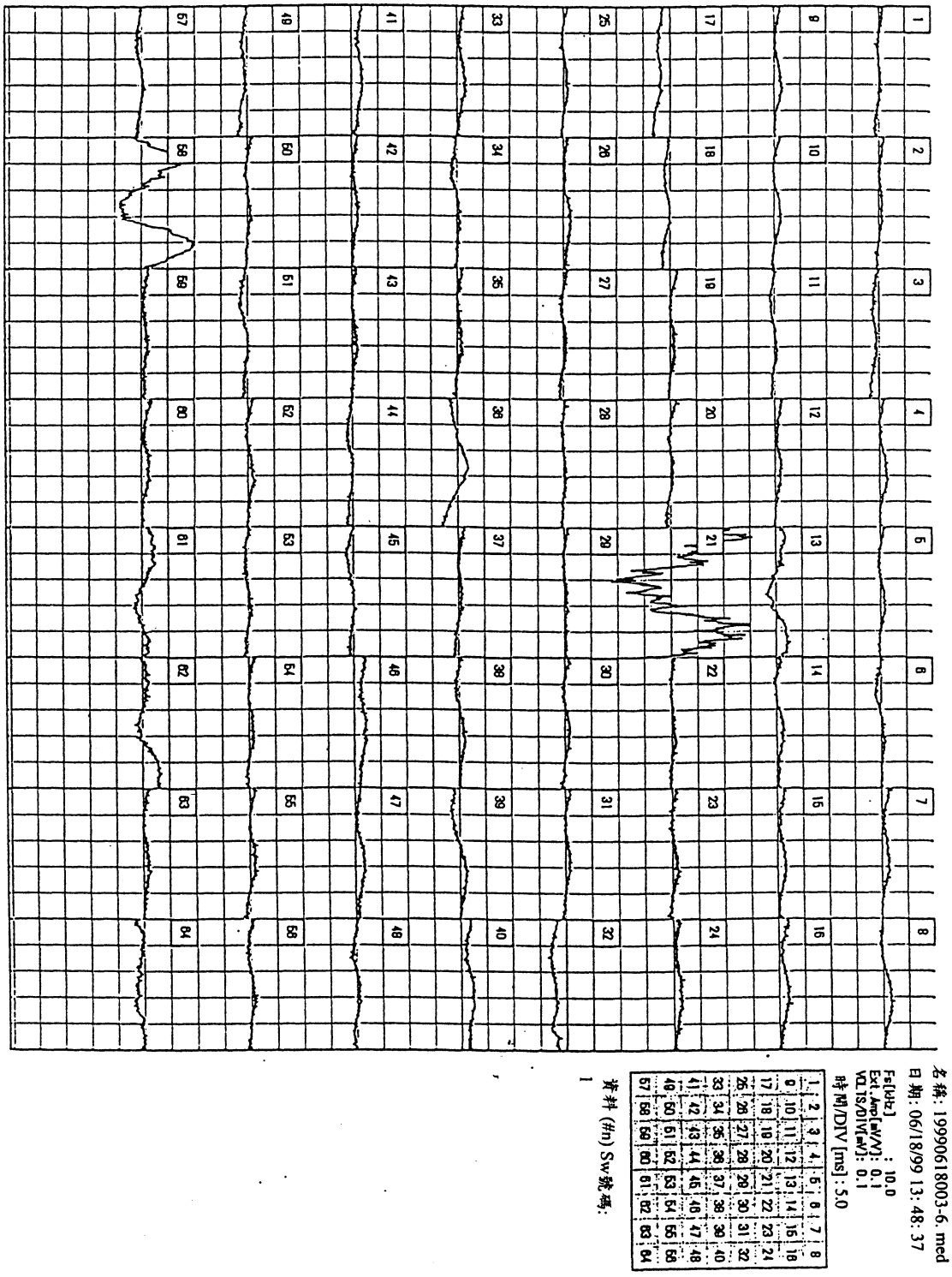

名稱: 19990618003-6. med
日期: 06/18/99 13:48:37
Fs[kHz] : 10.0
Ext.Amp[mV/V]: 0.1
VOLTS/DIV[mV]: 0.1
時間/DIV [ms] : 5.0
資料 (#n) Sw號碼:
1

