

ITO ガラス電極を用いた細胞刺激デバイスの開発と
定量的電流刺激による海馬神経細胞ネットワークの解析

2015 年度

棚元 亮

学位論文 博士（理学）

ITO ガラス電極を用いた細胞刺激デバイスの開発と
定量的電流刺激による海馬神経細胞ネットワークの解析

2015 年度

慶應義塾大学大学院理工学研究科

棚元 亮

目次

第 1 章	緒言	1
1.1	神経系のネットワークとしての性質	1
1.2	神経ネットワークの特性を知るための様々な実験・刺激手法	1
1.3	<i>In vitro</i> 神経細胞分散培養ネットワーク系での電流刺激による接続関係 観察手法における課題	2
1.4	細胞内 Ca^{2+} 蛍光イメージングによる神経細胞応答観察	3
1.5	ITO ガラスについて	3
1.6	本論文の目的	4
第 2 章	ITO ガラス電極を用いた分化 PC12 細胞に対する対電極を用いない電流刺激	10
2.1	はじめに	10
2.2	ITO ガラスを用いて複数細胞に電流刺激を与え Ca^{2+} イメージングを 行った例	11
2.3	方法	11
2.3.1	電極のパターニングのためのフォトマスクの設計と製造	11
2.3.2	ITO 電極の導電面のエッチング	12
2.3.3	PC12 細胞培養	12
2.3.4	Ca^{2+} 応答観察のための蛍光色素	13
2.3.5	fluo-4 の蛍光計測	13
2.3.6	電流刺激と電流計測	14
2.3.7	計算と解析のためのソフトウェア、計算手法	14
2.3.8	電流を流している時の電極の温度計測	14
2.4	結果	14

2.4.1	対電極を用いないパターン ITO ガラス電極により引き起こされる PC12 細胞の興奮	14
2.4.2	ITO 電極の設計による興奮細胞数への影響.....	15
2.4.3	全電流値が細胞の興奮誘起効率を決定している	16
2.4.4	対電極なしの ITO 電極を用いた電流刺激の空間分解能.....	17
2.4.5	海馬の神経ネットワークへの適用	18
2.5	本章のまとめ	19
第 3 章	Scatchard と Hill プロットによるラットの短期長期培養海馬神経細胞での網羅的なシナプス接続の定性的定量的推定	39
3.1	はじめに	39
3.2	神経ネットワークを形成する海馬神経細胞の培養日数に応じた自発発火の変化	40
3.3	方法	40
3.3.1	電極のパターニングのためのフォトマスクの設計と製造	40
3.3.2	ITO 電極の導電面のエッチング	40
3.3.3	海馬神経細胞の初代培養	40
3.3.4	Ca ²⁺ 応答観察のための蛍光色素	41
3.3.5	fluo-4 の蛍光計測	41
3.3.6	電流刺激と電流計測	41
3.3.7	計算と解析のためのソフトウェア、計算手法	41
3.4	結果	42
3.4.1	海馬神経細胞に対する電流刺激によるカルシウム応答	42
3.4.2	培養日数による神経細胞の電流刺激への応答性	42
3.4.3	グルタミン酸受容体のアンタゴニストによる神経活動の抑制	43
3.5	本章のまとめ	45
第 4 章	結言	54

4.1	本論文のまとめ	54
4.2	協同現象とこの現象に関わる神経活動	54
4.3	本研究における fluo-4 による Ca^{2+} 応答の検出の精度	55
4.4	シナプス電流の定量化の可能性	56
4.5	確率共鳴現象の観察への応用の可能性	56
4.6	Ca^{2+} と Mg^{2+} の同時イメージングの可能性	57
4.7	今後の展望とその他の応用例	57
参考文献	63
公刊論文目録および口頭発表目録	75
謝辞	78

第1章 緒言

1.1 神経系のネットワークとしての性質

脳・神経系が正しく機能するためには神経細胞同士が適切に接続している必要がある。この神経接続はシナプスという接続部位により構成されており、脳内ではこの神経接続が繰り返されることにより、神経回路が形成されている(Figure 1)。一般的に、この神経ネットワークの挙動には単一細胞の性質からは説明ができないこともあり、脳内の神経系のメカニズムを知るためには、単一細胞レベルではなく、ネットワークレベルで性質を調べる必要がある。そのため、*in-vitro* 分散培養神経ネットワーク系において、比較的小さな神経細胞集団の特性を調べる実験が報告されている。

例えば、神経細胞集団における自発発火は、培養日数に応じて発火頻度や、ISI(inter-spike-interval)、あるいは細胞間での同期性などを変え(Chiappalone et al., 2006)、細胞密度が高いほど神経の自発発火頻度は高くなることがわかっている。また興奮性あるいは抑制性神経伝達物質受容体の阻害剤を加えて自発発火の起こし方を変えることで、神経ネットワークの形成のされ方が変わることから、自発発火は神経ネットワークの形成に重要な役割を果たしていることが示されている(Cohen et al., 2008)。近年、神経ネットワーク系は安定かつ頑健であると言われており、細胞密度が高くなると、単一神経細胞の発火によるネットワーク系内の他の細胞への応答の伝播がなくなること(Cohen et al., 2008)や、大脳皮質の神経ネットワークで抑制性細胞集団が興奮性神経細胞に抑制をかける際、仮に一部の抑制性細胞が脱落しても系全体の抑制機能には影響しないこと(Ebina et al., 2014)も報告されている。

このように、密度の高い神経ネットワーク系は、単一の神経細胞への刺激による擾乱だけではネットワークの挙動に殆ど影響を及ぼさないことから、ネットワーク機能の解明にはネットワーク系全体あるいは複数の細胞を含んだ局所の幅のある領域に擾乱を与える実験系が必要となる。

1.2 神経ネットワークの特性を知るための様々な実験・刺激手法

神経系のネットワークレベルでの性質を理解するために、系全体あるいは一部の神経細胞集団に何らかの擾乱（刺激）を与えてその応答を観察する必要がある。神経ネットワークの機能を観察するために系全体に刺激を与える研究として、細胞膜上のイオンチャネルに対するアンタゴニスト等の薬物を加えることによる挙動の変化を調べたものがある(Hofmann and Bading, 2006; Korkotian et al., 2013; Martinoia et al., 2005)。また、神経細胞集団の発生のプロセスにおいて、神経毒性を示す薬物を加えることによる神経ネットワークの自発活動の変化(Gopal, 2003)や、神経ネットワーク形成の仕方の違いを観察している報告もある(Hogberg et al., 2011)。一方で、無刺激実験として、培養日数の違いによる形態や自発発

火応答の変化を観察すること(Chiappalone et al., 2006; Cohen et al., 2008; Takayama et al., 2011a)も行われている。

特定の神経細胞または細胞集団に対してのみ刺激を与える手法として、局所電流刺激や光遺伝学手法を用いたものがある。局所の電流刺激法としては、多点平面電極 MEA (Multi electrode array)上の特定電極を刺激用に、それ以外を計測用として用いて、神経スパイクの相関、時間差などを検出することにより、神経細胞同士の繋がりを定量化しているものがある(Jimbo et al., 2003; Nam et al., 2006; Poli et al., 2015)。一方、光遺伝学的手法としては、光刺激を与えた神経細胞に興奮あるいは抑制的な神経活動を引き起こして応答が観察されている(Alfonsa et al., 2015; Bernardinelli et al., 2011)。しかしながら、光刺激は電流刺激と異なり、神経ネットワーク内の局所での細胞間を伝播するような拡がりをもった応答を引き起こすことができないこともわかってきている(Millard et al., 2015)。

本研究では、神経ネットワークの性質を知るために、ネットワーク内の複数の細胞を含んだ局所の幅のある領域で擾乱を与えることができる電流刺激を与えつつ、その応答の拡がりを観察できる系の作製を目指した。

1.3 *In vitro* 神経細胞分散培養ネットワーク系での電流刺激による

接続関係観察手法における課題

神経細胞間のネットワーク解析の手法として、複数の電極が格子状に並んだ多点平面電極 MEA を用いて、神経ネットワークを形成する神経細胞群間での応答のタイミングを観察した報告がある。Nam らは MEA 上に神経細胞を分散培養し、特定の電極で電流刺激を与えた時の周囲の電極で検出された神経応答の遅れ時間から、神経細胞間の接続の様子を調べた(Nam et al., 2006, Figure 2)。MEA のメリットは、刺激に応じて周囲の電極での応答を、高い時間分解能でリアルタイムに観察することができることである。

しかしその一方で、1つの電極から複数神経細胞の応答を検出する可能性がある。神経応答波形から神経発火(スパイク)を検出する計測技術は開発されているが、電極上のどの神経細胞由来のスパイクなのかを知ることはできない(Chen, 2013; Herzog et al., 2011)。この問題を解決するために、個々の電極上での神経細胞数を1つに制約する系も開発されているものの、空間的・技術的な制約から、観察できる細胞数には制限がある(Erickson et al., 2008)。また電極間の細胞のみならず、同じ電極上の細胞でも電極と細胞の接触の仕方によってはスパイクが得られないこともある(Herzog et al., 2011)。すなわち、電極単位での応答の伝わり方を観察することができる一方、電極による空間分解能を越えた細かい空間分解能での解析は困難である。このような理由から、本研究では神経応答を Ca^{2+} イメージングによって検出することを考えた。

1.4 細胞内 Ca^{2+} 蛍光イメージングによる神経細胞応答観察

Ca^{2+} は神経機能や筋収縮をはじめとしてさまざまな細胞機能を制御する重要なイオンである。神経発火により細胞内 Ca^{2+} 濃度が上昇することから、神経発火を検出する方法として Ca^{2+} 蛍光指示薬やタンパク質性蛍光 Ca^{2+} センサーを用いて神経活動をイメージングする手法が開発されてきた(Cossart et al., 2005; Egawa et al., 2013; Inoue et al., 2015; Michel et al., 2011; Osanai et al., 2006; Smetters et al., 1999, Figure 3)。この手法により、画像内での全ての神経細胞について 1 細胞レベルでの応答が観察可能となる。また、数百から数千個の神経細胞の活動を同時記録することが可能となり、脳機能の原理をはじめとして記憶障害や精神疾患の原因の解明への利用が期待されている。

実際に Cohen らは Ca^{2+} 蛍光イメージングを用いて神経細胞間の応答の伝わり方を解析し、神経ネットワークの細胞密度が神経細胞応答の伝わり方にどのように影響を及ぼしているかを明らかにした(Cohen et al., 2008)。その結果、神経細胞密度が低い場合、周囲の細胞に応答は伝わるが、高い場合は周囲の細胞への伝搬がないことを示した(Figure 4)。このような高密度の神経系において電流刺激応答によるネットワーク解析を行うためには、複数細胞を同時に電流刺激しながら Ca^{2+} 応答の蛍光を観察可能な系が必要となる。

1.5 ITO ガラスについて

酸化インジウムスズ(indium-tin-oxide, ITO)は酸化インジウムの無機化合物である。粉末は黄色～灰色であるが、可視光領域の透過率は高いため、薄膜ではほぼ無色透明である。薄膜は電子ビーム蒸着法、物理気相成長法、スパッタ蒸着法などを用いて製造され、中には In_2O_3 と Sn をドーピングさせているものもある(Konry and Marks, 2005)。

この ITO は、透明なガラス等にスパッタリングなどにより薄膜を形成させた透明電極として液晶分野などで広く用いられている(Figure 5(上))。このガラスは導電性(比抵抗で約 $1 \times 10^{-3} \Omega\text{cm}$ 以下)と透明性(波長 380–780 nm で透過率が約 80%以上)を兼ね備えている(Konry and Marks, 2005, Figure 5(下))。このような特性から、ITO ガラスは神経細胞の刺激や計測のための MEA の材料としても用いられており、神経細胞に刺激を与える系(Takayama et al., 2011b, 2009b)と、応答を計測する系(Furukawa et al., 2013; Gopal, 2003; Liu et al., 2012)、さらに刺激を与えつつ応答を観察する系(Nam et al., 2006)などに広く用いられている。実際、従来の金電極を用いた場合と ITO ガラスを用いた場合を比較したときに、神経細胞の活動を計測する上で ITO ガラスのインピーダンスは問題になるほど高くないことが報告されている。また 1 mm^2 あたり 400 を超える高密度電極パターンの MEA が作製できるようになった(Gross et al., 1985)。

さらに、ITO ガラスは神経細胞発火の電氣的計測のみならず、PDMS (poly-dimethylsiloxane, ジメチルポリシロキサン)チャンバーと組み合わせた培養系における電流刺激装置としても使われている(Lei et al., 2014)。ITO の他の応用例として、上からカーボンナノチューブ層を

形成することにより電気伝導率を上げた例(Shi et al., 2011; Suzuki et al., 2013)や、通電することにより細胞を電極基板から脱離させ細胞観察中のハレーションが起こるのを防ぐために用いた例(Fukuda et al., 2011)もある。

しかしながら、ITO ガラスを電流刺激に用いたこれらの研究では、刺激を与えている細胞の周囲にある細胞の応答や、自発発火、あるいは薬物刺激した場合の神経ネットワーク全体の応答を観察してはいるものの、電流刺激を与えている細胞自身の応答を見てはいない。

そこで近年、MEA に ITO を用いて、刺激を直接与えている神経細胞の Ca^{2+} 応答を観察する手法が用いられているようになってきた(Behrend et al., 2011; Weitz et al., 2014, 2013)。しかしその一方で、刺激を与える際に一般的に用いられている対電極を用いた従来の系では、刺激を与える場所により刺激電流値にばらつきが出やすいと言われており、また個々の細胞へ流れる電流は不明である(Behrend et al., 2011, 第 2 章第 2 節で詳しく説明する)。

本研究ではこの問題を解決するために、ITO ガラスにより神経ネットワーク内の局所領域に流れる電流が定量的に見積もれる電流刺激を与えながら Ca^{2+} 応答を蛍光イメージングにより観察することを可能とする系の確立を目指した。

1.6 本論文の目的

神経ネットワークを詳細に解析するために、神経ネットワーク系全体を定量的に電流刺激し、その全体への影響を見ることが可能な系を構築する必要がある。本論文の目的は、複数細胞の電流刺激によって起こる Ca^{2+} 応答を用いて神経ネットワークの構成を調べることであり、そのために ITO (indium-tin-oxide)透明ガラス電極を用いて定量かつ一様な電流刺激を与えることが可能な系を作製し、実際にネットワークを形成する海馬神経細胞に対してこれを適用する。第 1 章での研究背景と目的の説明に続き、第 2 章では、ITO ガラス電極とその電極形状を成形するための手法、および Ca^{2+} 指示薬である蛍光色素として用いた fluo-4 などについて述べると共に、対電極を用いずに複数細胞に電流刺激を与え Ca^{2+} 応答を観察することが可能な系を確立し、その系を用いて神経細胞に定量的な電流の刺激を与えることが可能かどうかについて検討する。第 3 章では、この系を、ネットワークを形成している海馬神経細胞に対して適用し、定量的な電流刺激によるネットワーク応答の解析を行った結果を示す。第 4 章で、本論文のまとめと今後の展望について述べる。

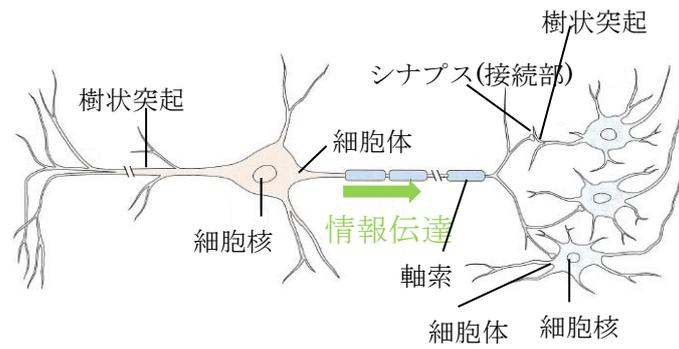


Figure 1 神経細胞の接続関係

複数の神経細胞同士の神経接続(上, Modified from Kandel, et al., 2000)

コネクトーム (下, Seung, 2013)

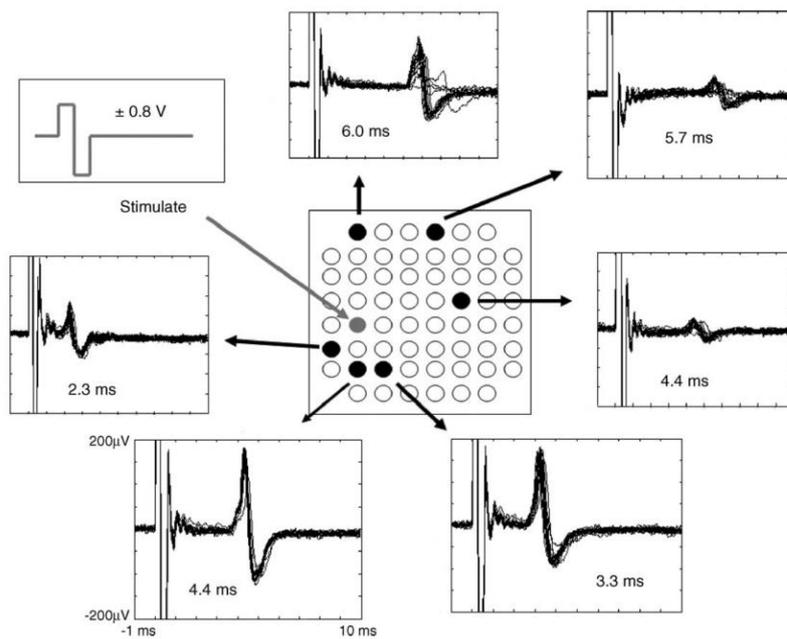


Figure 2 一面に神経細胞が分布している中での特定の電極で与えられた刺激に対する周囲の電極上の細胞応答の遅れの観察 (Nam et al., 2006)

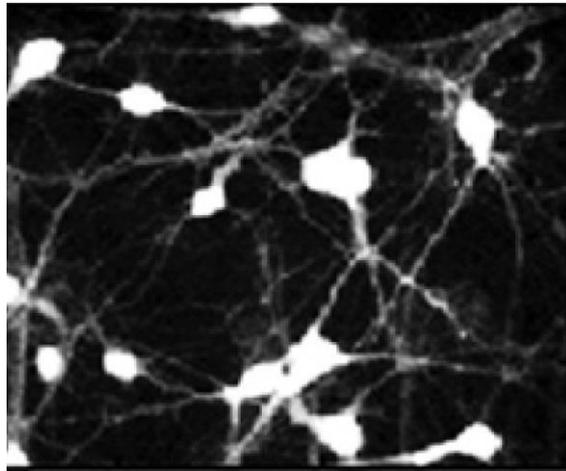


Figure 3 Ca^{2+} 蛍光イメージングの例
スケールバー25 μm (fluo-4, (Cohen et al., 2008))

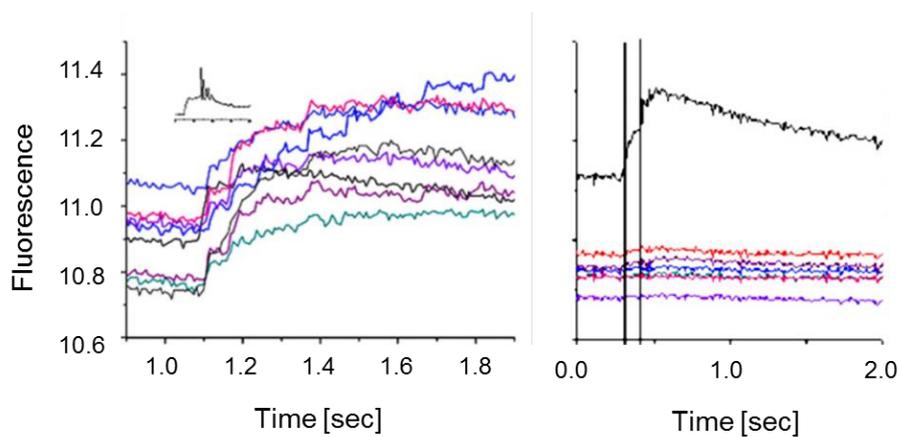


Figure 4 単一細胞の電流刺激に対する神経ネットワーク応答

(左)8 つの神経細胞群からなる小さなネットワークでは 1 つの細胞の活動が他の細胞の活動を導く

(右)無数の神経細胞群からなる大きなネットワークでは

1 つの細胞の活動が他の細胞に及ぼす影響は小さい(Cohen et al., 2008)

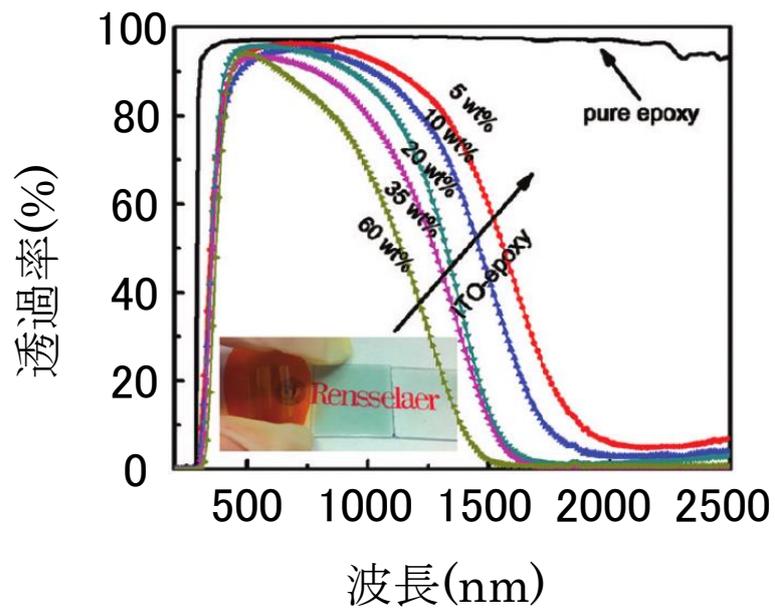
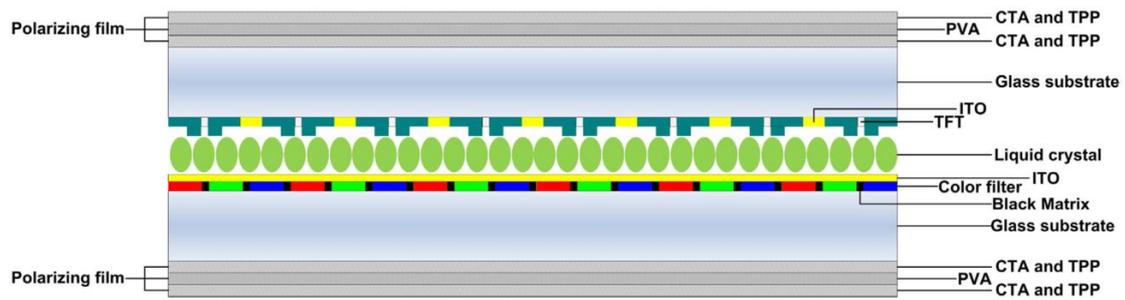