圖 2d

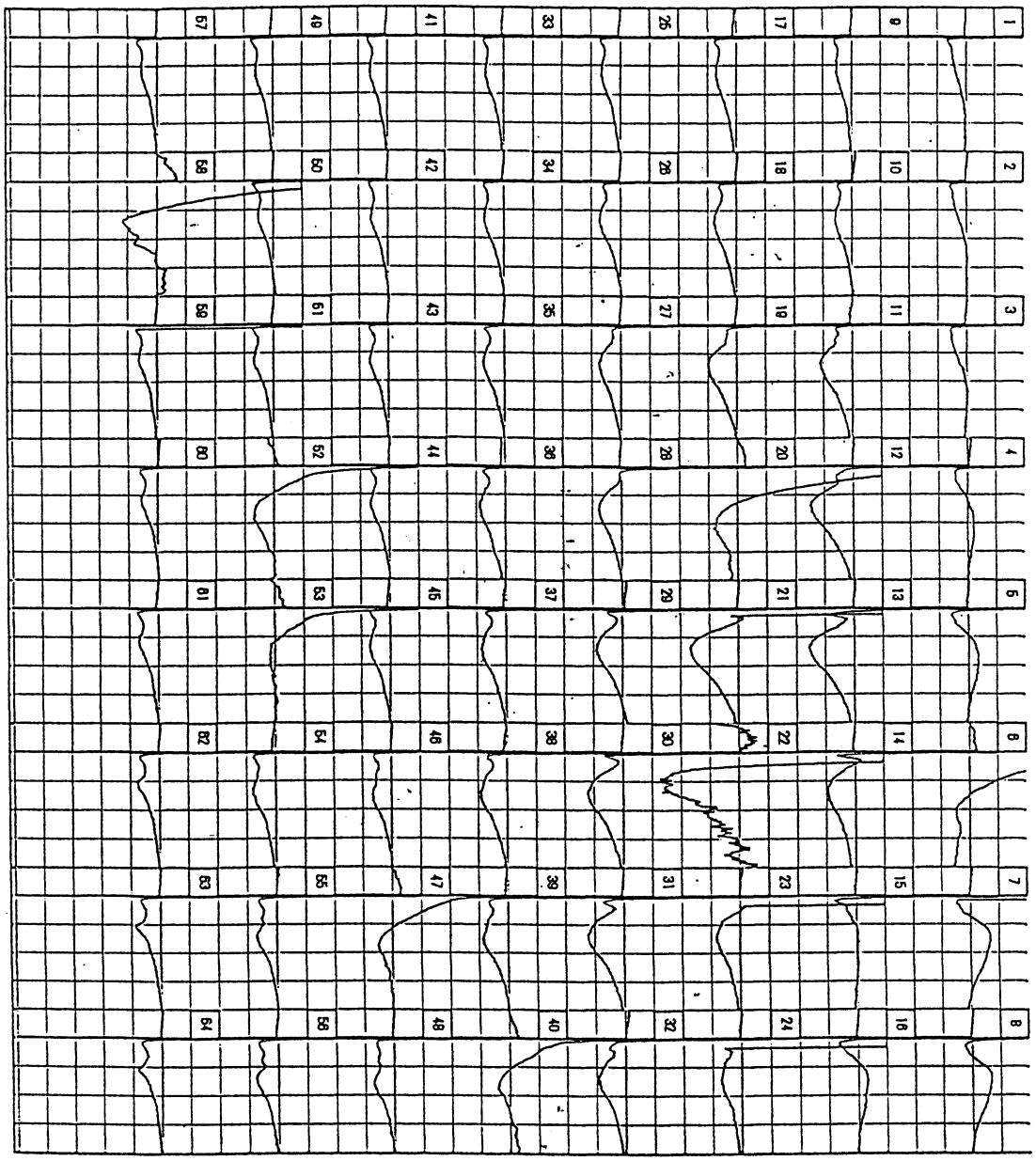

名稱: 19990618001-7. med
日期: 06/18/99 13: 40: 21
Fs[Hz] : 10.0
Ext.Amp[mV/V]: 0.1
VOLTS/DIV[mV]: 0.2
時間/DIV [ms] : 5.0
資料 (#n) Sw號碼:
1

圖 2e

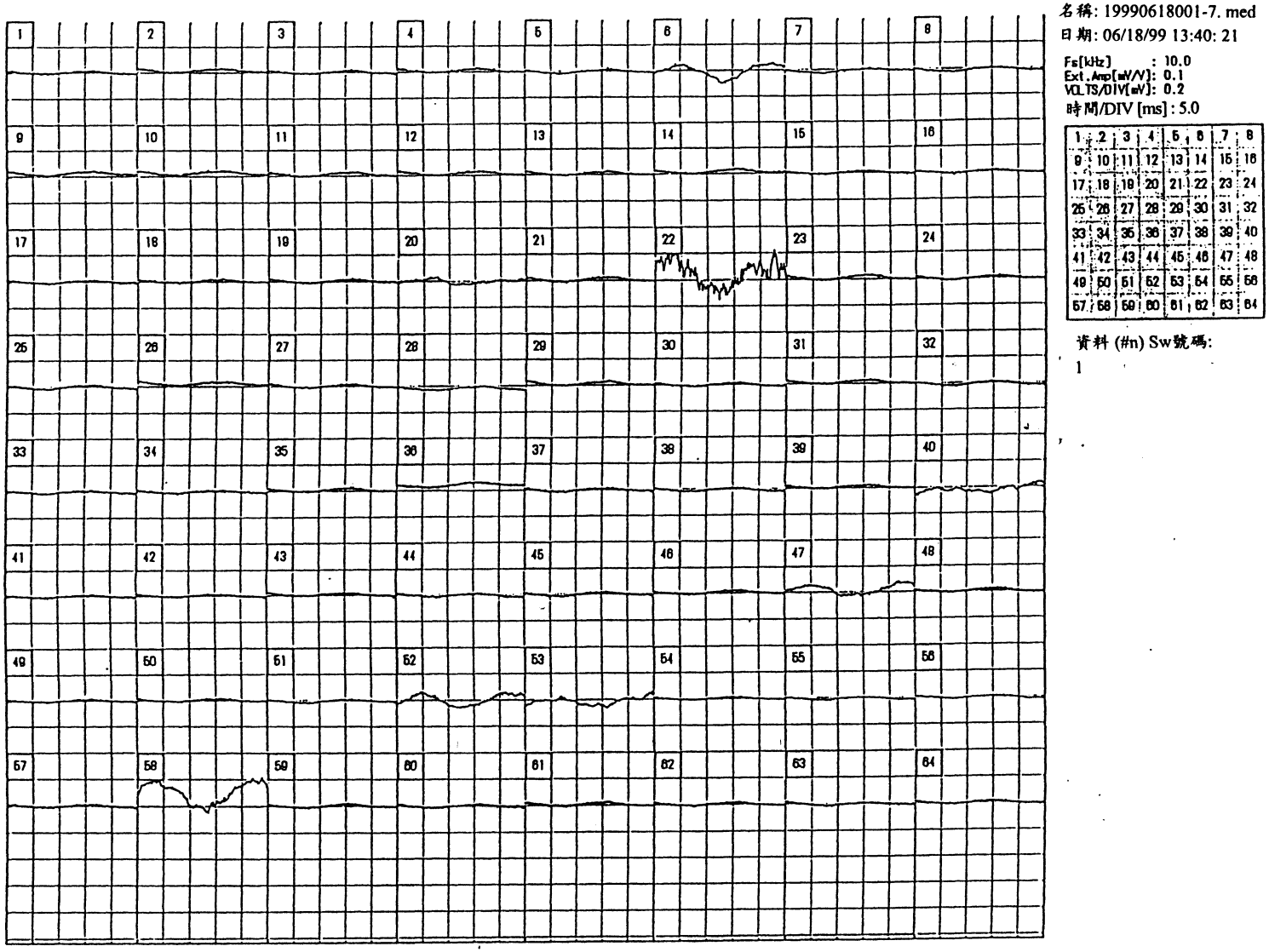

名稱: 19990618001-7. med
日期: 06/18/99 13:40: 21
Fs[kHz] : 10.0
Ext.Amp[mV/V]: 0.1
VOLTS/DIV[mV]: 0.2
時間/DIV [ms] : 5.0
1 2 3 4 5 6 7 8
9 10 11 12 13 14 15 16
17 18 19 20 21 22 23 24
25 26 27 28 29 30 31 32
33 34 35 36 37 38 39 40
41 42 43 44 45 46 47 48
49 50 51 52 53 54 55 56
57 58 59 60 61 62 63 64
資料 (#n) Sw號碼:
1

圖 2 f

524973

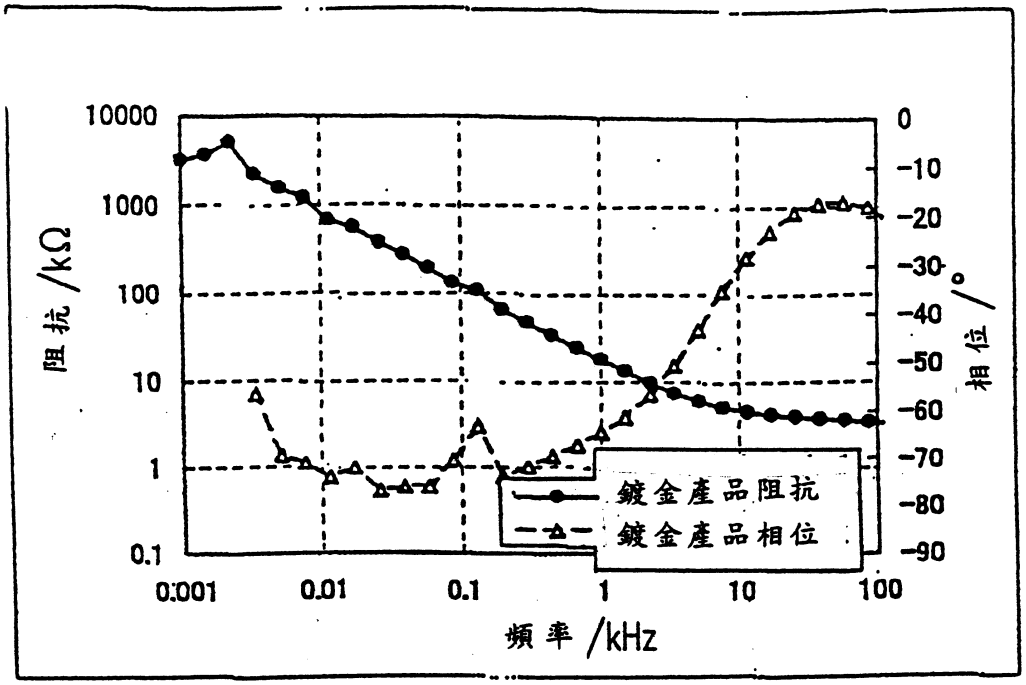

10000
1000
100
10
1
0.1
阻抗 /kΩ
0
-10
-20
-30
-40
-50
-60
-70
-80
-90
相位 /°
0.001
0.01
0.1
1
10
100
頻率 /kHz
鍍金產品阻抗
鍍金產品相位