Figure 5 ITO ガラスについて

(上)液晶ディスプレイへの応用例(Wang and Xu, 2016)

(下)透過光スペクトル(ここでは ITO 樹脂濃度による違いを見ている, Tao et al., 2011)

第2章 ITO ガラス電極を用いた分化 PC12 細胞に対する

対電極を用いない電流刺激

2.1 はじめに

神経細胞を含めた興奮性の細胞は物理化学的な膜特性により制御されている (Catterall, 2010)。神経活動の計測や個々の神経細胞に刺激を与えるためには、細胞内計測やパッチクランプ法が広く用いられてきた (Cohen et al., 2008; Hatakeyama et al., 2010; Wallach and Marom, 2012)。この方法を拡張したものとして、多点電極アレイ (multi-electrode arrays, MEAs) があり、この方法では細胞に刺激を与えながら同時にその活動を計測できることから、複数の神経細胞の分散培養系や組織での神経ネットワークの特性を調べることができる (Furukawa et al., 2013; Wagenaar et al., 2005)。*In-vitro* や *in-vivo* で、複数の神経細胞の活動を同時に計測するためによく用いられている方法として、カルシウムイメージング法がある (Ikegaya et al., 2004; Ogawa et al., 2006)。カルシウムイメージングにより、着目している領域 (region of interest, ROI) での神経活動の観察とこれらの間での相互作用と接続関係についての解析を、長期培養期間中に連続的に行うことができる (Bock et al., 2011; Brustein et al., 2003)。最近、カルシウムイメージングによる観察が可能な、特定の神経細胞の電流刺激の研究用に、酸化インジウム (indium-tin-oxide, ITO) ガラス電極を用いたデバイスが開発された (Behrend et al., 2011; Weitz et al., 2014, 2013)。

1章でも述べたように ITO ガラス電極は高い透明性と電気伝導率を併せ持っている (Konry and Marks, 2005)。これにより電極上の細胞に電流刺激を与えつつ、その応答をカルシウムイメージングにより観察できる。また、直接刺激を与えられた細胞とともに、周囲にいる細胞の活動を評価することができる。ITO 電極デバイスを用いることで、電流刺激に対する幹細胞や網膜神経細胞の興奮性が計測されてきた (Behrend et al., 2011; Takayama et al., 2011b)。これらの研究では、細胞は ITO の刺激電極と対となる電極 (対電極) の間を流れる電流により刺激を与えられている。しかし、2つの電極間で電流がどのような経路を流れているのかが不明である。さらに、刺激強度は ITO 刺激電極上の細胞の位置のみならず、刺激電極と対電極間の距離により変動する。結果的に、神経細胞の興奮に必要な電流強度を決定することが困難である (2.2 節で述べる)。

本研究では、対電極を用いることなく多くの細胞群に均一に刺激を与えることが可能なデバイスの作製を試みた。この目的のため、細胞が接着している電極を通る電流により細胞が興奮するかどうかを調べた。そのために、神経成長因子 (Nerve Growth Factor, NGF) により分化させた PC12 細胞を興奮させるのに十分な ITO ガラス電極の開発のための設計とパターンニングを行った。PC12 細胞は神経細胞に似た構造と興奮性を持っているものの、機能的神経接続を形成しない。従ってこれらの細胞は、デバイスの Ca^{2+} 応答を引き起こすため

の刺激効率と入力刺激の局所性を知るために利用できる。パターンニングした ITO ガラス電極を用いて、刺激電流強度と細胞興奮性の関係を調べた。さらに、細胞に対してより効率のよい刺激を与えるために、電極中の刺激に用いた細い領域の長さや幅を変化させることにより、刺激電流密度を変化させ、最適な電極形状パターンを定量的に評価を行なった。以上の方法を用いた結果、作製した系は ITO 電極上の複数の細胞群に対して刺激を与えることが可能であることが明らかになった。最後に、このデバイスにより神経回路内の海馬の培養神経細胞に刺激を与える実験を行った。

2.2 ITO ガラスを用いて複数細胞に電流刺激を与え Ca^{2+} イメージングを行った例

複数細胞への電流刺激による神経細胞の応答を観察するために、網膜の細胞を ITO の電極を格子状に並べた MEA 上に配置して、電流刺激を与えつつ応答を Ca^{2+} 蛍光イメージングにより観察した研究がある (Figure 6)。ここでは、電流刺激強度を段階的に上昇させた際に、刺激を与えている電極の周囲における各領域に存在する細胞において、 Ca^{2+} 応答を示す電流値の閾値を求めている (Figure 6(下))。この系では、網膜の細胞は画像の中での左右方向に突起を伸ばす向きに配置されており、この方向に応答が広がっているのは自然な結果である。しかし、それとは垂直な方向にも応答は広がった。電極の大きさを $60\ \mu\text{m}$ より小さくしたものについては電極の大きさに関わらず周囲に応答が広がることを示されている (Behrend et al., 2011)。

これまでの報告の中で用いられている MEA では、刺激を与えるための刺激電極に対して参照電極として対電極が用いられている。私は、Behrend らの報告において小さな電極の刺激範囲の局所性に限界が生じた原因は、対電極を用いることにより通過する電流の経路が端子間で複雑に広がっていることが原因と考えた (Figure 7)。

本研究では、対電極を用いずに、細長い形状の刺激電極の両端の間で電圧を印加することにより刺激を与えることが可能な系を作製することにした。

2.3 方法

2.3.1 電極のパターンニングのためのフォトマスクの設計と製造

パターン ITO 電極はそれぞれの形状のフォトマスクを用いて製造した。これらのパターンはベクトルベースの描画ソフトである Canvas Version 11 を用いて設計し、レーザープリンタ (LBP9600C, 109 Canon, Tokyo, Japan) を用いて透明な OHP フィルム上に白黒印刷した。ここで描画されたものは黒と白 (OHP フィルム上では透明) が反転しながら縦横共に 5 分の 1 に縮小され、エマルジョンマスク (HIGHRESOLUTION PLATE 3 inch×3 inch, Konica, Tokyo, Japan) 上に複写される。このプロセスは、縮小投影露光装置 (MM605, Nanometric Technology Inc., Tokyo, Japan) を用いて、印刷した OHP フィルムを介した光をエマルジョンマスクに照

射することにより行った。フォトマスク上に設計した形状を複写するために、光にさらされたエマルジョンマスクは暗室内で現像液(CDH-100, Konica)と定着液(CFL-X, Konica)に浸した。

2.3.2 ITO 電極の導電面のエッチング

ITO ガラス電極により細胞分散培養系に対して所望の刺激を与えることが可能にするために、電極の導電面の形状を任意のパターンに成形した。本研究ではこれをフォトリソグラフィという微細加工技術を用いて行った。ここでは以下の手順に従って行った。

- ① 抵抗 50Ωで大きさ100-100 mm の ITO に覆われたガラススライド(Kinoene, Tokyo, Japan)を用意した。
- ② ITO をフォトリソグラフィとウェットエッチングの手法でパターンニングした(Sun and Gillis, 2006; Zhan et al., 2002)。
- ③ 厚さ 0-10μm の層の AZP4210 ポジティブフォトレジスト(AZ Electronic Materials, NC, USA)を ITO ガラススライドの導電面上に塗布し、スピコーター(SC200, Nanometric Technology Inc.)を用いて 1500rpm でスピコートし、ホットプレート(ND-1, AS ONE, Osaka, Japan)上で、100℃で2分間ベークした。
- ④ ベーク後のガラススライドを、マスクアライナー(MaskAligner LA310k, Nanometric Technology Inc.)からの UV 光に、作製してあるそれぞれのパターンのフォトマスクを介して、1.5 秒間照射した。
- ⑤ フォトレジストを 20%の AZ400K デベロッパー(AZ Electronic Materials)溶液で現像した。
- ⑥ フォトレジストによる覆いがない部分を、酸混合溶液である 5% HNO₃ と 20% HCl を用いてエッチングした。
- ⑦ 残ったフォトレジストを 100% AZ400K デベロッパーの中で除去した。
- ⑧ パターンニングされた ITO ガラス電極をアセトンですすいで乾かした。

この手順により任意形状の電極パターンを作製した(Figure 8)。

2.3.3 PC12 細胞培養

PC12 細胞は RIKEN の筑波研究所から分与していただいた。細胞を 10% horse serum (HS, Invitrogen)、5% fetal bovine serum (FBS, Invitrogen)、25U/mL ペニシリンと 25μg/mL ストレプトマイシン(Nacalai Tesque, Kyoto, Japan)を含んだ培地 Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM, Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)中で、37℃で培養した。パターン ITO 電極上で細胞を培養するために、貼り付け型のチャンバーである Press-to-Seal silicone isolators (Invitrogen) を 4 枚パターン ITO 電極上に重ねて貼り付けた。パターン ITO ガラス上への細胞を接着するための接着因子として Cellmatrix Type I-C (Nitta Gelatin Inc., Osaka, Japan)をチャンバー内の領域にコートした。そして、継代数 5 から 9 の PC12 細胞を DMEM 内で分散し、接着因子をコートした領域に注いで接着するのを待った。なお、細胞懸濁液は 10-15 × 10⁴ cells/mL でこれを 1mL 注いだ。2 時間から 1 日後の間に血清を含まない 50 ng/mL nerve growth factor (NGF, Alomone Labs, Jerusalem, Israel)を含んだ培地で置き換え、3 日間の培養で分化させた。

2.3.4 Ca^{2+} 応答観察のための蛍光色素

Ca^{2+} 濃度の可視化のための蛍光色素は表 1 に挙げるように、様々なものが存在する。例えば、Fura-4F や Fura-5F などは K_d 値から小さな Ca^{2+} 応答の検出には向いているが、広い濃度範囲での高感度な検出がしにくい。Fura-2 は 2 つの波長の光を交互に当てることによる蛍光の比から Ca^{2+} 濃度の絶対値を求めることができるが、2 波長の光をほぼ同時に当てる必要がある。また感度はあまり高くない(表 1)。

本研究では、約 100–1000 nM レンジで Ca^{2+} 濃度変化を観察したいこと、ITO ガラスの 80% を超える透過率をもつ波長域で励起・蛍光観察したいこと(Figure 5)、さらには濃度変化による蛍光強度変化が大きい色素が望ましい。この中で fluo-4 は、解離定数が神経活動を起こした時のカルシウム濃度域であることや($K_d=345\text{nM}$)、励起スペクトル 494 nm、蛍光スペクトル 516 nm と ITO ガラスの透過率が高いこと、さらに神経活動が起こった時の Ca^{2+} 濃度変化による蛍光強度増加率が大きい(100 倍以上)ことから、本研究では fluo-4 を用いて細胞を染色することにした(Paredes et al., 2008)。

この fluo-4-AM (Invitrogen) を DMSO (Nacalai Tesque) で溶かして 5 mM の溶液にした状態で -20°C で保存した。光学イメージングのために、パターン ITO ガラス上にある PC12 細胞や海馬の神経細胞をそれぞれの培養液中に $5\mu\text{M}$ または $10\mu\text{M}$ の fluo-4-AM と 0.02% pluronic F-127 (Invitrogen) を混合し、 37°C 、 CO_2 5% のインキュベータの中で 30 分間恒温放置した。その後、Krebs-Ringer Henseleit solution (KRH) で 2 回洗った。

KRH の成分は表 2 にまとめる。混合した溶液を NaOH と HCl で pH7.4 に調製した。

2 回の洗浄後、KRH 1 mL を皿に加えた後、細胞中の fluo-4-AM のアセトキシメチルエステルの加水分解を行うため、再びインキュベータの中で 15 分間恒温保存した。fluo-4-AM はもともと親水基の fluo-4 に疎水基の AM(アセトキシメチル基)が結合している分子であるが、この結合を加水分解により分離した。これにより、一度細胞内に入った fluo-4 が外に出にくくなる。

2.3.5 fluo-4 の蛍光計測

蛍光イメージングは、蛍光顕微鏡にイメージングシステムを搭載したものをを用いて行った。顕微鏡は、ECLIPSE TE300 (Nikon, Tokyo, Japan) を用いた。これに 10 倍の対物レンズ(S Fluor, Nikon)、505 nm のダイクロイックミラーと 535/55-nm のバリアーフィルターをそれぞれ装着した。対物レンズは、用いる ITO 電極導電面の幅のスケールと、可能な限り多くの細胞を fluo-4 により観察することができる条件を考慮して 10 倍の倍率のものを選んだ。fluo-4 は、Xe ランプ(150W)からモノクロメーターユニットを用いて抽出された 488 nm の光で励起した。この時の fluo-4 の最大蛍光波長は 516 nm である。505 nm のダイクロイックミラーは、励起光波長以上で蛍光波長以下のものとして選んだ。蛍光を CCD カメラ(HiSCA, Hamamatsu Photonics, Shizuoka, Japan) で取り込み、連続画像(動画)について、ソフトパッケージである Aquacosmos (Hamamatsu Photonics) を用いて、各細胞の細胞体を region of interest (ROI) を手動で囲い、その領域内の平均蛍光値を計算した。

2.3.6 電流刺激と電流計測

電流刺激には電気刺激装置(SEN-8203, NIHON KOHDEN, Tokyo, Japan)を用いてチャンバーと直列につないで回路をつくり、電圧調整による電流刺激を与えた。刺激を与える際に用いた条件は表3にまとめた。

この設定条件では、1サイクルでそれぞれの電圧値の周波数 20Hz の刺激を 10 秒間与えられ、この刺激が 30 秒に 1 サイクルとなるようにした。電圧値は単パルスの振幅を表す。

また、ITO 電極を流れる電流の計測には、デジタルマルチメータ(CDM-2000D, CUSTOM, Tokyo, Japan)を用い、刺激装置と細胞が接着しているパターン ITO 電極を含んだ回路と直列に接続して測定した。このときデジタルマルチメータを交流計測用の ACA モードにセットした。

2.3.7 計算と解析のためのソフトウェア、計算手法

電流刺激に対する Ca^{2+} 蛍光値変化を基に、 Ca^{2+} が応答を示したタイミングを検出し、着目している細胞ごとに初期値に対する相対蛍光値の時間微分値 ($d(F/F_0)/dt$) を計算した。 F_0 は蛍光値の初期値である。 Ca^{2+} の蛍光値は、刺激を与えていない時間帯(0-1min)のカルシウム蛍光値の時間微分値をノイズとして考え、連続する 2 つのサンプリング点間の時間変化率を、刺激を与え始める前に撮影を始めてから 1min までの間で統計をとり、その標準偏差 SD を求めた。これをノイズの標準偏差とした。刺激を与え始めた時間の中で、この値の $2.58 \times \text{SD}$ 以上の値を得た時刻を、応答が起こった時刻とした(Ikegaya et al., 2004)。ここで、標準偏差の 2.58 倍は、ノイズの時間変化率の分布を正規分布(ガウシアンノイズ)として仮定したとき、両端の 0.5% の領域の境界である。このノイズの原因は様々なものが考えられるが、細胞がない領域でも同じ蛍光変化が見られることから、これは本研究で用いている CCD カメラの特性と考えられる。本研究ではこのノイズを正規分布に従った挙動を示すと考えたが、ノイズがどのような特性を持っているかについて実際に検証するために、ノイズによる変化率を細胞ごとにその標準偏差で割り、全ての細胞の総和の分布を求めた(Figure 9)。この結果、正規分布とはわずかに異なるものの、平均値 0 付近に集積する結果が得られた。さらにこの結果から、本研究で応答とみなした蛍光強度変化、すなわちノイズ変化率の標準偏差の 2.58 倍以上のものは、上位 0.14% 以上のものであることが分かった。この値はノイズが実際に正規分布に従っていた場合(0.5%)に比べてより厳しい検出を行っていたことを示している。これらの計算はいずれも数値計算ソフトウェアである MATLAB を用いて行った。

2.3.8 電流を流している時の電極の温度計測

電極の温度は赤外線温度計測器である Visual IR Thermometer (VT04, FLUKE, WA, USA)を用いて計測した。ITO デバイスに対するサーモグラフィーの画像は 10 秒間の電流印加時間の最後に取得した。

2.4 結果

2.4.1 対電極を用いないパターン ITO ガラス電極により引き起こされる PC12

細胞の興奮

対電極を用いないで刺激を与えるためには、ある程度の大きさの電流が必要であると考えられる。本研究では、その問題を克服するために、市販で購入した ITO ガラスの導電面を細胞の応答を誘起することができる、より強い刺激を与えることが可能な形状に成型することにした。Figure 10(a)に示すように、観察領域の電極幅が狭まった形状の導電面をフォトリソグラフィによって成型した。このような系で刺激を与えると、細い領域に大きな電圧が印加されるものと考えられる。また、この形状の電極を使用することにより、電極の幅方向が観察領域に収まるため、流れている全電流による影響を見ることができる。

この形状の電極を用いて電圧を印加することにより、私は Figure 10(b)に示すようなメカニズムで電流刺激が行えると考えた。すなわち個々の細胞に対して電圧が Figure 10(b 上)のように加わるものと考えられ、その等価回路(Figure 10(b 上))として電極導電面側と細胞側の 2 つの経路の並列回路に電圧が与えられているものと考えられる。導電面側は抵抗が小さく($r=30\text{--}50\times 10^{-6}\Omega/\text{cm}^2$)大きな電流が流れている一方で、細胞側の抵抗は相対的にとても大きく(細胞膜の抵抗 $R=500\Omega\text{--}10\text{k}\Omega/\text{cm}^2$)僅かな(イオン)電流しか流れていない。この状況で電圧値を徐々に大きくすることにより、イオン電流による細胞膜の電位変化が閾値を超えたところで細胞の興奮を引き起こせるものと考えた。

実際にこの形状の電極を用いて細胞に対して刺激を与え、応答を引き起こすことができるかどうかを調べるために、Figure 11 のような系により実験を行った。ここでは電極の刺激特性を知ることが目的としているので、細胞間で互いに突起を伸ばしあって相互座用を起こすとは言われていない NGF 分化 PC12 細胞をチャンバーに分散培養して実験を行った(Cao et al., 2007; Greene and Tischler, 1976; Jeon et al., 2010)。

ITO ガラス電極はおよそ 80%あるいはそれ以上の透過率を持っているので(Figure 5)、分化 PC12 細胞での fluo-4 の蛍光は ITO ガラス電極を介して観察できた(Figure 12 上)。入力電圧を 10 から 50V まで徐々に増加させた時(Figure 12 下)、35V と比較的弱い刺激で応答する細胞もいる中で、電圧強度の関数として応答細胞数が徐々に増加する様子が観察された(Figure 12 中央上下)。応答する細胞での蛍光上昇タイミングは電流刺激を印加するタイミングに一致した。すなわち、刺激の間は蛍光が上昇し刺激の間隔では減少した。 Ca^{2+} 応答の振幅は電圧強度に従って増大した(Figure 13(a), (b), Jonckheere's trend test で $P<0.0001$)。さらに、電流刺激による Ca^{2+} 応答が自発活動に比べ大きかった(Figure 13(b)、Dunnett's test で $P<0.05$)。これらの結果より、パターン ITO ガラス電極を用いることで対電極なしで PC12 細胞に電流刺激を与えつつ、その応答を同時に観察することが可能であることが示された。

2.4.2 ITO 電極の設計による興奮細胞数への影響

前節で電極導電面の形状を中央が細くなるようなものにするにより、細胞の応答を引き起こすことができることがわかった。電極の形状により刺激の加わり方に違いが出ると考えられるので、導電面の形状と細胞応答の関係について検討することにした。ここでは導電面の細い領域の長さや幅をそれぞれパラメータとして変化させたときの各形状の電

極により、応答する細胞の数の割合がどの程度変化するか調べた。

パターン電極の特徴と分化 PC12 細胞へ加わる刺激効果の関係を調べるために、様々なパターンの ITO 電極上で計測される Ca^{2+} 応答を比較した。ITO ガラス電極の導電面中央部の細い領域の長さと同幅を変化させることにより導電面の細い領域の抵抗と電極全体に流れる総電流は変化するので、細胞の応答に対する電極形状パターンの影響を調べることができる(Figure 14(a))。まず、長さ 2 mm と設定し、幅をそれぞれ 0.05, 0.1, 0.25, 0.5, 1, 3 mm と変化させた。ここで、3 mm の幅の電極は導電面中央部が細くなっていない電極であり、これをコントロールの条件とした(Figure 14(a))。最初は Ca^{2+} 応答を引き起こすために必要な刺激強度がわからないため、それを決めるために電流刺激装置の設定電圧を 10 から 50V まで徐々に上昇させた(Figure 12 下)。応答細胞数の割合と入力電圧の関係を Figure 14(b)に示す。応答細胞割合とは、電極上の細胞の中で、各電圧を与える段階までに最低 1 回でも応答した細胞個数の総細胞数に対する割合を表している。結果より、幅が 0.05, 0.1 mm の電極については電圧増加に応じて徐々に応答細胞割合は増加した(Figure 14(b))。次に応答細胞割合を、幅を一定にしたまま電極長さを変化させることにより比較した。Figure 14(b)で示したように長さが 2 mm の電極の中では、幅が 0.05 mm のデバイスが同じ電圧強度で最も細胞の応答を引き起こすことができた。そこでここでは電極幅を 0.05 mm と固定し、長さをそれぞれ 2, 5, 10, 20 mm と変化させた。電極長さが 2, 5, 10 mm のデバイスについては電圧を上げていくにつれて応答細胞率の上昇が見られた。しかし、長さ 20 mm の電極についてはそのようにならなかった(Figure 14(c))。この結果は、幅が 0.1 mm 以下の電極のデバイスは、導電面上の細胞に刺激を与えることができることを示している。一方で、長さを 2 から 10 mm の間で変化させることによる刺激効率への影響は殆ど見られなかった。