圖 3

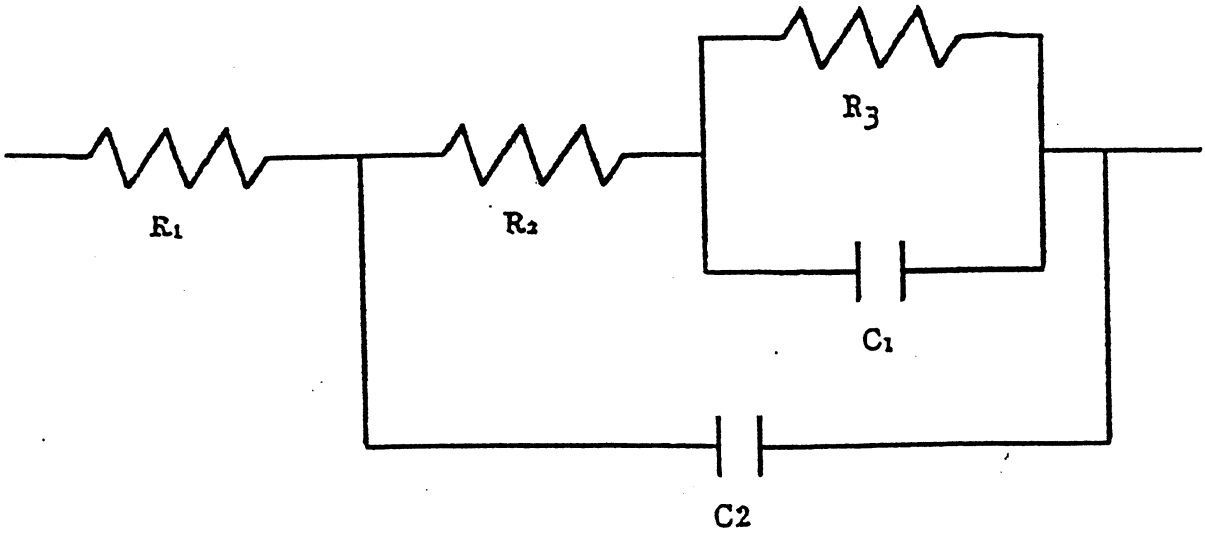

R1
R2
R3
C1
C2

圖 4a

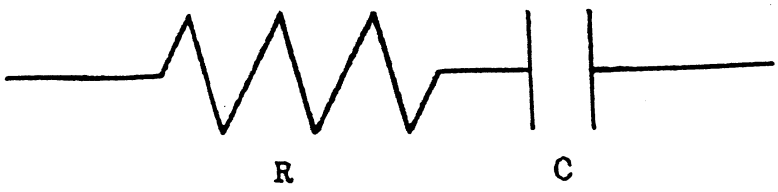

R
C

圖 4b

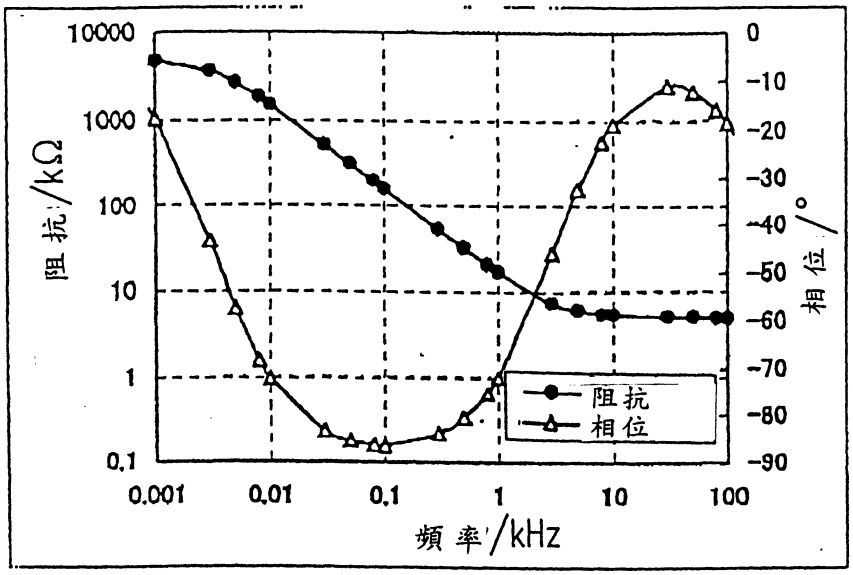

10000
1000
100
10
1
0.1
阻抗/kΩ
0
-10
-20
-30
-40
-50
-60
-70
-80
-90
相位/°
0.001
0.01
0.1
1
10
100
頻率/kHz
阻抗
相位

圖 5

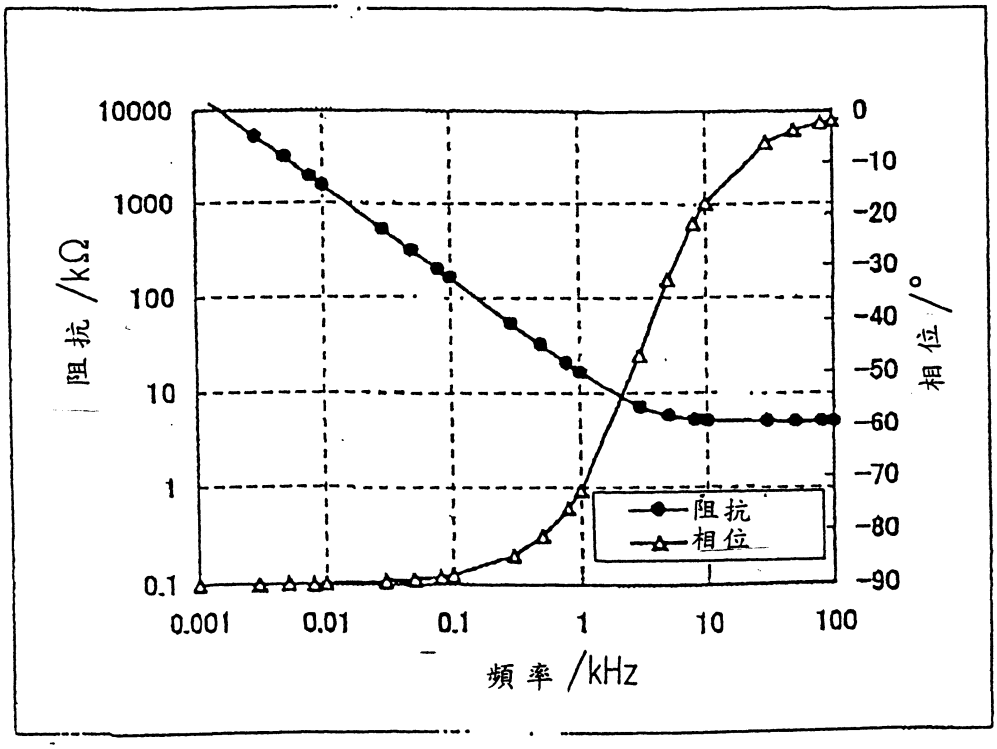

10000
1000
100
10
1
0.1
阻抗/kΩ
0
-10
-20
-30
-40
-50
-60
-70
-80
-90
相位/°
0.001
0.01
0.1
1
10
100
頻率/kHz
阻抗
相位

圖 6

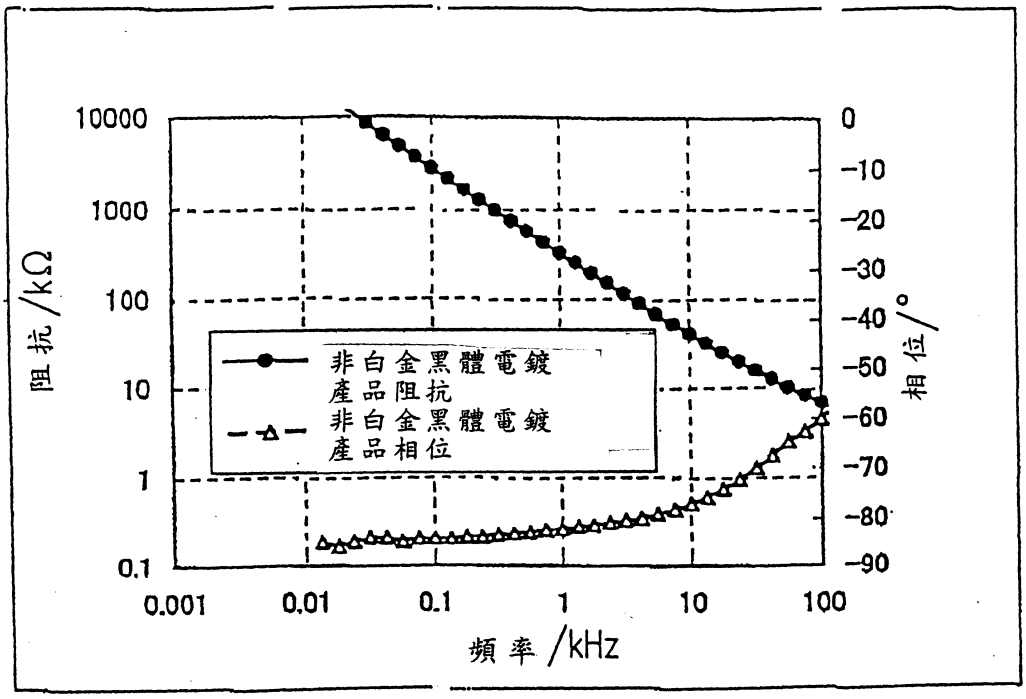

10000
1000
100
10
1
0.1
阻抗 /kΩ
0
-10
-20
-30
-40
-50
-60
-70
-80
-90
相位 /°
非白金黑體電鍍
產品阻抗
非白金黑體電鍍
產品相位
0.001
0.01
0.1
1
10
100
頻率 /kHz