結論として、長さ変化については殆ど違いが見られなかった一方、幅変化については細いものほど大きな応答となることがわかった。

2.4.3 全電流値が細胞の興奮誘起効率を決定している

電極の形状により同じ電圧でも応答細胞率が異なることがわかったが、その原因を明らかにするために、Figure 14 で示したデータを、ITO 電極デバイスを通った総電流値に対する関数として Figure 15 にプロットした。プロットの出し方は以下の通りである。まず、Figure 14 の電圧値依存グラフは全て各々の刺激を開始したタイミングから 30 秒の間にいくつの細胞が応答したかで応答細胞率を求めており、それぞれについて実験回数分の平均値を求め、1つ1つのプロットが計算されている。このとき刺激の電流値は毎回計測しており、その平均値を横軸としてプロットし直して電流値依存を調べた (Figure 15)。この結果より、電極パターンに関係なく、各プロットは電流値に対してほぼばらつくことはなかった。このことは、電流値がある閾値以上になると応答細胞率は電流値に対して正の相関があると言える。すなわち、60 μA 以下の刺激では細胞は殆ど応答しないが、60 μA を超える刺激に対して応答細胞率は強度に応じて線形に上昇する($R^2=0.8154$)。一方で 60 μA 以下の電流値では、プロットは 0 から 0.1 までの間で点在しており、刺激に対して相関はなく(直線による最小

二乗近似を行った場合、 $R^2=0.1673$)、刺激電流値に依存しないもの、すなわち自発的な応答であるとみなせる。一見、 $60\ \mu\text{A}$ 以下でも電流強度に依存したプロットラインがあるようにも見えるが、この結果は Figure 14 の中で殆ど応答が見られなかった電極での僅かな電圧依存性からきたものと考えられる。このことを検証するために、刺激を全く与えていない条件において、同様の実験を行った(Figure 16)。Figure 14 では各電圧強度の刺激を測定開始後の決まった時刻に与えていたので、Figure 14 のプロットの全ての電圧値が時刻に対応する。Figure 16 は、Figure 14 の実験で与えた各電圧値と、Figure 14 で各電圧値刺激を与えた時刻までの無刺激での応答細胞率を示す。この結果では 50V の刺激を与えていた時刻では 0.1 にまでは上昇が見られなかったが、 0.07 付近までの上昇は見られた。この結果は Figure 15 の電流依存性のグラフでの $60\ \mu\text{A}$ までの大半の応答は自発的なものであったことや、 $60\ \mu\text{A}$ 以上の応答が電流値依存性を示すことの裏付けとなる。

以上のように Figure 15 より、応答細胞率は電流値により説明され、電流値がある閾値を超えて細胞は初めて応答すると考えられる。しかし、ITO 電極を通る電流によって生じるジュール熱が細胞の活性化に影響を与えるという可能性が残る。この可能性を検証するために、電極パターンごとに最大値電圧 50V を与えた時の電極温度を、パルス幅を変えながら赤外線サーモグラフィを用いて計測した。パルス幅を $800\ \mu\text{sec}$ まで上げて最も温度変化が大きかったもので 0.7°C であった。また、電極パターンごとに細胞刺激実験で用いていたパルス幅 $90\ \mu\text{sec}$ の電圧を与えた時の温度変化と Figure 14 で求めた対応する刺激による応答細胞率の関係を出したが、全く相関が見られなかった(Figure 17, 線形近似で $R^2=0.0585$)。温度変化が細胞の応答に与える影響についてはこれまでも報告されてきたが、いずれも数 $^\circ\text{C}$ から 10 数 $^\circ\text{C}$ の変化に対するものであり、今回のように $0-0.2^\circ\text{C}$ という僅かな変化(パルス幅 $90\ \mu\text{sec}$ の場合)による影響を見ているものはない(Eberhard et al., 2014; Eckerman et al., 1990; Maturana et al., 2015)。よって、ジュール熱が細胞の刺激に対する応答に影響を与える要因でなかったと考えられる。以上の結果、パターン ITO ガラス電極を用いることで、PC12 細胞はおよそ $60\ \mu\text{A}$ の閾値をもって、電流値に依存した応答を示すことがわかった。

2.4.4 対電極なしの ITO 電極を用いた電流刺激の空間分解能

本研究で作製した刺激系は、刺激を与えている電極導電面が 1 つの細長い形状を持っていることが大きな特徴であり、これにより流れている電流経路がほぼ導電面の領域のみであると考えられる。ここではこの特徴により、細胞の電流刺激がどれほど空間的に局所性を持っているかを検討することにした。

私は導電面の外側に位置する細胞は同じように電流により興奮を引き起こされるかどうかを調べた。NGF 分化 PC12 細胞がドーパミンの放出を促進するプレシナプスのような構造を形成するものの、隣接する細胞の興奮を促進する機能はなく、それゆえ細胞間で Ca^{2+} 応答が伝播することはない。先行研究より PC12 細胞は刺激の局所性を評価するために適していることが示されている(Cao et al., 2007; Greene and Tischler, 1976; Jeon et al., 2010)。また、もし着目している細胞が死んでいた場合、刺激を与えているのに応答を示さないものとし

てカウントされてしまう。この問題を克服するために、各実験の最後に KCl を最終濃度 40 mM となるようにチャンバーに直接添加することで神経細胞を直接興奮させ、刺激実験後に生存している細胞を同定した。入力電圧を Figure 14 の実験同様に最大値 50V まで徐々に上げていき、応答細胞割合を、電流刺激により最低 1 回応答した細胞数を電流刺激あるいは KCl 刺激のどちらかで応答した細胞数で規格化した。この応答細胞割合は電極上と電極外両方について、それぞれの位置にある細胞に対して。電極外の領域については、応答細胞割合は電極の上下の端から各幅 20 μm の間隔の領域ごとに計算した(Figure 18(a))。今回の実験には、Figure 14 で応答率が高かった幅が 0.05 mm の電極を用いた(Figure 14)。これにより、本章 2.2 節で述べた先行研究での、神経応答の拡がり方の検討も行えると考えた。電極は長さ 2, 5, 10 mm のものを選んだ。

応答細胞割合は電極上で最大となり、電極から離れた領域になるほど減少した。電極から 0 から 20 μm と、20 から 40 μm の領域に対して得られた応答細胞割合は、電極上のそれに比べて有意差はなかったが、電極から 40 μm より離れた領域では有意に低い値となった(Figure 18(b), $P < 0.05$ in Dunnett's test)。一方 Ca^{2+} 応答の最大振幅は導電面から離れることにより減少し、20 μm 以上離れた各領域の Ca^{2+} 応答の最大振幅は電極上のそれに比べて有意に低かった(Figure 18(c), $P < 0.05$ in Dunnett's test)。

このように、本研究で作製した電流刺激系の局所性を示すことができた。

2.4.5 海馬の神経ネットワークへの適用

ここまでの実験で、今回作製した対電極がない形状の ITO ガラス電極の刺激系は、分化 PC12 細胞に刺激を与えて応答を引き起こすことができる系であることがわかった。本学位論文の目的は、神経ネットワークを形成する複数の細胞に対して、刺激を与えて応答を観察することにより、接続関係を調べることである。そこで、ここではシナプス接続を形成する海馬神経細胞に対して電流刺激を与えた時も PC12 細胞と同様に Ca^{2+} 応答を引き起こすことができるかどうかを確認することにした。

In-vitro で 4 週間培養した海馬の神経ネットワークにおいて実験を行った。画像上の蛍光色素で染まっている細胞(Figure 19(a))について、刺激に応じてどのタイミングで応答するかをそれぞれの細胞について時間軸上で示した(ラスタプロット, Figure 19(b))。ここで、電極上と電極外の領域について分けて示している。さらに、電極上、電極外それぞれの領域で、時間軸上の各 30 秒の bin 幅で応答した細胞数の割合をそれぞれ求めてヒストグラムを作成した。この結果より、刺激を与えていない時間帯 (0 から 10 分)でも電極内外に関わらずまばらな自発 Ca^{2+} 応答が観察された。刺激を与えることにより、電極上の細胞については刺激に対して同期的に応答を示す細胞が見い出された。ヒストグラムから、電極上の細胞では刺激のタイミングでピークが現れることがわかった。一方で、電極外の細胞では電極上の神経細胞と同期的なより小さなピークが現れることがわかった。これは、電極上の細胞の応答が電極外の細胞へ伝搬することにより見られたものではないかと考えることができる。

このように、PC12 細胞同様、海馬でも本研究で作製した刺激系による応答を確認することができた。

2.5 本章のまとめ

本研究では対電極を用いないで細胞に刺激を与えるための ITO ガラス電極を開発した。このデバイスは電極上の興奮性細胞の活性化と同時に、蛍光のカルシウムイメージングによって細胞の活動を同時に観察することができる(Figure 12)。この ITO 電極デバイスは、導電面の中央部の幅や長さに関わらず、およそ 60 μA の刺激閾値を境として電極を流れる電流値に依存して PC12 細胞での Ca^{2+} 応答を引き起こす。このときジュール熱は関係ない(Figure 14, Figure 15)。さらに、電極上と電極に近い領域に位置する細胞のみが興奮を引き起こされる(Figure 18)。細胞はパターン ITO 電極を流れる電流により直接刺激を与えられるので、この系は対電極が必要なく、したがって対電極を配置することなく複数の細胞に対して同時に刺激を与えることが可能となる。ここで開発されたデバイスは海馬の培養神経ネットワークでも複数の神経細胞に刺激を与えることができた(Figure 19)。

Figure 18 で示したように、電極外での応答細胞割合は、電極からの距離に応じて減少した。電極上での応答細胞割合はおよそ 0.35 であり、Figure 15 の結果と一致した。応答細胞割合がおよそ 0.1 までの間のもものは自発応答に関与するものであると考えられる。このことは、電極幅が 0.25 から 3 mm のデバイスは幅によらず同じようにおよそ 0.1 まで上昇していく様子が観察された事実から裏付けられる(Figure 14)。電極から 40 μm 以上離れた領域については応答細胞割合が自発応答の範囲である 0.1 以内に収まっていることから、この領域の細胞では殆ど自発発火であると思われる。さらに、 Ca^{2+} 応答の振幅は自発応答の結果とほぼ同じであった($P > 0.05$ in t-test)。この結果もまた、電極から 40 μm 以上離れた領域での応答細胞割合は自発的な応答によるものであったことを示す結果である。反対に、電極から 0 から 20 μm と 20 から 40 μm の領域で観察された応答した細胞割合は電極上の細胞応答割合に比べ小さくなかった($P > 0.05$ in Dunnett's test)。

NGF を加えた 3 日後、本実験で用いた PC12 細胞はおよそ 50 μm の神経突起を伸ばしていると推定される(Das et al., 2004)。それゆえに、電極から 0 から 20 μm と 20 から 40 μm 離れた領域に位置するいくつかの細胞は、電極と接触するまで突起を伸ばしていることもあり得る。結果的に、これらの細胞も ITO 電極を流れる電流により興奮している可能性がある。突起と導電面の接触面積が大きいほど応答が引き起こされる確率が高いと考えられる。それゆえに、私の系はデバイスの中の ITO 電極導電面に接触している細胞のみ興奮を引き起こせたと考えている。

MEA 上に網膜細胞の義眼を配置して細胞に加わる電流刺激の空間局所性を調べた先行研究がある(Behrend et al., 2011)。この研究では、10 μm ほど小さい MEA 電極は、半径およそ 150 μm の大きさの範囲内の神経細胞の興奮を引き起こした。私の研究は刺激の局所性という観点では、先行研究の MEA によるものに比べて優れていると言える。さらに、電流を正

弦波入力にすることで、軸索の活性化を上手く避けることができるため、本研究で用いたような連続短パルス波入力に比べて網膜細胞での刺激の空間局所性を改善するという報告がある(Freeman et al., 2010; Weitz et al., 2013)。この正弦波入力の手法を用いることにより、私のデバイスで細胞体そのものが導電面上にある細胞のみが活性化されるものと考えられる。私の手法と他の神経細胞での電気活動を計測するための手法の特徴を比較した(表 4)。本節で述べた私の手法は、数多くの神経細胞の活動を計測することと、高い空間局所性で特定の細胞のみに刺激を与えることができる点において、他の手法より優れている。

私のデバイスは、導電面の形状によらずおよそ 60 μA より大きな刺激電流のとき細胞を活性化することができる(Figure 14, Figure 15)。60 μA 以下の電流値範囲では、応答細胞率は 0.1 までしか上昇せず、これは自発応答によるものであると考えることができる(Figure 14)。刺激の閾値は、細胞の形態、膜電位依存性のチャンネルの発現量などの物理化学的な特徴や、その他の細胞特性により変化するものと考えられる(Jensen et al., 2005; Soudry and Meir, 2012)。より分化が進んだ PC12 細胞や神経細胞のような興奮性細胞においては、刺激の閾値はより小さくなるものと考えられる(Homma et al., 2006; Simms and Zamponi, 2014)。以前の研究において、MEA 上で培養された細胞への入力電流パターンにより、刺激の閾値は変化するという報告がある(Shepherd and Javel, 1999; Weitz et al., 2014)。本研究においても、入力電流の影響を調べることにより、細胞応答の仕方からさらなる最適な刺激の仕方を知ることとも可能となるであろう。

また、 Ca^{2+} の蛍光強度の変化から応答検出の際の蛍光値変化率の求め方として、カメラで計測したサンプリング周期 Δt (1 秒前後)での変化率を用いたが、サンプリング周期によって測定結果に違いが出るのが考えられる。仮にこのサンプリング周期を倍々に、すなわち $2\Delta t$ 、 $3\Delta t$ などと変化させた場合、ノイズは 1 秒前後の周期で揺らいでいるのに対して、電流刺激による蛍光上昇は 10 秒ほどかかることを考えると、ノイズの特性を全て検出しにくくなり蛍光変化率の標準偏差は小さくなるが、刺激による応答は比較的長い数秒から 10 秒のスペンで同じように変化するので同じ様に検出されることが予想される。このため、応答を検出する際の閾値は低くなり、応答とみなせるものの割合は増加することが考えられる。実際にサンプリング周期を変えた場合のノイズの変化率の標準偏差を比較した結果 Δt 、 $2\Delta t$ 、 $3\Delta t$ の順で大きい結果となった。従って、 Δt での測定では、最も閾値を高く設定するために、刺激に対して応答はしているが蛍光の上昇が小さかったものの検出できなかった可能性がある。一方で、ノイズを最も効率的に除去することができるという点ではよかったと考えられる。ノイズ除去の点については、連続する 2 時刻両方で閾値を超えたものだけを応答とみなした。

このように、全ての応答を検出するためにはよりよい方法は考えられるものの、本研究では Figure 12 の蛍光生波形とラスタプロットの対応より、蛍光の上昇に従って応答が検出できている。本章の電極パターン間での比較という目的には叶っていると考えられる。

本研究では電極上の神経細胞から電極外の神経細胞への Ca^{2+} シグナルの伝播が観測され

た(Figure 19)。本研究で開発したデバイスは、ITO 電極の導電面についてどのようなパターンのもも応用可能である。ITO デバイスは観察領域内に位置する特定の細胞に対して刺激を与えることができ、その一方でデバイスに接触している複数の細胞に対して刺激を与えることができる。*in-vivo* の脳領域のネットワークに対する磁気刺激による活動変化への影響を見る報告がある(Hanakawa et al., 2009)。また、周囲の細胞への閾値以下の入力の振幅を変化させることにより、着目している個々の神経細胞やネットワーク内の活動へどのような影響が出るかを調べた研究がある(Stacey and Durand, 2002; Stacey et al., 2009)。本研究で開発したデバイスが、これら神経ネットワークの分野で神経活動を説明するための有力な道具となりうるであろう。

表 1 様々な Ca^{2+} イメージングセンサ(Paredes et al., 2008)

Indicator	K_d for Ca^{2+} (nM)	Excitation (nm), emission (nm)	Notes
Calcium Green-1	190	490 ex, 531 em	Single wavelength
Fluo-3	325	506 ex, 526 em	Single wavelength
Fluo-4	345	494 ex, 516 em	Single wavelength
Fura-2	145	363/335 ex, 512 em	Dual excitation/single emission
Indo-1	230	488 ex, 405/485 em	Single excitation/dual emission
Oregon Green 488 Bapta-1	170	488 ex, 520 em	Single long wavelength
Fura-4F	0.77	336/366 ex, 511 em	Ratiometric excitation/single emission
Fura-5F	0.40	336/363 ex, 512 em	Ratiometric excitation/single emission
Calcium Crimson	185	590 ex, 615 em	Single long wavelength
X-Rhod-1	0.7	580 ex, 602 em	Single excitation/emission

表 2KRH の成分

各成分	濃度(mM)
NaCl	125
KCl	5
MgSO ₄	1.2
CaCl ₂	2
KH ₂ PO ₄	1.2
Glucose	6
HEPES	25

表 3 電流刺激条件(PC12 細胞)

デュレーション(パルス幅)	70 または 90 μ 秒
刺激間インターバル	50 m 秒
トレイン(1 サイクルのパルス回数)	200 回
電圧(本実験ではこの値を変化させた)	10-50V(5V ごとに上昇させた)

表 4 種々の実験手法の間での様々な特徴比較

	Simply patterned ITO glass electrode (fabricated in this study)	ITO glass electrode with counter electrode	Fluorescent imaging without ITO electrode	Patch Clamp	MEA
Stimulus method	Current flowing in the ITO electrode	Current flowing between the ITO electrode and counter electrode	Bath application of chemicals (KCl etc.)	Current injection to the target cell	Current flowing between the electrode and counter electrode
Number of Stimulation targets	Variable depending on the shape of electrode	Variable depending on the shape of electrode	All cells in the medium	Only single cell	Variable depending on the shape of electrode
Stimulus spatial resolution	20–60 μm scale (Figure 18)	80–90 μm scale (Behrend et al., 2011)	Cannot stimulate specific cells	Specific part of cells, like soma, dendrite, or axon etc.	The distance between electrodes on MEAs (30–1000 μm)
Simultaneous imaging	Yes	Yes	Yes	Yes	No
Response time		Depends on Ca^{2+} dynamics (5–50 msec) (Smetters et al., 1999)		50–200 μsec (Sherman et al., 1999)	2–6 msec (Nam et al., 2006)
Detection limit		Single spike level for each cell (Ca^{2+} imaging) (Smetters et al. 1999; Cossart et al. 2005; Michel et al. 2011 ; Inoue et al. 2015)		Single spike level for specific part of cells, like soma, dendrite, or axon etc.	Single spike level for cells on only the electrode on MEAs (Sorting is needed)
Running cost & Shelflife	•ITO-coated glass slides (reusable) :\$2–3 (raw materials) •Fluorescent Probe (not reusable) :\$2–3 /one time	•ITO-coated glass slides (reusable) :\$2–3 (raw materials) •Fluorescent Probe (not reusable) :\$2–3 /one time	•Fluorescent Probe (not reusable) :\$2–3 /one time	•Glass pipette (not reusable) :\$5–11 /one time* ¹	•Multi-electrode culture chamber (reusable) :\$100–500 * ²

他の刺激や計測手法との比較を行うと、本研究で作製したデバイスは、ITO ガラスの透明性と導電性により、複数の細胞に刺激を与えつつ、それらを同時に観察できることがわかる。また、高い空間局所性を持っている(Figure 18)。細胞の活動計測は、 Ca^{2+} 指示薬である fluo-4 のようなプローブを用いた蛍光イメージングにより実現できる。これは、 Ca^{2+} 応答は早いため(5-50 m 秒)、単一スパイクを検出することができるからである(Cossart et al., 2005; Inoue et al., 2015; Michel et al., 2011; Smetters et al., 1999)。さらに、この系は比較的安価に作製することが可能である。

*¹ FIVEphoton Biochemicals <http://fivephoton.com/index.php?route=product/product&product_id=156>

*² Axinbiosystems <<http://www.axinbiosystems.com/>>

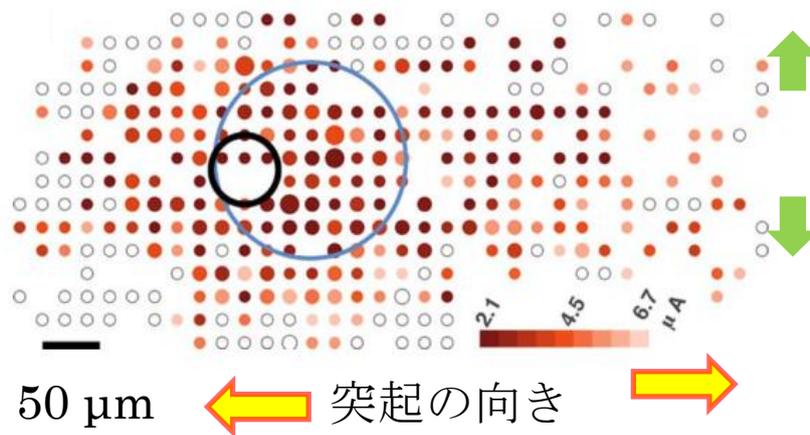
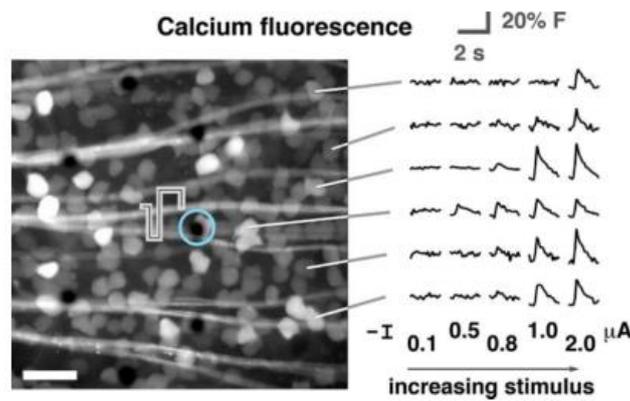
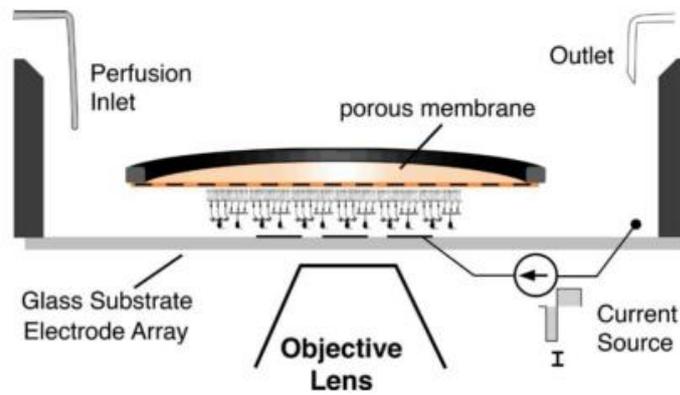