圖 7

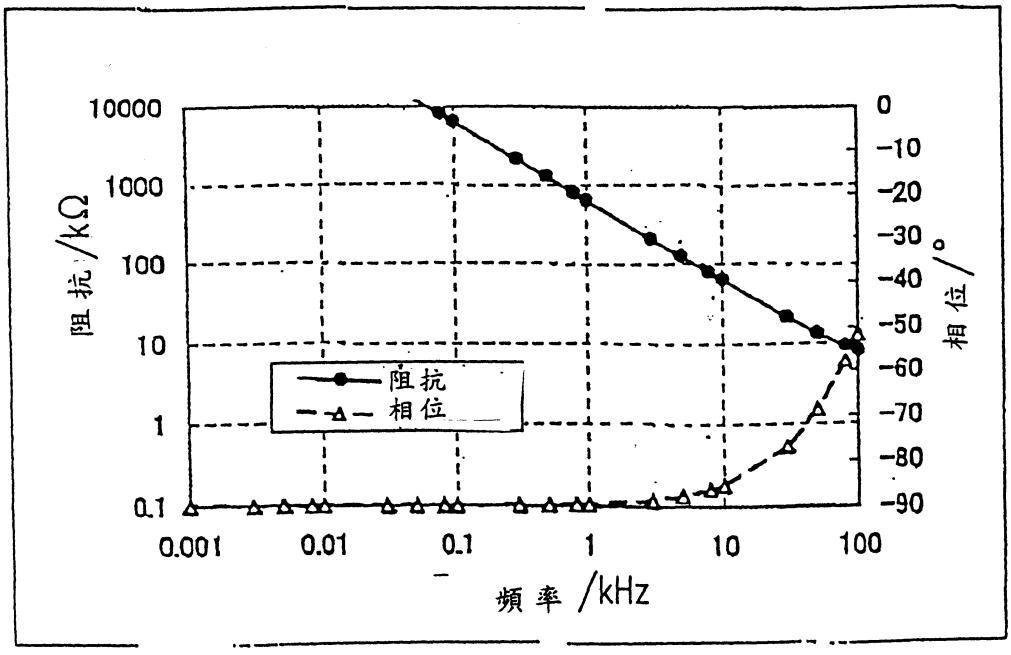

10000
1000
100
10
1
0.1
阻抗 /kΩ
0
-10
-20
-30
-40
-50
-60
-70
-80
-90
相位 /°
阻抗
相位
0.001
0.01
0.1
1
10
100
頻率 /kHz

圖 8

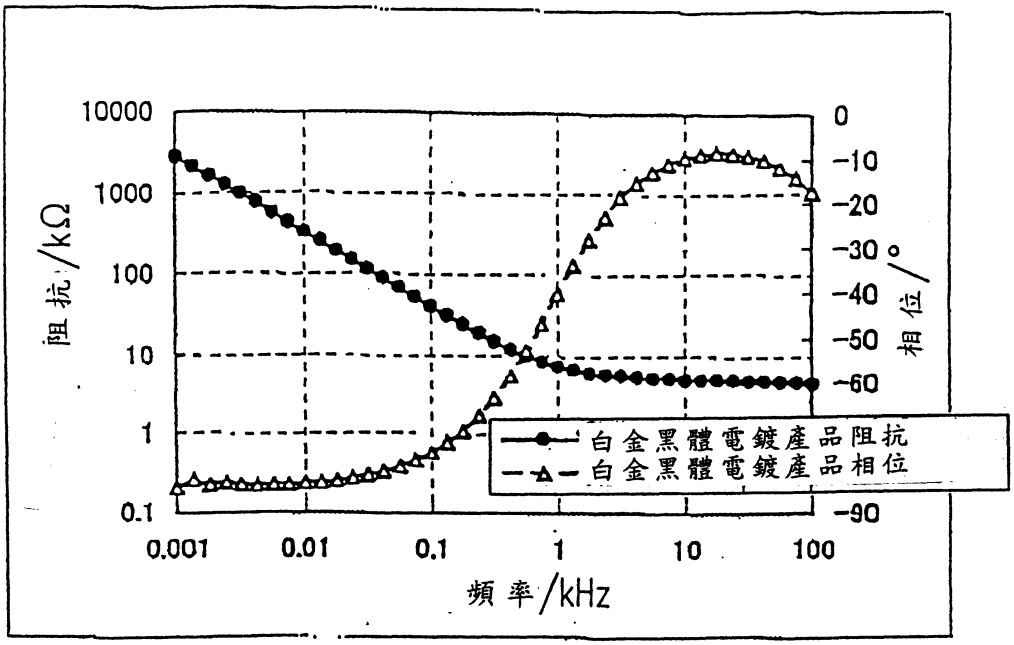

10000
1000
100
10
1
0.1
阻抗/kΩ
0
-10
-20
-30
-40
-50
-60
-90
相位/°
0.001
0.01
0.1
1
10
100
頻率/kHz
白金黑體電鍍產品阻抗
白金黑體電鍍產品相位