Figure 6 ITO ガラス上での網膜の細胞の電流刺激と応答観察
(Behrend et al., 2011)

- (上)透明電極の計測チャンバー上に網膜を置いた様子
- (中央)Oregon-Green-BAPTA-1-dextran による Ca^{2+} 蛍光イメージング
- (青円は電極, スケールバー 50 μm)
- (下)半径 60 μm の電極刺激による各領域の神経細胞の応答閾値

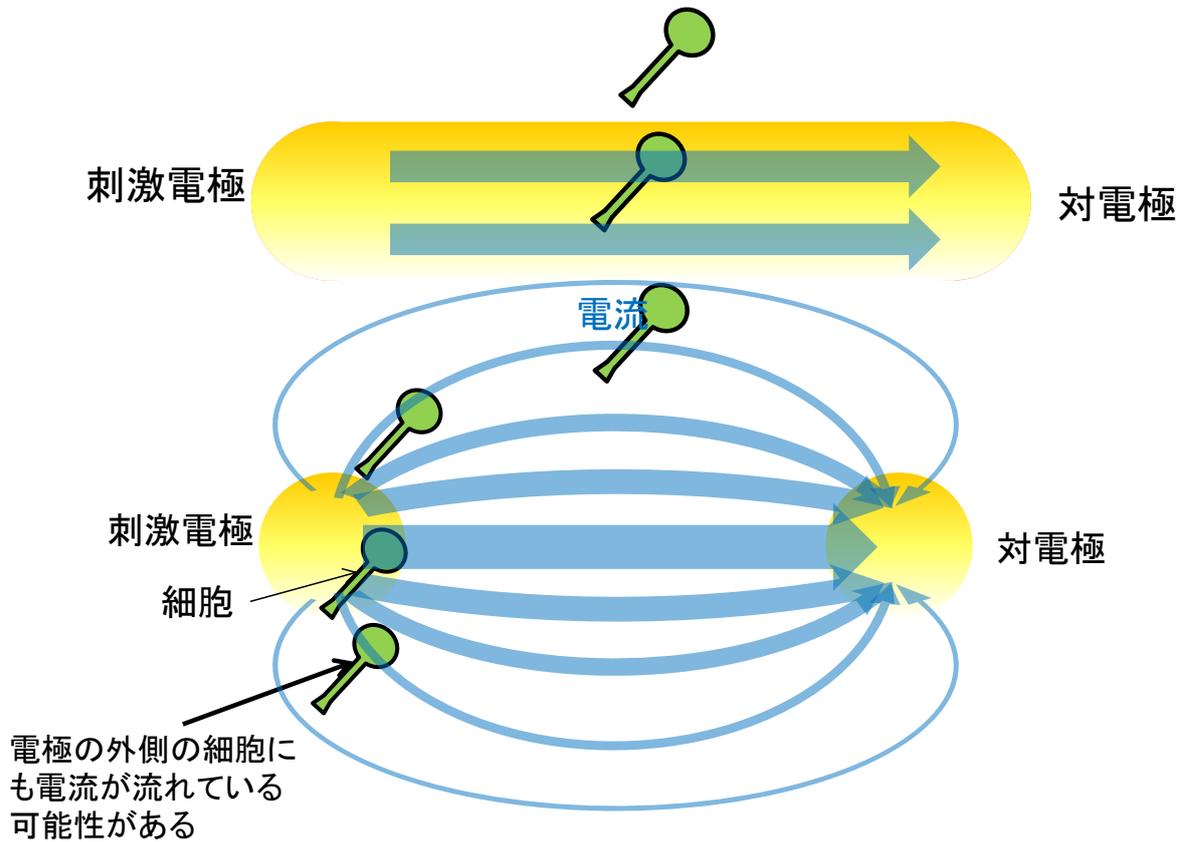


Figure 7 応答が拡がってしまう原因として考えられる理由

(上) 対電極を用いた場合の考えられる電流経路

(下) 細長い1つの直列の電極での電流

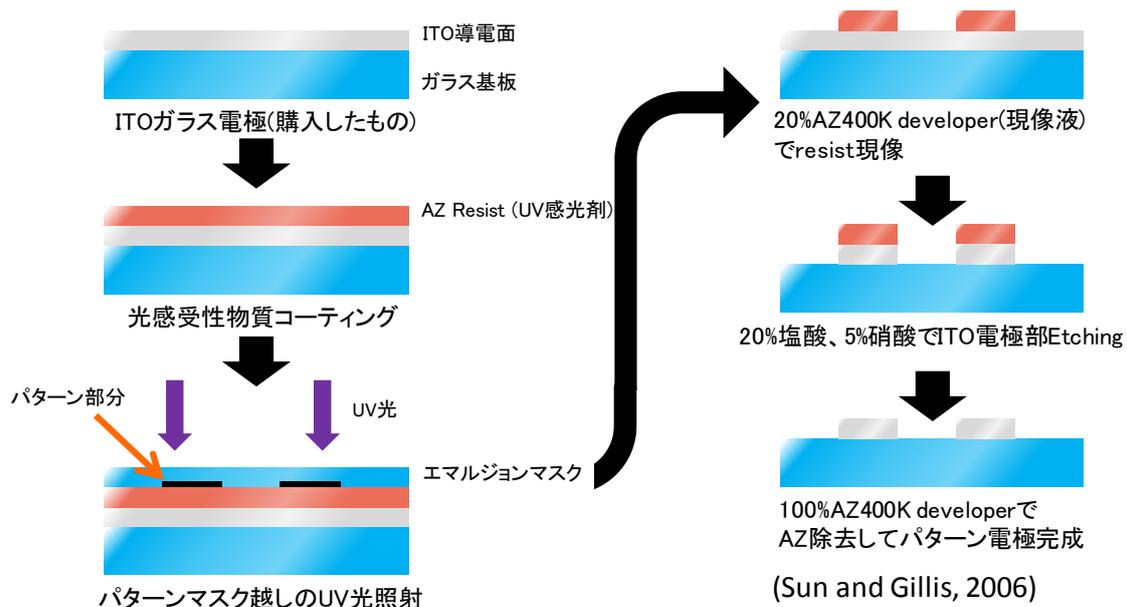


Figure 8 フォトリソグラフィーによる電極パターンの作製

パターンを描いたエマルジョンマスクを

- ① ITO ガラス電極の導電面の上に UV 感光剤である AZ Resist を塗布してスピンドクター (1500 rpm) でコーティングする。
- ② パターンを描いたエマルジョンマスクをその上から被せ、上から 350 nm の UV 光をあてる
- ③ 20%の AZ400Kdeveloper(現像液)で UV 光が当たった領域を腐食(AZ Resist を現像)させる
- ④ 20%の塩酸と 5%の硝酸で ITO 電極部をエッチングする
- ⑤ 100%の AZ400Kdeveloper によりパターンで残った AZ Resist を除去してパターン電極完成した

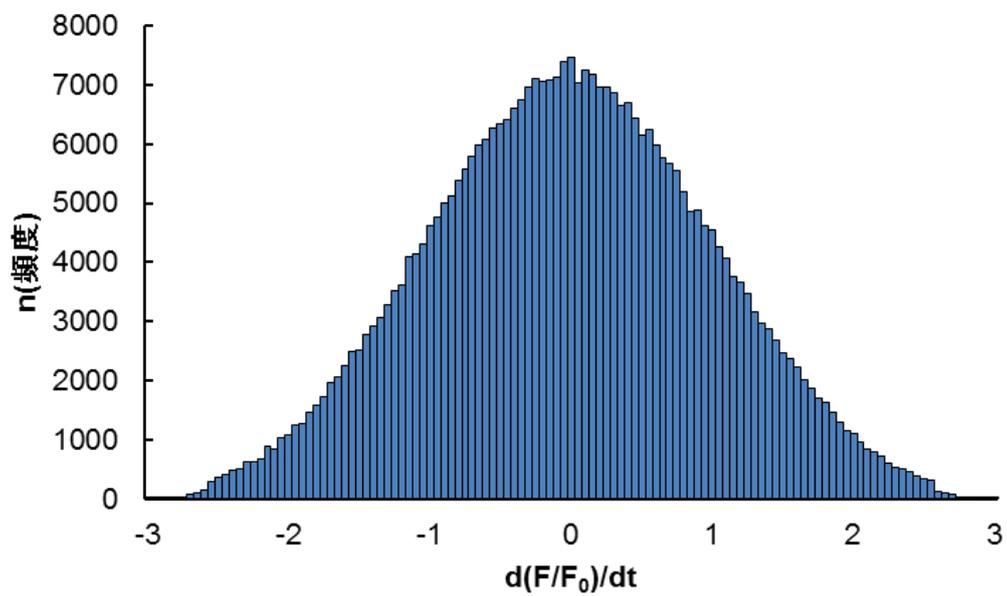
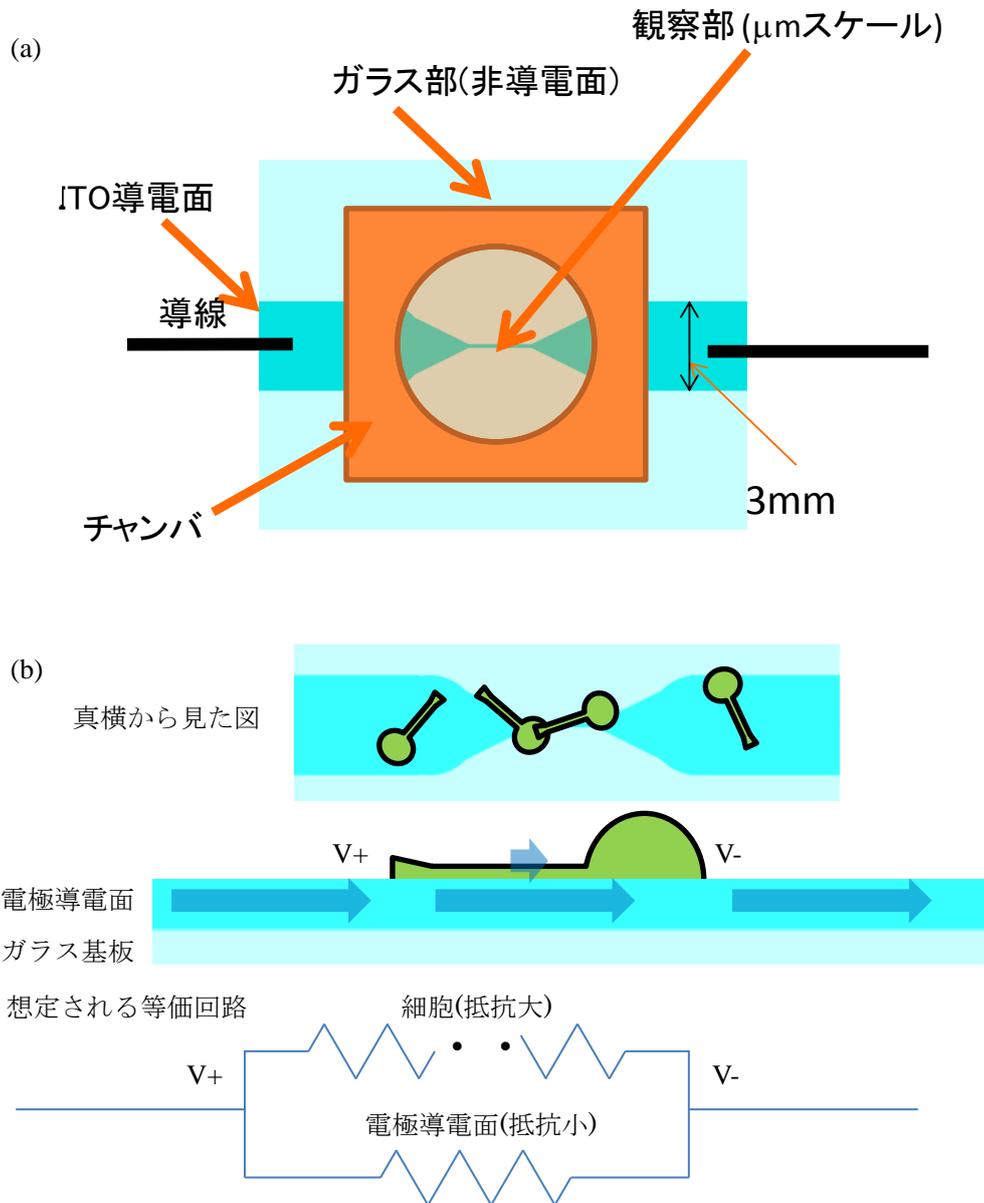


Figure 9 ノイズの蛍光変化率の分布

刺激を与えていない時間帯の時間変化率 $d(F/F_0)/dt$ を細胞ごとに標準偏差で規格化した上で累積したもの。ガウシアン分布ではないが、0 を中心として集積したような分布となった。



抵抗が圧倒的に大きい細胞側にも細胞外液内のイオン電流が僅かに流れるものと考えられる。これにより膜電位が発火の閾値を超えた時にカルシウムの流入が起こる。

Figure 10 対電極を用いずに応答細胞を誘起するより強い刺激を与えるための電極形状のパターニング

- (a) パターニングを行った ITO 電極上にチャンバーを作製し、細胞を培養しながら導線を繋いだ様子。導電面の中央の一部を狭めることで刺激強度を上げることを目指す。
 (b) 仮説として実際に細胞に電流が流れる様子を示したもの(上)と、その等価回路(下)。

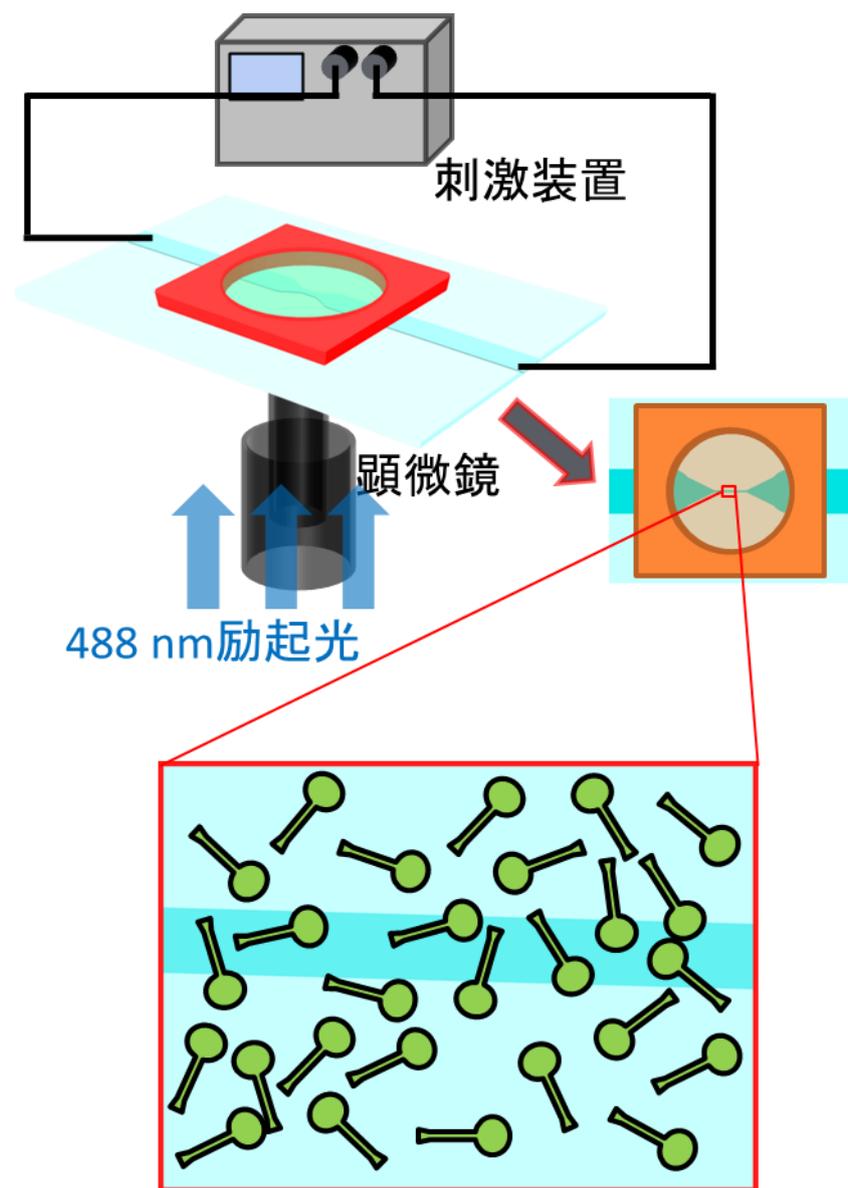


Figure 11 対電極なしの ITO ガラス電極を用いて刺激を与えながら蛍光観察を行うための実験系

対電極なしの ITO ガラス電極は電流刺激装置に接続されている。電極導電面付近の細胞の fluo-4 蛍光観察のため、488 nm の励起光を照射しながら倒立顕微鏡により下から観察する。

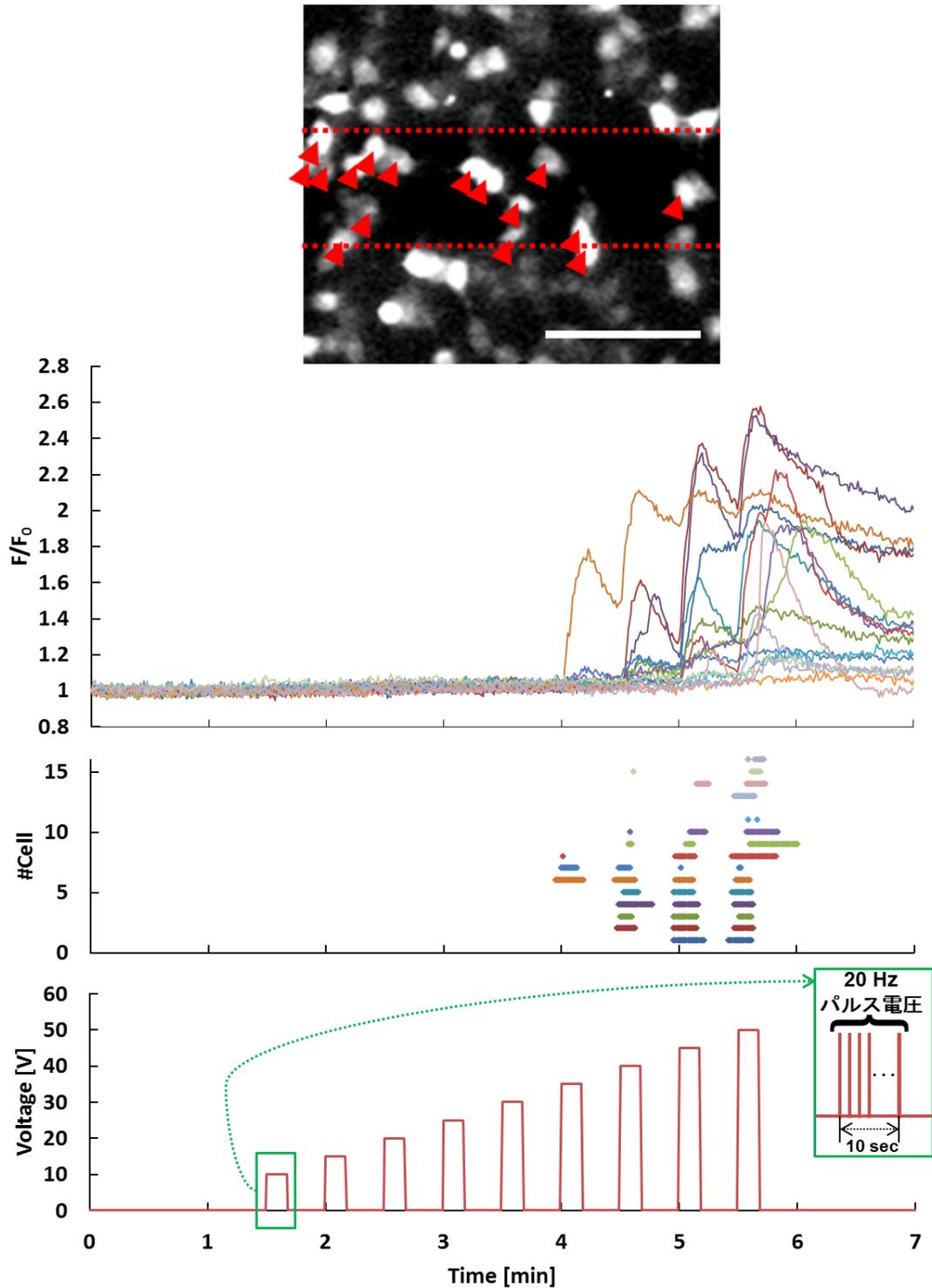


Figure 12 NGF 分化 PC12 細胞の蛍光画像と電流刺激に対する応答

(上)ITO ガラス電極上の NGF 分化 PC12 細胞の fluo-4 の蛍光、赤点線内が電極上、導電面の細い領域の長さ 0.2 mm、幅 0.1 mm、スケールバー 100 μm

(中央)画像の赤矢頭の PC12 細胞の Ca^{2+} 蛍光変化率 (中央上)、応答検出タイミングのラスタープロット、色は Ca^{2+} 蛍光変化率のものに対応している (中央下)

(下)このときの電圧刺激強度。10 秒間の 1 サイクルの刺激の間に 20 Hz の連続パルスを入力した

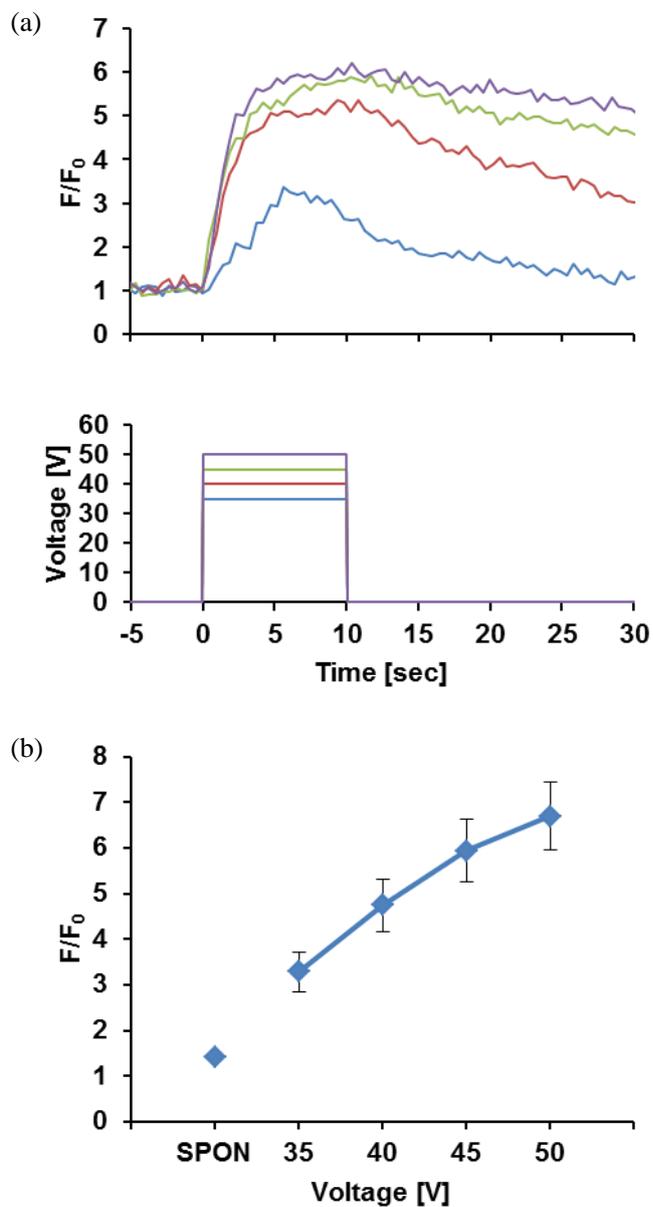


Figure 13 Ca^{2+} 応答の電圧依存性

- (a) ある単一の細胞での様々な電圧刺激(35-50V)に対する Ca^{2+} 応答の蛍光値の時間変化(上)と与えた電圧値(下)
- (b) Ca^{2+} 蛍光値振幅の増加率と印加電圧値の関係。自発活動による振幅も同様に比較した

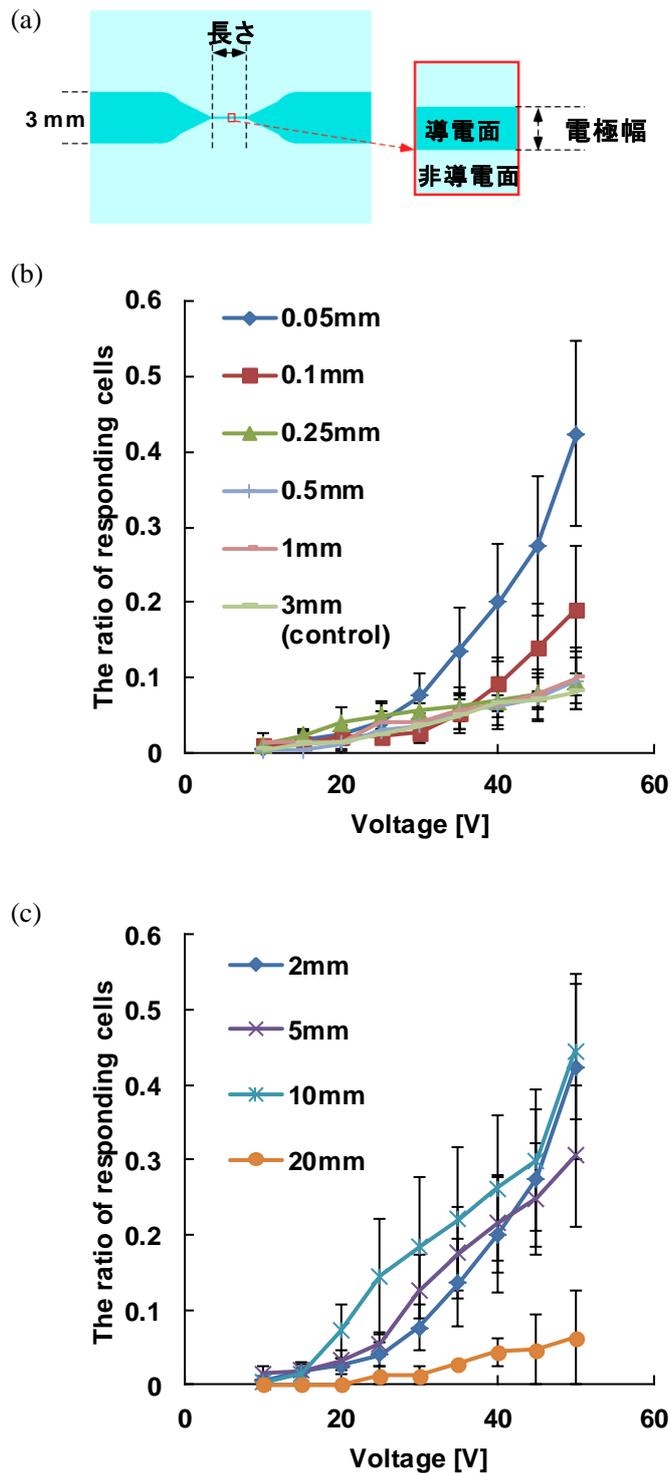


Figure 14 徐々に電圧強度を上げていった時の ITO ガラス電極上の累積応答細胞率変化
様々な幅(上)と長さ(下)の電極について

(a) 電極の幅と長さの説明図

(b) 電極の長さを 2 mm と固定し、幅を 0.05-3 mm で変化させた

(c) 電極の幅を 0.05 mm と固定し、幅を 2 から 20 mm で変化させた

エラーバーは SEM を表す

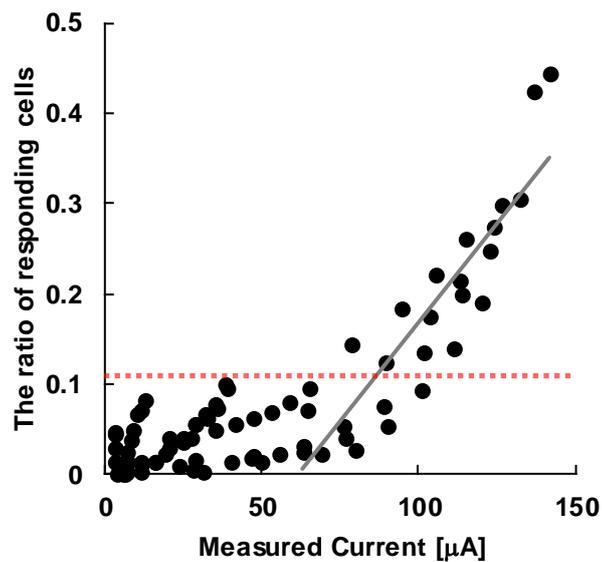


Figure 15 応答細胞数を電流値に依存してプロットしたもの

応答細胞率と Figure 14 でプロットされたデータを作成した際の平均計測電流値との関係。横軸は、Figure 14 の各プロットについてその基となったデータ間での計測電流値の平均値である。60 μA の刺激閾値以上の範囲のプロットでの線形近似を行った(灰色の直線)。この閾値以上の線形近似の決定係数は $R^2=0.8154$ となった。また、赤点線以下の領域は電流値に依存しない自発的な神経発火によるものと考えた領域。赤の楕円内は電流値に依存していると考えた。

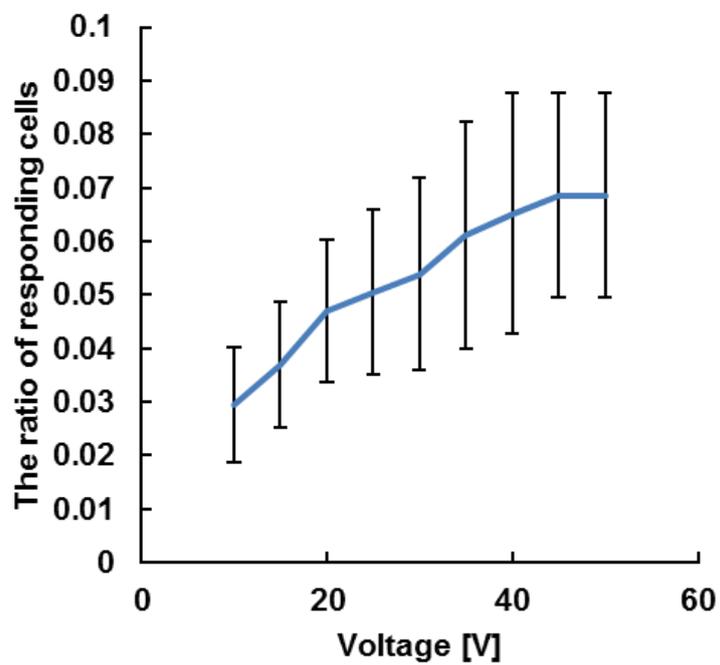
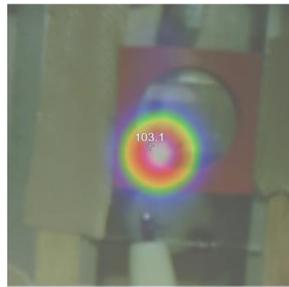


Figure 16 刺激を与えなかった場合の ITO ガラス電極上の PC12 細胞の応答細胞率変化

Figure 14 の実験で与えた各電圧値と、Figure 14 で各電圧値刺激を与えた時刻までの無刺激での応答細胞率の関係を見ている (N=3)



温度画像の一例(直流)



10 secの直流電流を流して温度が最も上昇する点を測定点とした

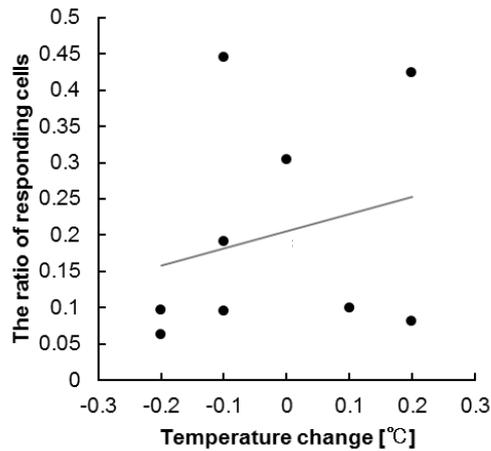
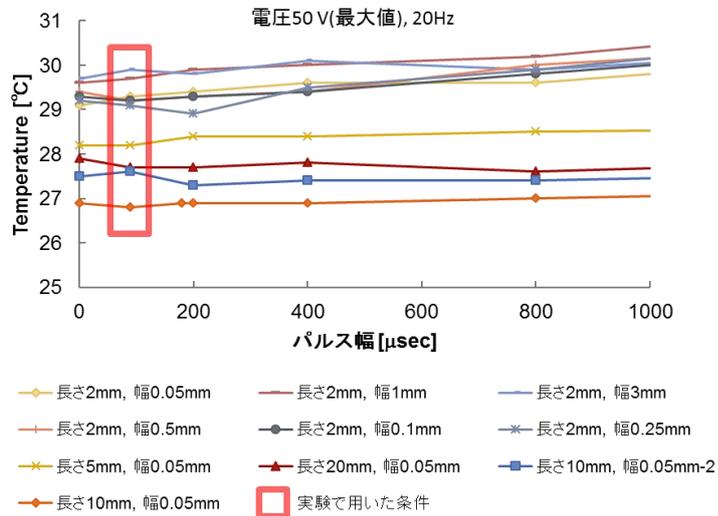


Figure 17 温度の刺激強度依存性の検討

温度計測画像の1例(上左)

各パラメータの電極でパルス幅を変えていった時の温度変化(上右)

本研究では 90 μ秒, 50V の刺激を用いた

電極パターンごとに 90 μ秒, 50V の刺激を与えた時(上の図の赤枠で囲われた条件)の温度変化と Figure 14 で求めた同じ条件での応答細胞率の値の関係(下)、灰色の直線で線形近似を行ったが相関は全く見られなかった($R^2=0.0585$)

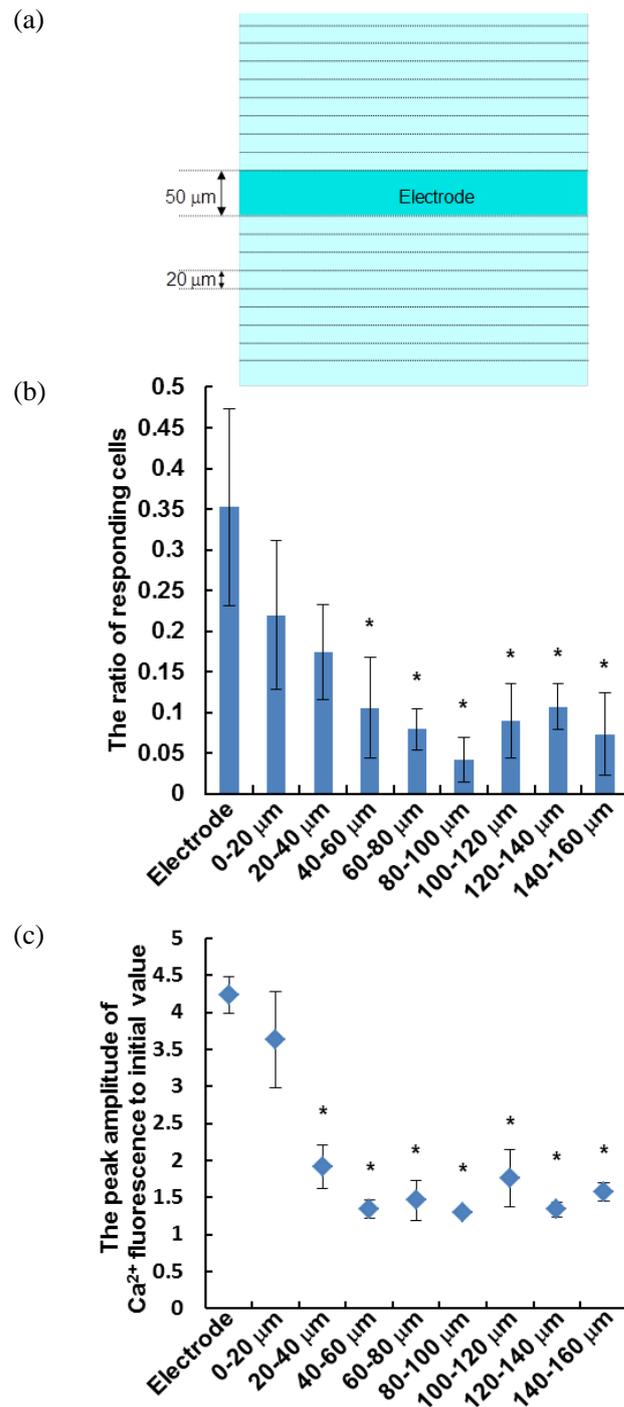


Figure 18 電極からの距離に応じた領域ごとの Ca^{2+} 応答率

(a) 電極からの距離により示された領域の模式図。それぞれの領域は電極の幅方向に 20 μm の幅をもつ

(b) 電極上と電極外の応答細胞率(サンプル数 N=8)。

(c) 電極上と電極外の Ca^{2+} 応答の振幅

”Electrode”は電極上で”X-Y μm ”は電極から X-Y μm の範囲で離れた領域。エラーバーは SEM、*は Dunnet 検定で P<0.05 を示す。

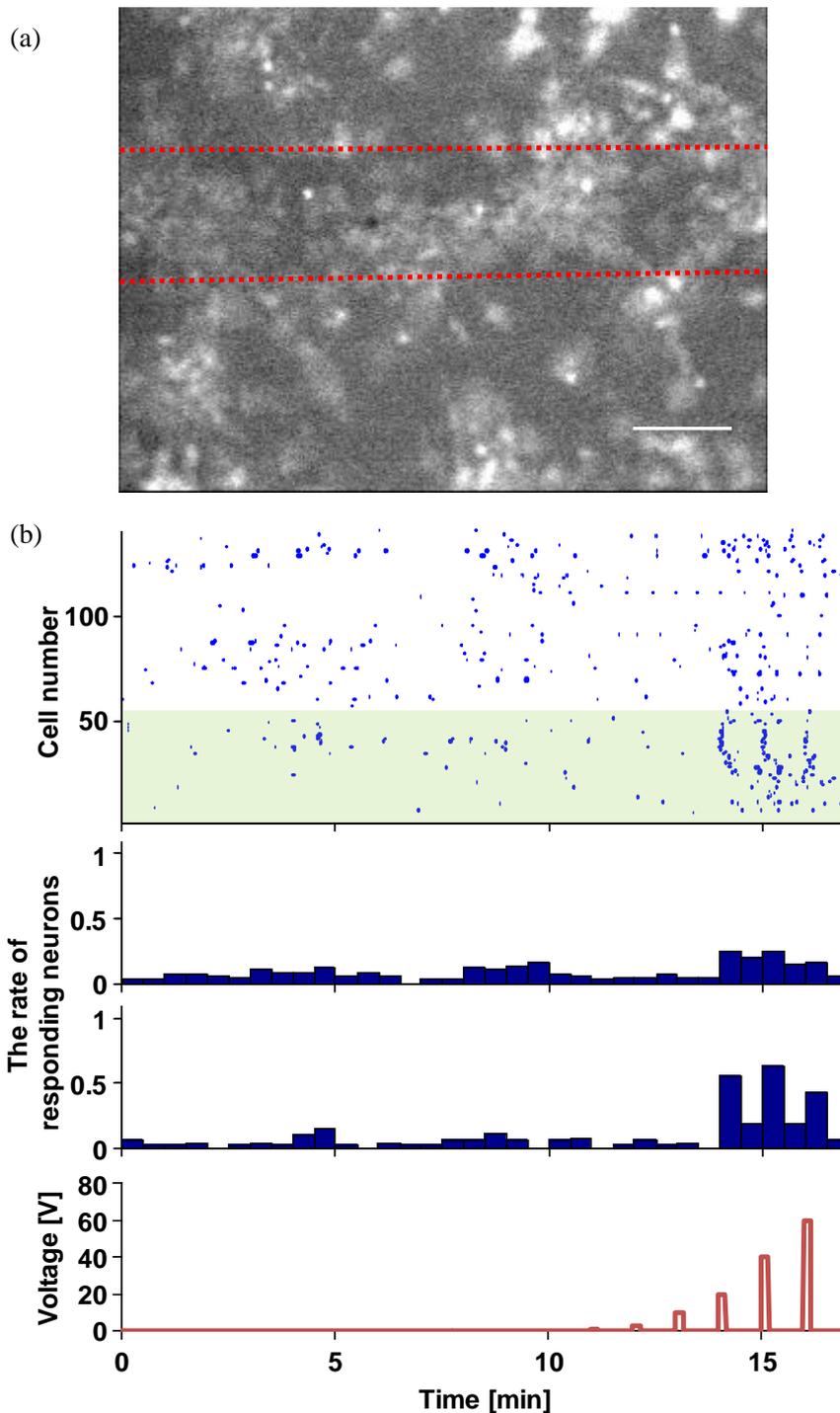


Figure 19 パターン ITO ガラス電極の海馬神経細胞への適用

- (a) ITO ガラス電極上の海馬神経細胞の fluo-4 蛍光イメージングの例。赤点線で挟まれた領域が電極上。スケールバーは 100 μm 。
- (b) (a)の画像中の電極上(陰の内部)と電極外(それ以外)にある神経細胞についての Ca^{2+} 応答の開始点を表すラスタプロット(1 段目)。電極上(3 段目)と電極外(2 段目)についての刺激開始後の各 30 秒間での応答細胞率のヒストグラム。このときの刺激電圧強度(最下段)。

第3章 Scatchard と Hill プロットによるラットの短期長期培養海馬神経細胞での網羅的なシナプス接続の定性的定量的推定

3.1 はじめに

複雑な神経ネットワークは神経細胞とシナプス接続の成熟によって形成されていく。神経ネットワークの挙動を知るために、微細構造をもつデバイス上での *in-vitro* 単一層分散培養系が用いられてきた(Berdondini et al., 2009; Erickson et al., 2008; Nam et al., 2006; Stetter et al., 2012)。このような *in-vitro* 神経ネットワークは *in-vivo* の多くの形態的、薬理的、電気生理学的な特徴を維持しており、分子、細胞、ネットワークレベルでより詳細な観察や操作が可能である(Colombi et al., 2013; Grigoryan and Segal, 2013; Hogberg et al., 2011; Kang et al., 2009; Klueva et al., 2012, 2008; Millet et al., 2010; Suzuki and Yasuda, 2007; Wagenaar et al., 2005; Wierenga et al., 2006)。さらに、*in-vitro* の神経培養は神経ネットワークの成熟過程のシナプス接続を詳細に調べることができる(Chiappalone et al., 2006; Klueva et al., 2008; Nakamichi and Yoneda, 2006)。

ネットワーク内の神経細胞間での機能的なシナプス接続は、特定の神経細胞に刺激を与えることにより生じた同期的な応答により評価されてきた(Bernardinelli et al., 2011; Cohen et al., 2008; Wagenaar et al., 2005)。また多くの神経細胞の同時計測のため、光学技術が使われてきた(Bernardinelli et al., 2011; Cohen et al., 2008; Cossart et al., 2005; Grigoryan and Segal, 2013; Takayama et al., 2009a)。これらはネットワークにおける神経細胞の自発的な活動を観察する技術としては有力な方法であるが、特定の神経細胞への刺激によるネットワーク全体の挙動については十分には調べられてこなかった。これは、単一細胞に対する刺激による系全体への寄与は、この細胞から投射している投射先の神経細胞の密度によるからである(Cohen et al., 2008)。神経細胞間の接続関係を定量的に評価するために、多くの細胞に同時に刺激を与えながら、それらの活動を光学的に計測することが必要となる。これを達成するために、電流刺激を行いつつそれによって生じる神経活動を Ca^{2+} 蛍光イメージングにより可視化することが可能な透明な酸化インジウム(ITO)ガラス電極を用いた実験系を開発した((Tanamoto et al., 2015)、前章)。また、海馬の神経細胞内での Ca^{2+} と Mg^{2+} の動態を同時に調べた(Yamanaka et al., 2015)。