圖 9

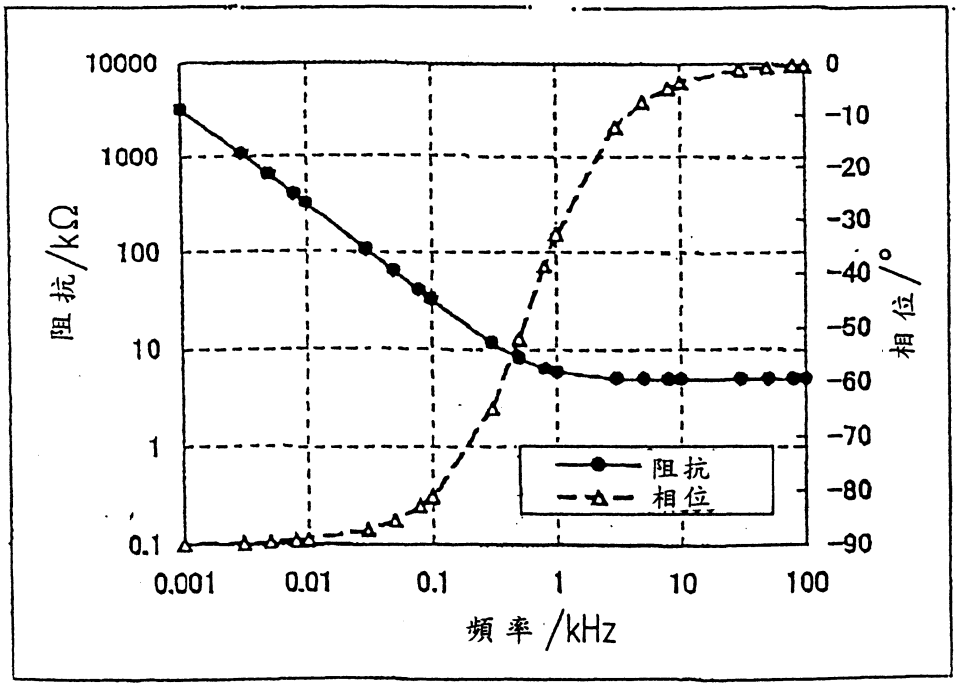

10000
1000
100
10
1
0.1
阻抗/kΩ
0
-10
-20
-30
-40
-50
-60
-70
-80
-90
相位/°
0.001
0.01
0.1
1
10
100
頻率/kHz
阻抗
相位