本章では、ITO 電極を用いた実験系を用いることにより、シナプス接続の成熟の仕方をラット海馬の神経細胞内で詳細に調べた。また、ITO 電極の定量的電流刺激による応答細胞率累積値がどのように増加するのかを解析した。これについて、Scatchard (Scatchard, 1949) と Hill (Hill, 1910) によって提案された手法を利用して、新たな解析手法を用いて神経細胞の接

続の様子と協同性について評価することに成功した。

3.2 神経ネットワークを形成する海馬神経細胞の培養日数に応じた自発発火の変化

神経細胞は培養日数に応じて自発発火の頻度が変わってくることが知られている。まず、1-2 週間の間で長いバーストが起り始め、2-3 週間でバーストの長さは短くなりつつ頻度は上がる(Chiappalone et al., 2006, Figure 20)。このように、培養日数に応じて海馬の神経細胞での自発発火率は変化することは知られているが、自発発火率が上昇しつつある段階での神経細胞の接続関係、応答を詳しく観察している先行研究例はあまりない。

本研究では長期培養によるネットワーク構成の変化を調べるために、以下の順に調べた。

- ① 定量的な電流刺激による培養日数に応じた細胞応答率変化の観察
- ② 長期培養の細胞に対して電流刺激強度を段階的に上昇させることによる細胞応答と接続関係の調査
- ③ 興奮性伝達物質グルタミン酸の細胞応答率への寄与についての検討

3.3 方法

3.3.1 電極のパターニングのためのフォトマスクの設計と製造

フォトマスクの設計と製造は、第 2 章 2.3.1 で述べた手法を用いた。具体的にはベクトルベースの描画ソフト Canvas Version 11 でパターン設計後、OHP フィルムに印刷、縮小投影露光装置でマスクに照射投影、暗室内で現像液と定着液に浸した。

3.3.2 ITO 電極の導電面のエッチング

任意の電極パターンを作製するための ITO 電極の導電面のエッチングは、第 2 章 2.3.2 で述べたようにフォトリソグラフィにより、以下の手順で行った。

- ① ITO ガラススライドの導電面上に AZP4210 ポジティブフォトレジストを塗布
- ② 1500 rpm でスピコート
- ③ 100°C で 2 min ベーク
- ④ それぞれのパターンのフォトマスクを介して UV 光照射
- ⑤ 20% AZ400K デベロッパー溶液で現像
- ⑥ 5% HNO₃ と 20% HCl でエッチング
- ⑦ 100% AZ400K デベロッパー溶液でレジスト除去
- ⑧ アセトンですすいで乾燥

3.3.3 海馬神経細胞の初代培養

全ての動物実験に関する規定は慶應義塾大学の倫理委員会によって許可されている(許可番号: 09106-(1))。

海馬神経細胞の初代培養のため、Wistar ラット(Charles River Laboratories Japan, Tokyo,

Japan)の胎児 18 から 19 日後から海馬を採取した。海馬神経細胞を氷冷の PBS で切除し、分散溶液 kit (Sumitomo Bakelate, Tokyo, Japan)で 37°Cで 30 分間の分散を行った。貼り付け型のチャンバーである Press-to-Seal silicone isolators を 6 枚貼りつけた。このとき長期培養を行う関係で培地が蒸発して枯渇してしまう事を防ぐために、培地を多めにした。PC12 細胞では細胞接着因子として Cellmatrix Type I-C を用いたが、神経細胞では poly-D-lysine (PDL, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)でパターン ITO ガラス上のチャンバー内をコートした。初代神経細胞用の培養液である neurobasal medium に B-27、2 mM L-グルタミン酸、50U/mL ペニシリン及び 50 µg/mL ストレプトマイシンを添加した培地内で神経細胞を分散し、 40×10^4 cells/mL に調製した細胞懸濁液 1mL をチャンバー内に注いだ。神経細胞は実験で用いるまでの 1-4 週間、37°C、5%CO₂ のインキュベータ (ESPEC, BNA-111, Osaka, Japan)内で培養した。

3.3.4 Ca²⁺応答観察のための蛍光色素

Ca²⁺の応答を観察するために、第 2 章 2.3.4 で述べたように蛍光色素 fluo-4 を用いて細胞を染色した。

3.3.5 fluo-4 の蛍光計測

第 2 章 2.3.5 と同様に、蛍光イメージングを行うために蛍光顕微鏡 ECLIPSE TE300 を用いた。10 倍の対物レンズ、505 nm のダイクロイックミラー、535/55-nm のバリアーフィルターをそれぞれ装着し、Xe ランプからの 488 nm の光で fluo-4 を励起した。このときの蛍光を CCD カメラで取得後、解析ソフト Aquacosmos で細胞ごとに ROI で囲って平均蛍光値を計算した。

3.3.6 電流刺激と電流計測

第 2 章の PC12 細胞の時と同様に、電流刺激を電気刺激装置 (SEN-8203, NIHON KOHDEN, Tokyo, Japan)を用いて与えた。本実験では、アイソレータ (SS-403J, NIHON KOHDEN)を介して行った。細胞入りチャンバーと直列につないで回路をつくり、電流刺激を与えた。刺激を与える際に用いた条件を表 5 のようにまとめた。

この設定条件では、1 サイクルでそれぞれの電圧値の周波数 62.5Hz の刺激を 10 秒間与え、この刺激が 30 秒に 1 サイクルとなるようにした。周波数は神経細胞のバーストの発火の仕方から決めた。なお電圧値は単パルスの振幅を表す。

また、ITO 電極を流れる電流の計測には、デジタルマルチメータ (CDM-2000D, CUSTOM, Tokyo, Japan)を用い、刺激装置と細胞が接着しているパターン ITO 電極を含んだ回路と直列に接続して測定した。このときデジタルマルチメータを交流計測用の ACA モードにセットした。

3.3.7 計算と解析のためのソフトウェア、計算手法

細胞が応答を示したタイミングを Ca²⁺蛍光値変化を基に検出するために、時間微分値 (d(F/F₀)/dt)を計算後、0-1 min の蛍光をノイズと考えその標準偏差 SD を求め、刺激を与え始めてから蛍光の上昇が $2.58 \times SD$ を超えたタイミングを応答とした。

3.4 結果

3.4.1 海馬神経細胞に対する電流刺激によるカルシウム応答

前章より、中央を細くした ITO ガラス電極(Figure 10(a))は対電極を用いることなく海馬の神経細胞に刺激を与えることができることがわかったので、海馬神経細胞の興奮性を Ca^{2+} の挙動として観察した。

本章では、この系で電極パラメータを Figure 21(a)のように決め、神経ネットワーク内の多くの細胞 (この例では Figure 21(b))に段階的に電流刺激強度を増加させて印加することにより、海馬神経細胞の応答を調べた。いくつかの細胞では比較的弱い刺激でも大きな Ca^{2+} 応答を示し、その後、電流刺激の ON/OFF に同期的な Ca^{2+} 応答を示したが、中には、初めて応答を示すまでより強い電流刺激が必要なものも見られた(Figure 21(c))。これらの結果より、ITO デバイスは多くの神経細胞に同時に非侵襲的に刺激を与えつつ、かつ、 Ca^{2+} 応答を、ITO ガラスを通して観察できることがわかった。

このように、海馬の神経細胞は様々な応答を示す細胞が観察された。

3.4.2 培養日数による神経細胞の電流刺激への応答性

前節で海馬の神経細胞も電流刺激に対して応答を示すことが示された。電流刺激に対する神経の応答性は神経の成熟度に応じてどのように変化するかを調べた。刺激に対する神経の応答性は、培養日数に応じて増加することが知られている(Nakamichi and Yoneda, 2006)。また、成熟した神経ネットワークの形成や、細胞膜上への興奮性イオンチャネルの適正な分布には 2 から 3 週間ほどかかる(Chiappalone et al., 2006)。そこで、ITO ガラス電極による電流刺激による応答した細胞の数の割合を、培養日数が長いもの(17days *in-vitro* (DIV)以上)と短いもの(17DIV 未満)で比較した。この割合は、電極上の細胞で fluo-4 により染色されている細胞のうち、応答した細胞数の割合を意味する。その結果、培養日数が長いものの方が刺激に対してよく応答した(Figure 22(a), $P < 0.05$)。また刺激強度を徐々に上昇させた時の累積応答細胞率をいくつかの代表的なサンプルについて示したところ、培養日数が長いものは、弱い刺激でも急激に上昇する一方、培養日数が短いものは緩やかに上昇し低い値で飽和した(Figure 22(b))。さらに、17DIV 以上では、神経細胞は 2 つの典型的な応答パターンを示した。1 つは、飽和型(橙色)に、もう一方は S 字型(赤)に飽和した。S 字型の飽和曲線では、応答細胞数の急激な上昇が見られた。この現象は、ネットワークの中の神経細胞の協同的な活動によるもの、すなわち、ある細胞の応答が接続している他の神経細胞の興奮を増加させているものと考えられる。この仮説をより詳細に検討するために、S 字型と飽和型の応答を示したサンプルの代表例に対して、それぞれ Scatchard プロットを適用した(Figure 22(c), (d))。このプロットは、応答した細胞の割合と、この割合を電流値で割った商との関係を出したものである。生化学の分野において、酵素に対する基質の結合が正の協同性を示す状況においては、上に凸の Scatchard プロットを示すことが広く知られている(Bordbar et al., 1996)。今回の結果はそれぞれ S 字型と飽和型の典型的なプロットを示しており、S 字型

の形状は一般的に高い正の協同性を意味する。この S 字型の上昇を示したサンプルについて、神経細胞の応答は時間経過に応じてどのように起きているかを調べるため、刺激を与え始めてからどの位置にいる細胞がどのタイミングで応答を始めたかを調べた。典型的な S 字型プロットのある急激な上昇点(Figure 22(b)の緑矢印)について、刺激開始からの Ca^{2+} の蛍光値変化率をヒートマップにより表した(Figure 23(a))。10 秒間の刺激を与えている途中では局所での Ca^{2+} 応答が引き起こされるが(Figure 23(a)左, 刺激開始後 5 秒後)、刺激を止めてから時間が経過するとその範囲は広がった(Figure 23(a)右, 刺激終了後 20 秒後)。このことから、協同性を示すサンプルでの応答細胞率の急激な上昇は、時間遅れを伴ってある細胞が他の細胞を活性化することにより起こると考えられる。そこで、それぞれ S 字型と飽和型のプロットを示したサンプル内で、応答している細胞群が接続している細胞をどれ程活性化しているかを調べるため、これらのサンプルでの全ての応答イベントについて、刺激開始からの遅れ時間を求めてヒストグラムを作成した(Figure 23(c), (d))。S 字型の応答を示すネットワークにおいては、刺激開始からの Ca^{2+} 応答の遅れ時間は広く分布した。ここで観察されている Ca^{2+} 応答は単一の神経細胞のスパイクによるものではなく、おそらくバースト状の活動によって引き起こされているものと考えられるので、シナプス接続を介しての伝播は活動電位のそれに比べて遅いものと考えられる。Scatchard プロットとヒストグラムの遅れを、培養日数が 17DIV 未満のサンプルについても同様に求めた。Scatchard プロットは線形で数秒の遅れを持った応答の割合は、飽和型の結果よりもさらに小さかった(Figure 22(e), Figure 23(d))。これらの結果は、培養日数が短いサンプルのネットワークは、低い協同性を持つことを示す。

このとき、S 字型と飽和型の分類について、Scatchard プロットで上に凸になるものを S 字型、直線になるものを飽和型として分類しているが、中には上に凸なものでもその放物線の左側に存在するプロットの値が 0 のものだけのものも存在しており、これらは飽和型とした。この理由は以下のように考えられる。まず一般的な生化学の分野における酵素反応の変化は、濃度などの外部の条件に対して連続的なものであるため、わずかな濃度変化による酵素反応の小さな変化も S 字型グラフや Scatchard プロットに反映される。一方、本研究で扱っている応答細胞率は、1 細胞レベルで応答有無だけの識別から行っている、すなわち離散的な結果となる。このため、小さな刺激でも細胞は何らかの形で応答しているが、本研究の応答検出のやり方ではそれらを捉えることができていないために、小さな刺激による応答細胞数が 0 であり縦軸の値が 0 となっている可能性は高い。よって、Scatchard プロットの上に凸の曲線の左側のプロットが 0 のものだけのものについても、このプロットは飽和型として扱った。実際に遅れ時間の比較を行った結果、S 字型と飽和型のサンプルで、刺激に対する細胞の遅れ時間を求めた結果、飽和型に比べて S 字型のもの遅れが大きかったため、妥当な分類と考えた。

3.4.3 グルタミン酸受容体のアンタゴニストによる神経活動の抑制

培養日数が長いサンプルのネットワークの高い協同性は、密集したシナプス接続によるも

のであると考えられる。私は、神経細胞同士のネットワーク接続として化学シナプスによる接続に着目し、さらに海馬の神経細胞の代表的な興奮性シナプス伝達物質として、グルタミン酸が関わっていると考えた。これを直接示すために、代表的なグルタミン酸受容体をその選択的なアンタゴニストにより阻害した。具体的な阻害剤として、*N*-methyl-D-aspartate (NMDA)タイプ受容体を最終濃度 200 μM の D,L-2-amino-5-phosphono-valerate (AP5, TOCRIS, Bristol, UK)で、また α -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid (AMPA)タイプ受容体を最終濃度 10 μM の 6-cyano-7-nitroquinoxaline-2,3-dione (CNQX, Sigma-Aldrich)を用いた。

実験は以下の手順で行った。

- ①アンタゴニストを加える前の control の条件下で、刺激強度を段階的に上げていき、画像上である程度応答が拡がりを見せたといえるところで刺激を一度止める。
- ②CNQX と AP5 を加えて 10 分間の間隔を置いた後、刺激を止めた時の最大の刺激を再び与える。この時 3 回ずつの刺激を 2 サイクル与えた。
- ③阻害剤を加えた条件下で刺激強度を再び段階的に上げた。

この一連のプロセスの中で、このアンタゴニスト混合物により一度は活動を抑制されたが、より強い電流刺激を与えることにより応答を再開する神経細胞がいくつか見られた。すなわち、①のどこかで一度応答し、②では 2 サイクルの両方での応答が見られないが、③で強度を上げることでどこかで応答した細胞である (Figure 24)。これらの神経細胞について、アンタゴニストを加える前後で Ca^{2+} 応答を引き起こした最小の電流値を比較した (Figure 25(a))。これらの神経細胞においては、刺激開始に対する遅れ時間をもつ応答の割合は、グルタミン酸受容体の抑制により小さくなった (Figure 25(b))。これはおそらく神経細胞間での協同性が弱くなったことによると考えられる。グルタミン酸シナプスの阻害前では神経細胞の接続により遅れた Ca^{2+} 応答を示した神経細胞が見られたが、阻害後にはこれらの神経細胞はより強い電流刺激により直接的に活性化されたものと思われる。

協同性の変化を解析するために、ある代表的なサンプルについて、阻害剤を加える前の control の条件と加えた後の antagonist の条件それぞれにおける Scatchard プロットを求めた。Control の条件下では Scatchard プロットは上に凸となったが、阻害条件では線形となった (Figure 25(c))。これより、グルタミン酸シナプスの阻害により協同性は失われることが示された。さらに、これをより詳しく解析するため、Hill 式

$$y = \frac{n (K[S])^n}{1 + n (K[S])^n}$$

を適用した。ここで n は Hill 定数、 K は結合定数、 $[S]$ は生化学においては基質の濃度を示す (Hill, 1910)。本研究では control と阻害条件の間での協同性を比較するために、Hill 係数 n をこれらの条件それぞれについて計算した。式の定義より、各パラメータを本研究のものに置き換えると、Hill 係数 n の値は Figure 22(b) のグラフでは急激な上昇の傾きを表すパラ

メータであり、この値が協同性、すなわちある細胞が応答することにより、その細胞を含む局所ネットワーク内の細胞のうち、同時に応答を引き起こされた平均細胞数を定量的に表しているものと考えられる。一方で、 K は応答細胞率が 50% になる電流強度の値である。Hill 係数 n は全てのサンプルについて control の条件での値の方が阻害剤を加えたあとのそれに比べ大きくなった。またいくつかのサンプルにおいて、阻害剤条件下では $n < 1$ となった(Figure 25(d))。先行研究より、 $n < 1$ は反協同的(生化学の分野では、ある結合が起こること、それ以外の結合の起こりにくくなる)であると言われている(Bordbar et al., 1996)。このことは、阻害剤の条件下では、GABA 作動性シナプスが優位に残り、ある細胞の応答による周囲の細胞の応答の起こりやすさが負に促進されるようになったためかもしれない。

3.5 本章のまとめ

本研究では、海馬の分散培養系ネットワーク内の互いに接続し合う神経細胞間での協同的な応答について記述した。前節で開発した ITO 電極デバイスを適用することで、培養日数の関数としてネットワークの協同性を評価した。17DIV 以上の長期培養を行ったサンプルでは、17DIV 未満の短期培養の結果に比べて応答細胞率は増大した。また、電流刺激に対する累積応答細胞率グラフの結果から、飽和型の応答だけでなく S 字型に反応するサンプルもあり、その応答特性を Scatchard プロットで示すとそれらを反映するような結果が得られた。一方で短期培養の結果は Scatchard プロットでは直線となり飽和型の結果を示した。刺激に対する応答までの時間が大きい応答の割合は、S 字型のものが最も大きかった(Figure 23)。次にグルタミン酸のシナプスの協同性に対する影響を評価した。グルタミン酸受容体の阻害剤を加えることにより一時的に反応しなくなる神経細胞に着目すると、阻害剤により反応の遅れの割合は小さくなり、また累積応答細胞率プロットの Scatchard プロットの形状は S 字型のものから飽和型に移行した(Figure 25)。

本研究では神経細胞の活動が培養日数に応じて急激に変化することを ITO ガラスの電流刺激による Ca^{2+} 応答により示した。培養日数が短いサンプルにおいては電流刺激強度を上げても僅かな反応しか見られなかった。このことは、個々の細胞が刺激に対する感受性が低いか、シナプス接続の密度が低く、弱いことを示唆しているものと考えられる。培養日数が長い神経細胞においては、神経ネットワークはその構成と成分を変えるとされている。すなわち、シナプス接続の密度が高くなり、神経突起の投射先となる細胞数が大きくなる、あるいは個々の神経細胞についても高い感受性あるいは低い閾値を持つようになると言われている。例えば、自発発火についてのこれまでの研究においては、ネットワーク系の大きさや(Bonifazi et al., 2013; Cohen et al., 2008; Shein Idelson et al., 2010)培養日数(Mukai et al., 2003)に応じて、自発的なスパイクやバーストの頻度あるいはスパイク間隔(inter-spike-interval, ISI)のような発火の特性が急激に変化することが報告されてきた。加えて、この現象は膜電位依存性の Na^{+} や K^{+} イオンチャネルやシナプス(Brewer et al., 2009; Schock et al., 2012)、シナプス小胞輸送体(Ito et al., 2013; Schock et al., 2012)の密度変化による

ものと考えられている。一方で、*in-vitro* で3週間を過ぎると、発火率は徐々に減少しつつある決まったリズムの発火のパターンに定着する。その原因は、ネットワーク内部構造の再構成において興奮性と抑制性のシナプスの個数を調整しているからであると考えられている(Chiappalone et al., 2006)。今回の解析結果はネットワーク特性におけるこれらの変化を上手く反映しているものであると考えることができる(Figure 22(c), (d), (e))。さらに、培養日数が長いネットワークにおいて、グルタミン酸シナプスの抑制により協同性の変化が示された(Figure 25(c))。ここで提起された解析は、神経ネットワークの特性を評価する上で、有力なツールとなるであろう。

本研究で用いたITOガラス電極と Ca^{2+} イメージング技術を組み合わせた系は、定量的な電流刺激を与えつつ、時空間的な神経活動の解析が可能であるという利点があることから、脳・神経系における神経ネットワークの成熟や協同現象を理解するための有力なツールとなることであろう。

表 5 電流刺激条件(海馬細胞)

デュレーション(本実験ではこの値が変化)	40-1500 μ 秒
刺激間インターバル	16 m 秒
トレイン(1 サイクルのパルス回数)	625 回
電圧(本研究ではこの値を変化させた)	10V

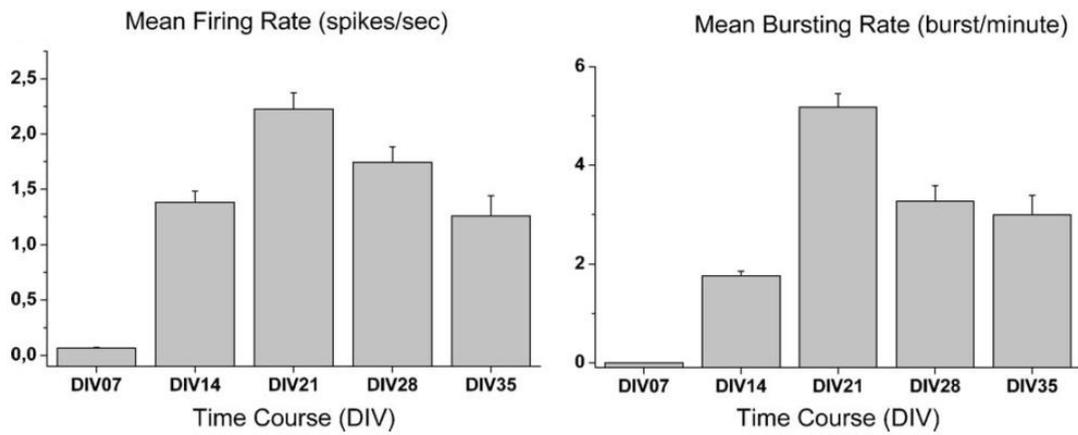


Figure 20 培養日数に応じた自発発火とバーストの頻度([Chiappalone et al., 2006](#))