圖 10

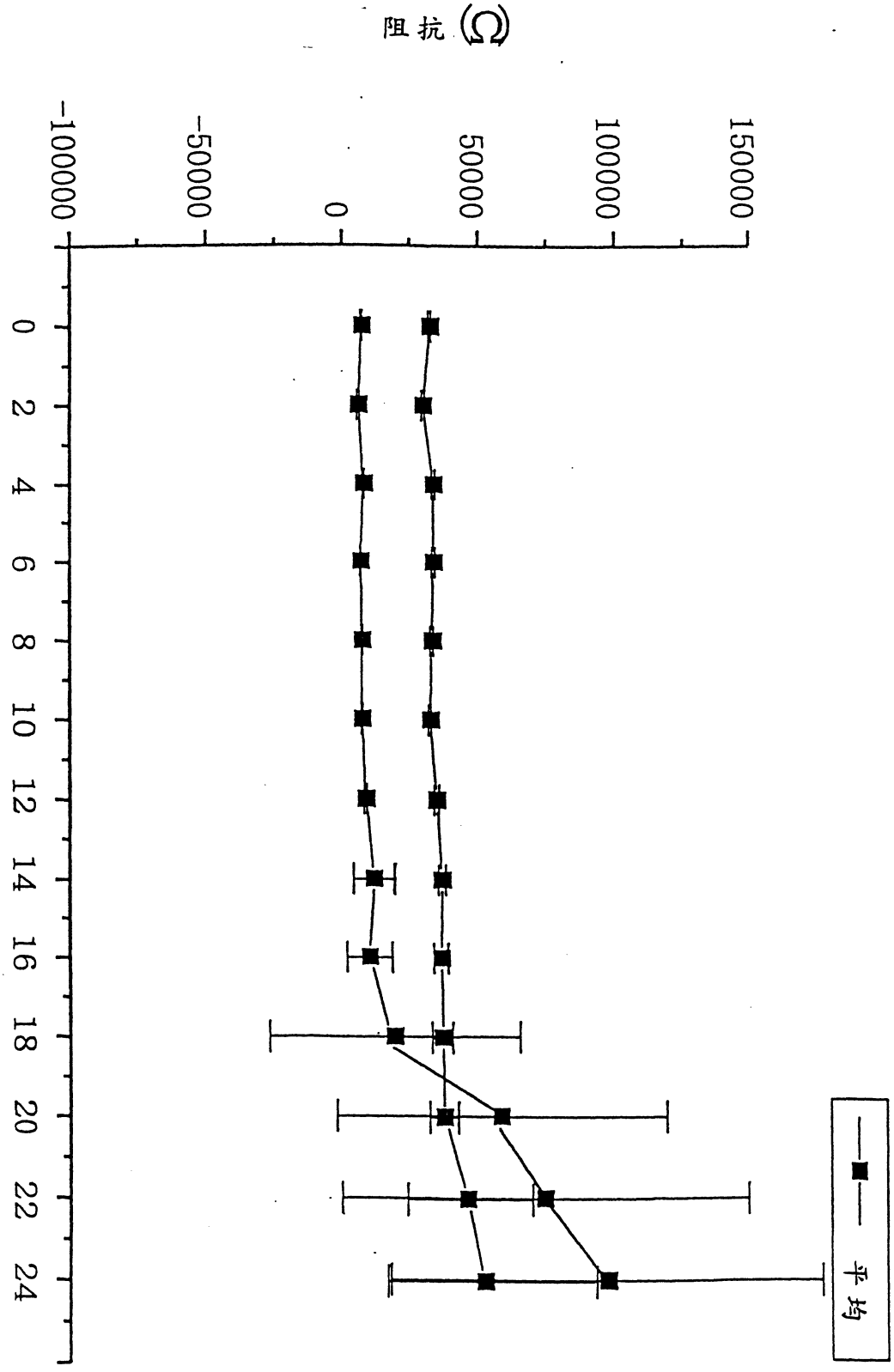

阻抗 (Ω)
150000
100000
50000
0
-50000
-100000
0
2
4
6
8
10
12
14
16
18
20
22
24
循環次數
平均

圖11

六、申請專利範圍

1. 一種用於測量細胞的電生理特性之多重電極，該電極包含：

在基板上所配置之複數個微電極，以及用於將電氣訊號提供給該微電極或從微電極擷取電氣訊號之線路部分，

其中該微電極在其表面上具有一多孔導電材料，該導電材料係選自由金、氮化鈦、氧化銀以及鎢組成之群組，且每個微電極的阻抗都為50 kΩ或以下。

2. 如申請專利範圍第1項之多重電極，其中該多孔性導電材料為金，其係以電流密度為1.0至5.0 A/dm^2的電流通電10至360秒而形成。

3. 一種用於測量細胞的電生理特性之多重電極，該電極包含：

在基板上所配置之複數個微電極，以及用於將電氣訊號提供給該微電極或從微電極擷取電氣訊號之線路部分，

其中由實質上具有與該微電極相同阻抗特性之等效電路的靜電容量所計算出之微電極表面積係大於或等於該微電極投射面積之10倍並小於200倍，且每一微電極的阻抗都為50 kΩ或以下。

4. 如申請專利範圍第3項之多重電極，其中由氣體吸收法所測得的微電極表面積小於或等於微電極投射面積的5 x 10^5倍。

5. 如申請專利範圍第1至4項中任一項之多重電極，其中

本紙張尺度適用中國國家標準(CNS) A4規格(210×297公釐)

裝 訂 線

A8
B8
C8
D8

91年10月15日 修正補充

六、申請專利範圍

該微電極以矩陣形式配置在基板上，該線路部份包含連接到該微電極的導線以及連接到導線末端的電氣接點，並以絕緣層覆蓋該導線至少一表面。

6. 如申請專利範圍第1、3及4項中任一項之多重電極，其中利用蝕刻方式形成該多孔導電材料。

7. 如申請專利範圍第5項之多重電極，其中利用蝕刻方式來提供該多孔導電材料。

8. 一種整合式細胞安裝裝置，其係包含如申請專利範圍第1至7項中任一項之多重電極，其中該整合式細胞安裝裝置包含一細胞安裝區域，其係用於將細胞或組織放置在多重電極的基板上。

9. 一種細胞電位測量裝置，其包含：

一如申請專利範圍第8項之整合式細胞安裝裝置；

一連接到該微電極之輸出訊號處理器，其係用於處理由細胞或組織的電生理活動所產生的輸出訊號；以及

一選擇性將電氣刺激提供給細胞或組織的刺激訊號提供裝置。

10. 一種細胞電位測量系統，其包含：

一如申請專利範圍第9項之細胞電位測量裝置；

一光學性監測細胞或組織用之光學監測裝置；及/或

一用於控制細胞或組織培養環境之細胞培養裝置。

本紙張尺度適用中國國家標準(CNS) A4規格(210×297公釐)

裝 訂 線