培養日数に応じた平均自発発火率(mean firing rate, MFR, spikes/s, 左)と平均バースト率(mean bursting rate, MBR, burst/min, 右)

平均値と SEM で表されている

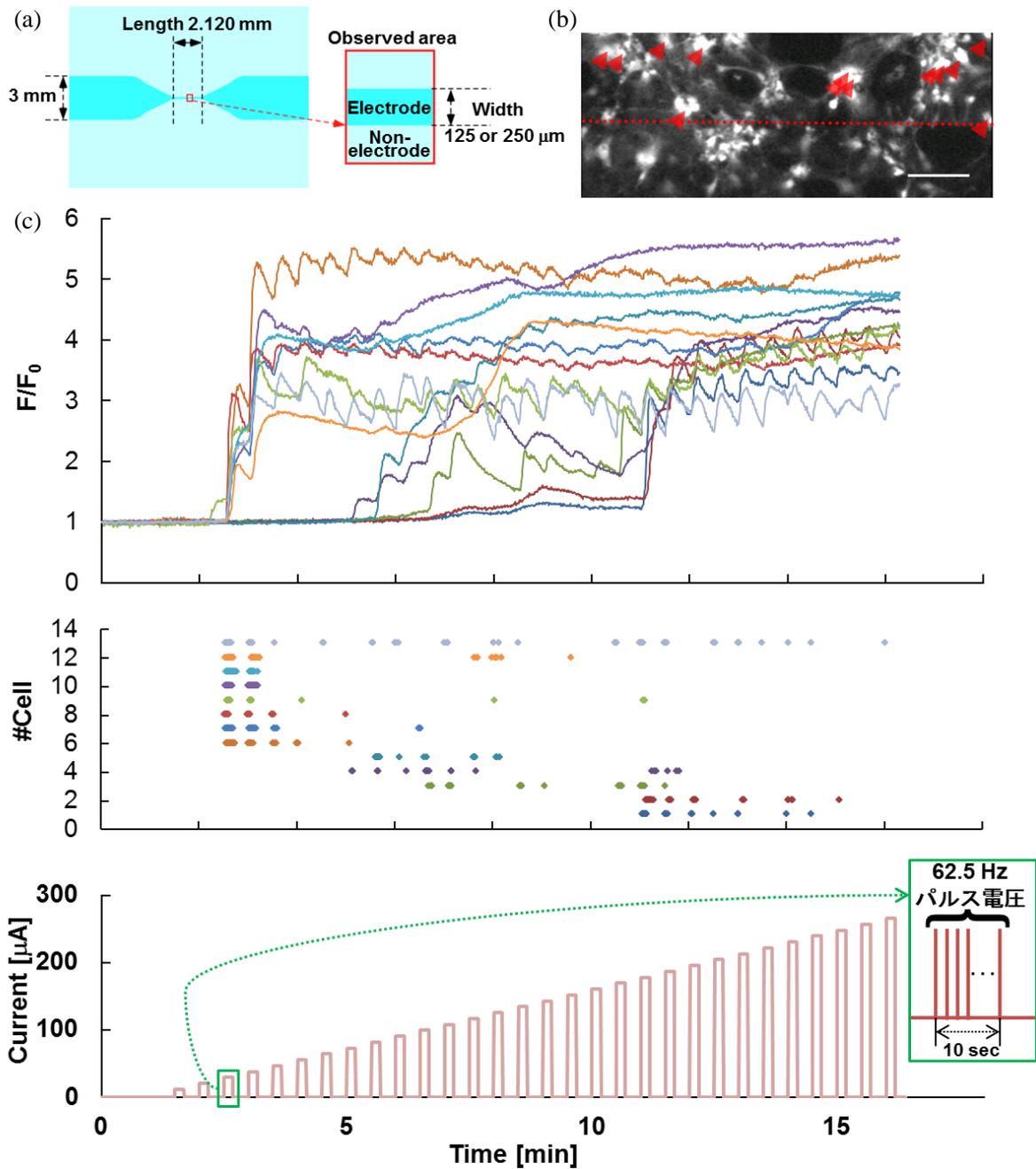


Figure 21 海馬神経細胞に対する ITO ガラス電極を用いた電流刺激と Ca²⁺ 応答観察

(a) フォトエッチングによって作製されたパターン ITO ガラス電極デバイス。観察領域での局所電流密度を上げつつ、対電極を用いずに定電流刺激を与えるための設計である。

(b) ITO ガラス電極上の神経細胞の fluo-4 の蛍光。赤点線より上部の領域が電極上、下部が電極外。スケールバーは 100 μm。

(c, 上) 画像の赤矢頭の神経細胞の Ca²⁺ 蛍光変化率

(中央) 応答検出タイミングのラスタープロット、色は Ca²⁺ 蛍光変化率のものと対応している

(下) このときの電圧刺激強度。10 秒間の 1 サイクルの刺激の間に 20 Hz の連続パルスを入力した

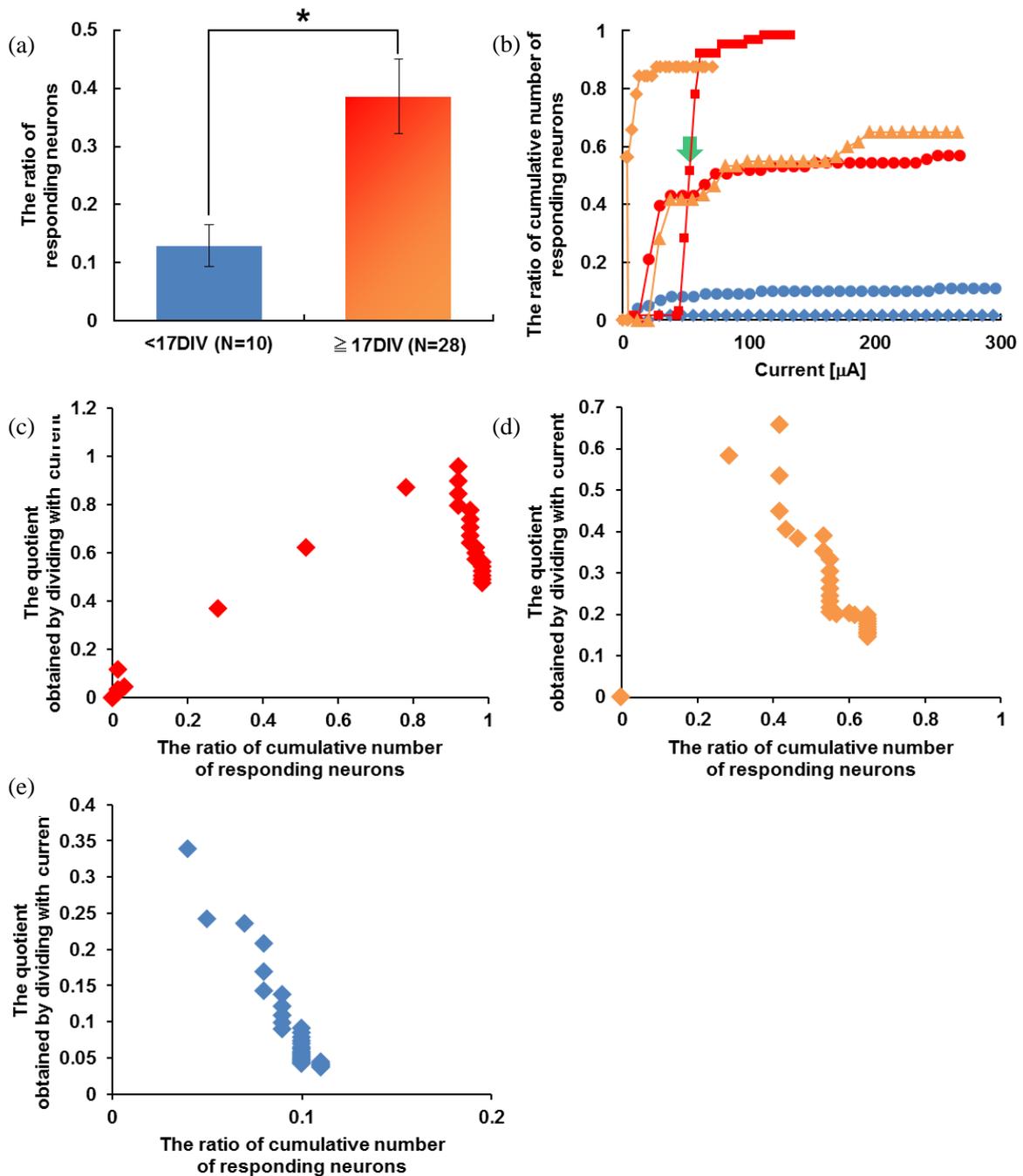


Figure 22 培養日数による電流刺激に対する応答の出かた

(a) 長期培養($\geq 17\text{DIV}$, 赤と橙色のグラデーション, $N=28$)と短期培養($< 17\text{DIV}$, 青, $N=10$)のサンプルの全細胞数に対する応答細胞数の割合。エラーバーは SEM、*は t 検定で $P < 0.05$ を示す。

(b) 電流刺激強度に対する累積応答細胞率の変化。赤と橙色は長期培養($\geq 17\text{DIV}$, 丸: 17DIV, 四角: 24DIV, 菱形: 23DIV, 三角: 38DIV)、青は短期培養($< 17\text{DIV}$, 丸: 10DIV, 菱形: 15DIV)。長期培養したサンプルでは S 字型(赤)のものと飽和型(橙色)のものが出てきた。

(c) 代表的な S 字型サンプルの Scatchard プロット

(d) 代表的な飽和型サンプルの Scatchard プロット

(e) 代表的な短期培養サンプルの Scatchard プロット

Scatchard プロットは、横軸が応答細胞率、縦軸が応答細胞率を電流値で割った値である。

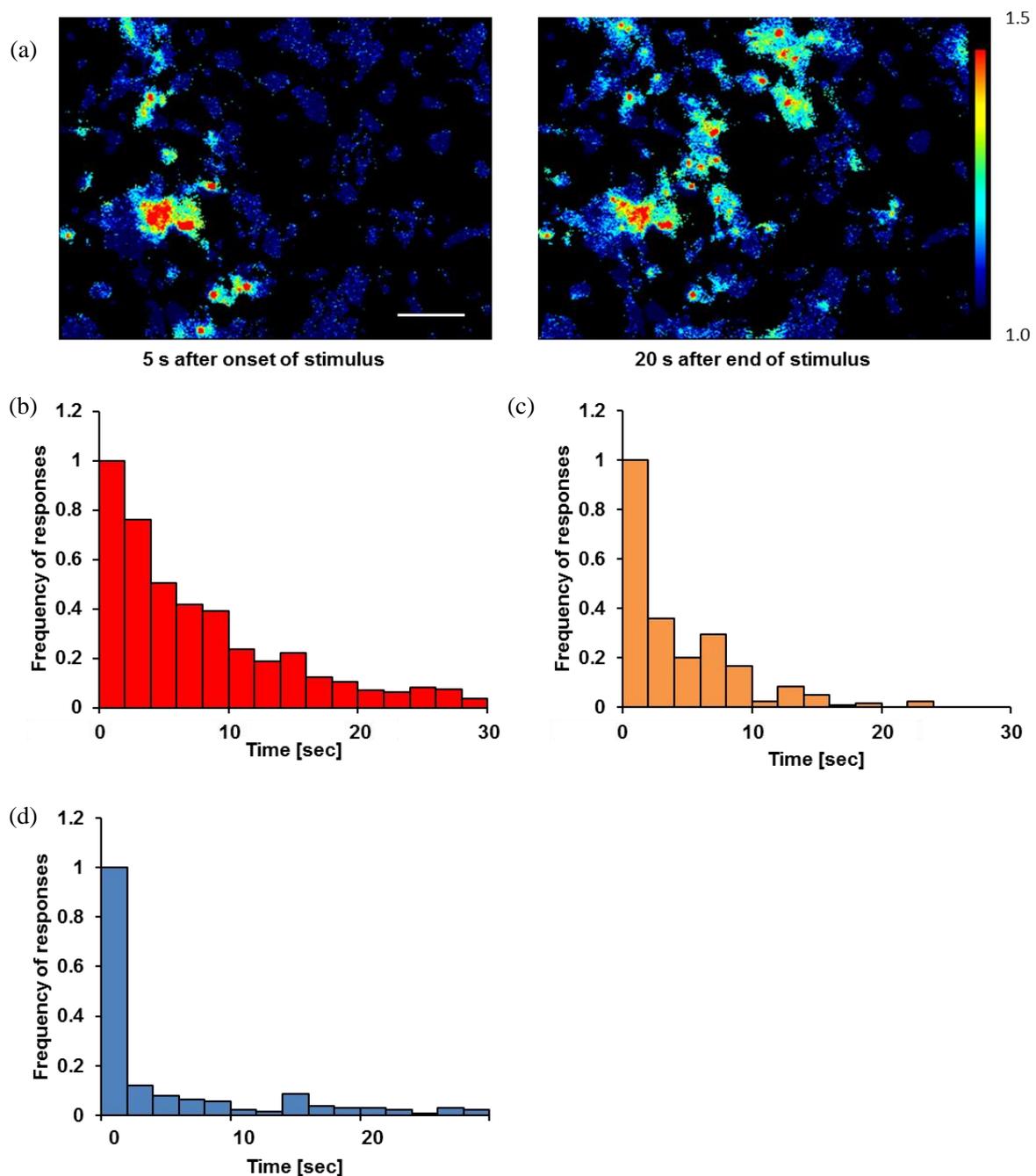


Figure 23 応答伝播と遅れ

- (a) 刺激を与えてからの神経細胞の応答遅れの様子の代表例(Figure 22 の緑の矢印での応答)。2つのレシオ画像は、(左)刺激開始から5秒後、(右)刺激終了から20秒後。スケールバーは100 μm 。
- (b) 刺激開始からの応答の遅れ時間(S字型, N=8 実験より n=2131 Ca^{2+} 応答)
- (c) 刺激開始からの応答の遅れ時間(飽和型, N=3 実験より n=266 Ca^{2+} 応答)
- (d) 刺激開始からの応答の遅れ時間(<17DIV, N=10 実験より n=227 Ca^{2+} 応答)

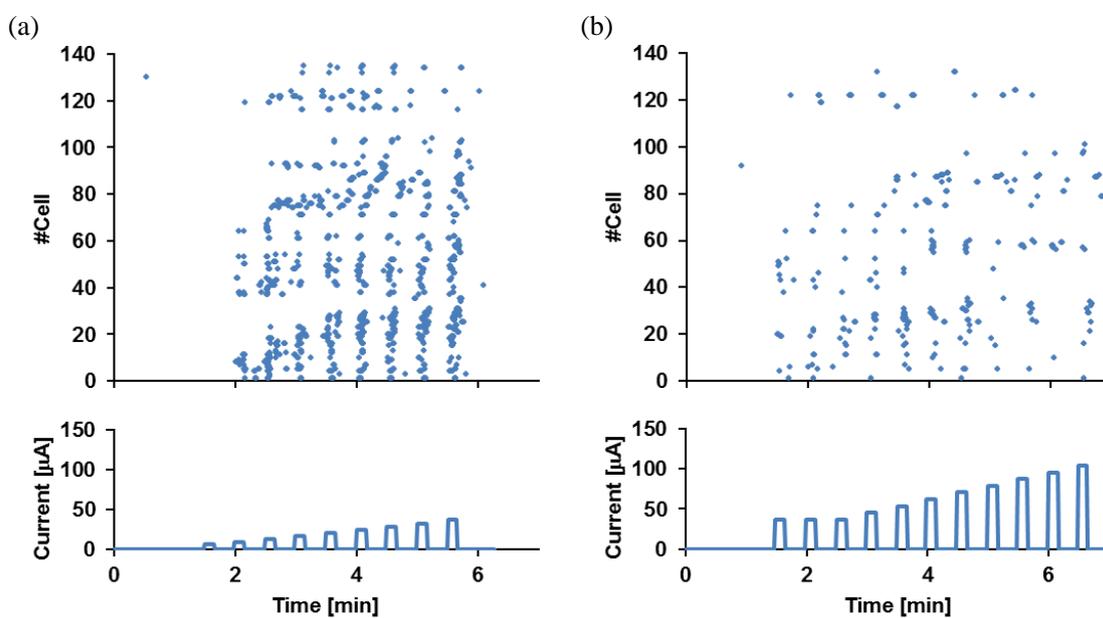


Figure 24 代表的なサンプルでのラスタープロット

(a) 阻害前と, (b)阻害後の一連の刺激に対する応答タイミング

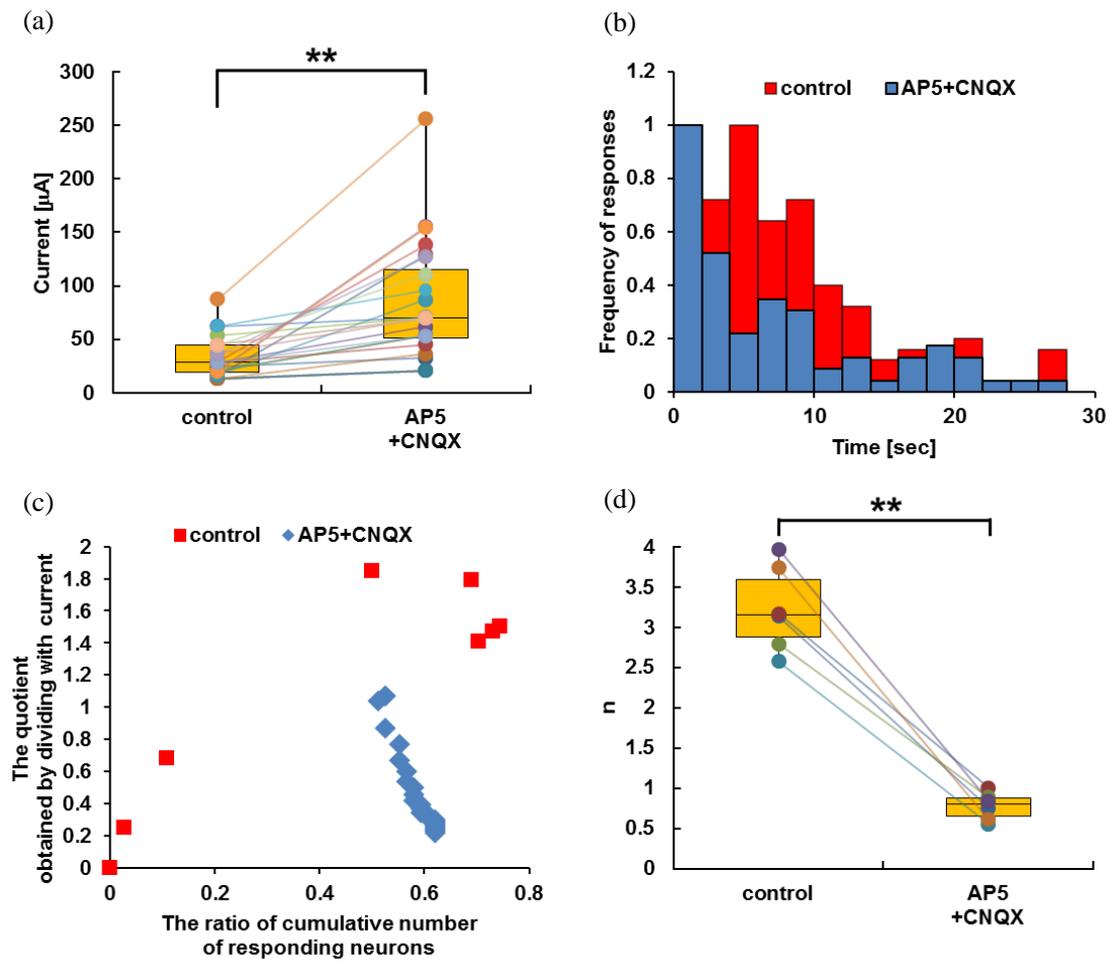


Figure 25 グルタミン酸受容体のアンタゴニストによる神経活動の抑制

(a) AP5 (200 μM)と CNQX (10 μM)によるグルタミン酸受容体の抑制をする前(control)とした後(AP5+CNQX)での Ca^{2+} 応答を引き起こした最小の電流値の比較。箱ひげ図によって示されている。1つの折れ線が1つの細胞に対応する(**は対のある t 検定で $P < 0.001$ を示す, $n = 24$)。

(b) グルタミン酸受容体の抑制をする前(control, 赤)とした後(AP5+CNQX, 青)での電流刺激開始からの神経細胞の応答時間遅れ。8 サンプルの中で阻害剤により応答をなくした細胞のみについて、それらのサンプル全てを通して検出された Ca^{2+} 応答を control($n = 139$ 応答)と AP5+CNQX($n = 74$ 応答)の条件でまとめた。ヒストグラムは 0-2 秒の値で規格化している。

(c) ある代表的なサンプルでの control(赤)と AP5+CNQX(青) の条件での Scatchard プロット

(d) Control と AP5+CNQX の条件での Hill 係数 n 。箱ひげ図によって示されている。1つの折れ線グラフは1つのサンプルに対応する。全てのサンプルについて n の値は control の条件のとき AP5+CNQX の条件のときより大きくなった(**は対のある t 検定で $P < 0.001$ を示す, $N = 6$)。

第4章 結言

4.1 本論文のまとめ

本研究では、透明電極 ITO ガラス電極を用いて複数の細胞に同時に刺激を与えながら、それらの応答を蛍光色素による Ca^{2+} イメージングで観察することにより、刺激と観察を同時に行った。これまで作製されていたような MEA などにおける対電極を用いた導電面の形状では、個々の細胞にどれくらいの電流刺激が与えられているかがわからなかった。本研究ではその問題を解決するために、導電面中央部を局所的に細くなるような形状にすることにより、電流値を制御し、対電極を用いなくても刺激を与えることが可能な系を作製した。

第2章では、ITO 電流刺激により、対電極を用いずに複数の細胞に刺激を与えながらその応答の拡がりを抑えることが可能であることを示した。

第3章では、細胞同士が互いにネットワークを形成すると考えられている海馬の神経細胞を分散培養した系に対して、この計測系を適用し、Scatchard プロットと Hill プロットを用いることにより、培養日数が経過した長期培養のサンプルにおいて、刺激強度に対する累積応答細胞率のグラフで S 字型応答と飽和型応答を見出し、系の協同性を議論した。

4.2 協同現象とこの現象に関わる神経活動

本研究の第3章では電流刺激に対する応答細胞率の急激な上昇が観察された(Figure 22(b))。この現象は、ネットワーク内の神経細胞間での協同作用、すなわち、ある細胞の応答が引き金となって、周囲の細胞の応答が触発されたものと考えた。酵素・基質反応において、ある基質分子が酵素に結合することによりその酵素に対する他の基質分子が結合しやすくなることが報告されており、Scatchard プロットや Hill プロットによる解析も行われている(Rizk et al., 2011)。このモデルを利用して本研究では細胞協同性を定量化するために、Scatchard プロットや Hill プロットを適用し、基質分子濃度の式(3.4.3 節より)を電流値などで置換えることにより、培養日数が長いサンプルの中では S 字型と飽和型の 2 種類の応答を見出した。

S 字型と飽和型の応答の違いは、協同性の強さ、すなわち細胞の応答とそれによる周囲の細胞の応答の相関の強さの違いから生じるものであり、神経系全体のネットワークとしての働きの違いに依るものであると考えられる。本研究ではこれを興奮性伝達物質によるものであると考え、興奮性伝達物質受容体の阻害剤を加えたときの協同性の変化を調べたところ、Scatchard プロットの形は S 字型を表す上に凸な曲線から飽和型を表す直線に変化し、さらにヒル係数 n の値も大きく減少した(Figure 25)。この結果から S 字型と飽和型の違いの原因として、興奮性伝達物質によるものがあることがわかった。阻害剤を加えない細胞においても違いが見られたが、サンプルにより興奮性伝達物質の受容体やシナプスの密度

が異なっていたためと思われる。

以上のように本研究では興奮性伝達物質受容体の阻害による協同性の変化を見たが、一方、抑制性伝達物質である GABA 受容体を阻害した場合、協同性がより大きくなることも考えられる。この点については今後の課題であると考えている。

このネットワーク内の神経細胞間での協同現象に関わるこれまでの報告として、シミュレーションでネットワークを構成する神経細胞の個数が多い場合、シナプス密度を高くすることにより、神経発火が活発になることが示されている。この研究では、細胞数が多い場合は少ない場合と違ってシナプス間の相互作用(シナプス密度)が上昇することにより、平均スパイク数の急激な上昇が見られており、シナプス相互作用なしの条件ではノイズ強度上昇により連続的な上昇しか見られなかった(Rose and Siebler, 1995)。しかし、外部からの電流やノイズ強度を上昇させることによるシナプス活動の変化が平均スパイク数に及ぼすことまでは考慮されていない。本研究の第3章の結果は、外部電流をノイズと見立て、ノイズ強度が上昇していくときの神経細胞間での協同性を考慮した上での活動の変化を示した結果であるといえよう。

実際の神経系では、個々の細胞ではなく神経細胞の集団での協調活動が情報を伝えていると言われている。これを集団コーディングという(de Araujo et al., 2006)。本研究で見つけた神経細胞間の協同的な応答は、この集団コーディングに関わるものであると考えられる。

本研究で開発したパターン ITO 電極を用いることで、この集団コーディングの分子メカニズムをその分子イメージングなどと併用して観察することなどに繋がる可能性がある。

4.3 本研究における fluo-4 による Ca^{2+} 応答の検出の精度

一般的な Ca^{2+} 応答の時間スケールは 100 m 秒スケールであるのに対して、本研究で私が使っていた CCD カメラは露光時間の関係からサンプリング周期が 800 から 2000 m 秒と遅い。よって、より細かい Ca^{2+} 応答を検出することはできていない。本研究では見ているのは 10 秒の電流刺激を与えることによる遅い Ca^{2+} 応答であるしかしながら、より短時間の単一の Ca^{2+} 応答の中には検出できていないものもあるかもしれない。より速く蛍光を検出するためには、CCD カメラの露光時間を短くしても問題ない程明るい蛍光をもつ fluo-8 などの色素を用いるのも解決策の 1 つである。また、 Ca^{2+} 蛍光指示薬の中で近年注目を集めているものの一つとして、赤色 Ca^{2+} センサーである R-CaMP2 が開発されている。これは従来のタンパク質性 Ca^{2+} センサーに比べて反応速度は早く、神経発火回数と蛍光強度の変化の間に線形関係を示す、という特徴をもっている。これは Ca^{2+} 濃度と蛍光強度の変化の関係を示す Hill 係数は 1 に近づいた、すなわち第 3 章で示した協同性が殆どないような結合の仕方をする事により実現されている(Inoue et al., 2015, Figure 26)。本研究で用いた fluo-4 は $K_d=345$ nM で大きな Hill 係数をもっていることから、神経細胞がバーストのような数 m 秒スケールの繰り返し発火を起こしたときの比較的高い濃度領域での Ca^{2+} 応答の有無を検出

するのに向いた色素であった。一方で R-CaMP2 は $K_d=69$ nM で Hill 係数が 1.2 であることから、比較的高い Ca^{2+} 濃度領域のみならず、本研究では検出できなかったような単一スパイクレベルでの応答検出が可能であるものと考えられる。本研究では第 2 章の Figure 14 や第 3 章の Figure 22(b)などで刺激強度に対する応答細胞率の増加の仕方を見てきた。仮に R-CaMP2 のようなより細かい Ca^{2+} 応答を検出できるような蛍光色素を用いれば、例えば Figure 14 では自発応答と差が見られなかった電極の間でも僅かながら刺激による応答を検出できる可能性がある。一方で、Figure 22(b)で観察した S 字型応答については、刺激が弱い場合は応答が全く出ないが、強度を上げてある値に達した時に初めて応答が一気に上昇した。これも R-CaMP2 を用いることで、刺激が弱い場合の応答が完全に 0 ではなく、少しだけ検出されるようなグラフに変化するということが想定される。これにより、S 字型はより滑らかな曲線になるという結果が予想される。

4.4 シナプス電流の定量化の可能性

第 3 章の Figure 25(a)にて、グルタミン酸受容体のアンタゴニスト(AP5 と CNQX)を加えることにより、加える前(control)では応答を示す一方加えた後では応答を示さなくなる。さらには刺激強度を上げることにより再び応答を示した細胞のみについて、アンタゴニストを加える前後での、応答を示す最小の電流値を求めている。ここではこれらを「閾値電流」と呼ぶことにする。

このときの状況を模式的に示した図が Figure 27 である。すなわち、図の茶色の矢印の細胞に着目すると、control では直接の電流刺激が与えられている一方で、周囲の細胞が電流刺激による応答を示すことによりシナプス入力を着目細胞に与えるものと考えられる。その一方で、AP5 と CNQX を加えた条件下では、シナプス入力分はなくなるものと考えられる。このため、応答の閾値に達するためには、より強い電流刺激が必要であると考えられる。このときの差はすなわちそれぞれの条件下における閾値電流と考えられ、Figure 25(a)における 2 条件での差は周囲の細胞からのシナプス入力の大さを定量的に表しているものであったと考えることができる。

このことから、シナプス活動を定量的に表す蛍光色素である FM1-43(fluo-4 と併用する場合は FM4-64)を用いることにより (Hennekinne et al., 2013; Matsuzaki et al., 2001; Ullian et al., 2001)、上の条件を満たすある細胞について、

$I(\text{電流刺激強度}) \times C1(\text{細胞ごとの定数}) + \text{FM}_{\text{down}}(\text{FM 蛍光減少}) \times C2(\text{蛍光シナプス活動定数})$
がある一定の細胞の閾値を表す値となるのではないかと期待される。

4.5 確率共鳴現象の観察への応用の可能性

これまでラット脳スライスの海馬 CA1 単一神経細胞において、電気生理学手法によって確率共鳴現象が示されている(Stacey and Durand, 2001, 2000)。確率共鳴とは、ある非線形系において閾値以下の微弱なシグナルに適切な強度のノイズが加わることにより、シグナル

とノイズの強度比(signal to noise, SNR)が向上する現象である。

しかしこれまでは主に単一細胞におけるものは見られてきたが、上述したような協同性を持つ複数細胞の神経ネットワーク系においては観察されてこなかった。

本研究で作製したパターン ITO 電極を用いることにより、上述したように、協同現象が起こる実際の神経ネットワーク系における確率共鳴現象の解析が可能となる可能性がある。具体的には、*in-vitro* の神経ネットワーク系において今回用いたパターン ITO ガラス電極による刺激を、閾値に達しないシグナル(正弦波など)用とノイズ(ホワイトノイズなど)用の 2 刺激を与えることにより、その機構を解明するというものである。また、一般的な確率共鳴で想定されているノイズとは、シナプス入力ノイズ、イオンチャネル開閉のノイズ、熱揺動によるノイズがあり(Soudry and Meir, 2012; Stacey and Durand, 2001)、これらを反映するような刺激を別の端子から与えるような系を作製して実験を行うことが考えられる。

このように、電流刺激を閾値以下のシグナル用とノイズ用とに分け、確率共鳴を模擬した系を作り、その機構を観察することが可能となる可能性がある。

4.6 Ca^{2+} と Mg^{2+} の同時イメージングの可能性

神経の機能の中で、 Mg^{2+} は健全な神経機能のために必要であり、興奮性伝達物質であるグルタミン酸が細胞内の Mg^{2+} 濃度を増加させることはわかっているが(Shindo et al., 2010)、生理条件下において神経活動が Mg^{2+} 濃度を上昇させるかどうかはわかっていなかった。

そこで、本研究で作製したパターン ITO ガラス電極を用いてネットワークを形成する系における Ca^{2+} 応答が Mg^{2+} に対してどのように影響をおよぼすかを調べる先行研究がある(Yamanaka et al., 2015)。しかし、この研究ではネットワークの影響を考慮した議論は行われていない。本研究で観測した長期培養により協同的な振る舞いを起こす系の中で、 Ca^{2+} と Mg^{2+} の同時イメージングを行うことにより、協同性と Mg^{2+} の関係を観察できる可能性がある。

4.7 今後の展望とその他の応用例

今回はネットワークを形成する海馬の神経細胞に対して作製した刺激系を適用し、ネットワーク全体の活動を観察することにより神経ネットワークの性質の解析を行ったが、細胞の培養環境により、接続の強度やその仕方が変わってくるという報告がある(Fields and Stevens-Graham, 2002; Perea and Araque, 2005)。このことから、培養条件を変える実験として、例えば神経細胞の密度を変えた場合や、グリア細胞との共培養を行った条件において神経ネットワークの性質がどのように変化するかを解析するようなことが可能であると考えられる(Figure 28)。

あるいは Figure 29 に示すように、細胞体が通過できないような流路が左右のチャンバーに挟まれた形状のチャンバーで、左のチャンバー内の細胞のみに電流刺激を与えながら薬物刺激(細胞外液の条件を変える)を行うことにより、ネットワークの形成の仕方を観察して

いくことも可能である。この特定の領域にのみ刺激を与えることができるチャンバーは過去の報告でも使われている(Bhattacharjee et al., 2010; Hosmane et al., 2010; Kanagasabapathi et al., 2011; Park et al., 2009)。

また、本研究では分散培養で実験を行ったが、脳のスライスカルチャーを用いることによって、あらかじめ接続関係がわかっている神経系の挙動を知ることや、接続関係が未だ未解明な系において、その接続の様子を知る手掛かりになるかもしれない。

さらに、神経系が可塑を起こす際の神経細胞内でのセカンドメッセンジャーや新規タンパク質等の挙動の分子メカニズムを知るために、また神経トレーサーによる細胞形態との同時イメージングを行うことにより、突起の伸び方の様子がわかった上で、本研究で観察した Ca^{2+} イメージングと併用することにより同時に機能的なつながりの様子(シナプス機能)がわかるため、抗体染色で固定しない状態での接続関係を推察することにつながる可能性もある。

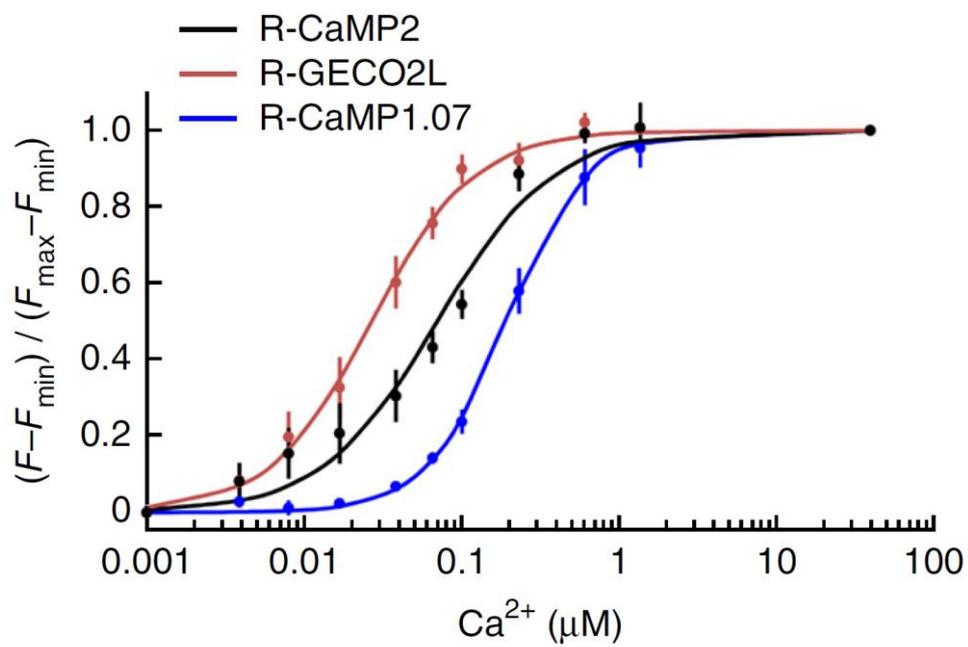
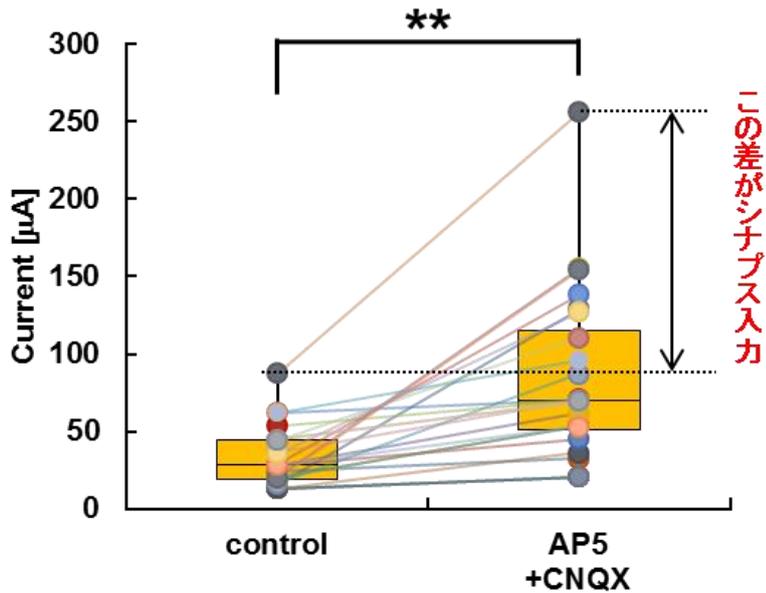
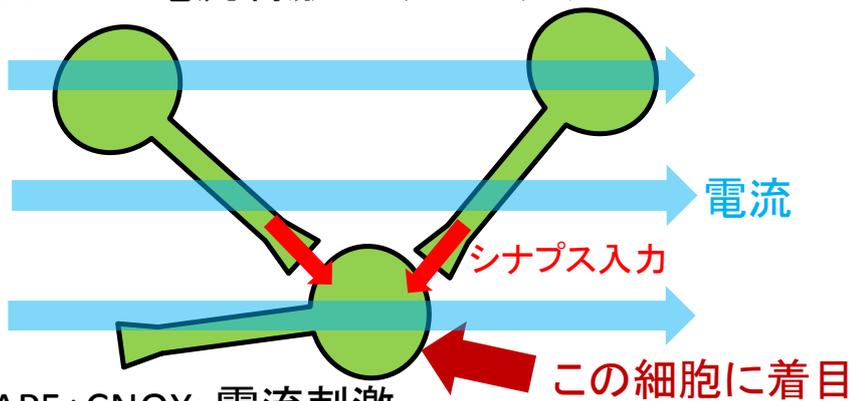


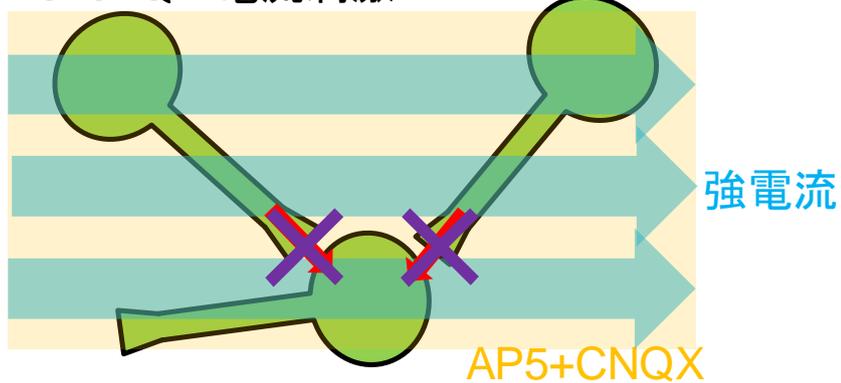
Figure 26 高感度かつ Hill 係数が 1 付近の赤色 Ca^{2+} センサー「R-CAMP2」の蛍光の Ca^{2+} 濃度依存特性(Inoue et al., 2015)



Control: 電流刺激+シナプス入力



AP5+CNQX: 電流刺激



応答するためにより大きな電流が必要

Figure 27 電流入力とシナプス入力の総和の関係(仮説)
上段のグラフで**は対のあるt検定で $P < 0.001$ を意味する

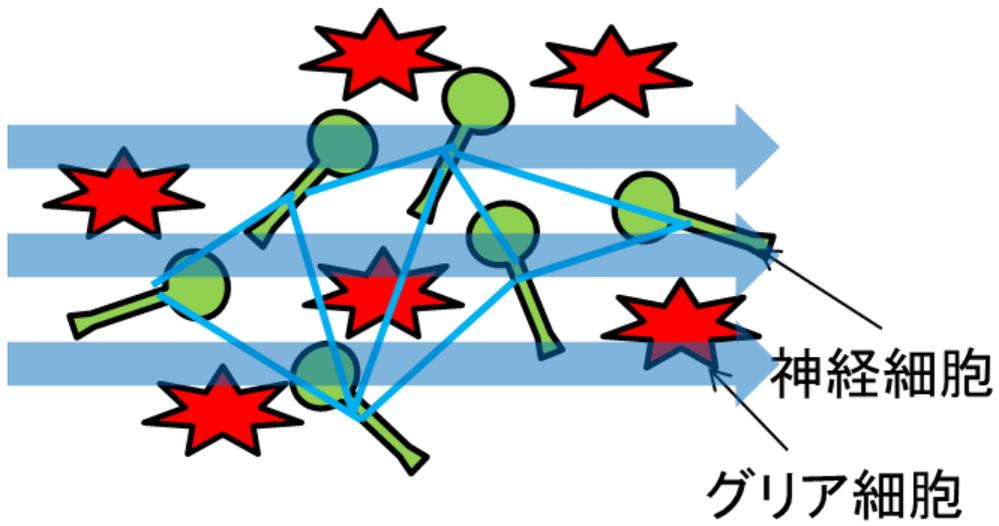


Figure 28 グリア細胞との共培養系での ITO ガラス電極での電流刺激

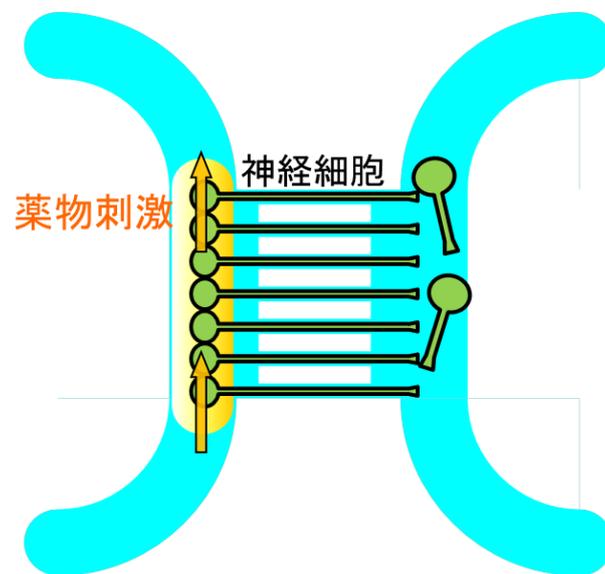


Figure 29 細胞体が通過できないような流路が左右のチャンバーに挟まれた形状のチャンバーで、左のチャンバー内の細胞のみに電流刺激を与えつつ薬物刺激(細胞外液の条件を変える)を行うことによるネットワーク形成の検討

参考文献

- Alfonsa, H., Merricks, E.M., Codadu, N.K., Cunningham, M.O., Deisseroth, K., Racca, C., Trevelyan, a. J., 2015. The Contribution of Raised Intraneuronal Chloride to Epileptic Network Activity. *J. Neurosci.* 35, 7715–7726.
- Behrend, M.R., Ahuja, A.K., Humayun, M.S., Chow, R.H., Weiland, J.D., 2011. Resolution of the epiretinal prosthesis is not limited by electrode size. *IEEE Trans. Neural Syst. Rehabil. Eng.* 19, 436–42.
- Berdondini, L., Massobrio, P., Chiappalone, M., Tedesco, M., Imfeld, K., Maccione, a, Gandolfo, M., Koudelka-Hep, M., Martinoia, S., 2009. Extracellular recordings from locally dense microelectrode arrays coupled to dissociated cortical cultures. *J. Neurosci. Methods* 177, 386–96.
- Bernardinelli, Y., Salmon, C., Jones, E. V, Farmer, W.T., Stellwagen, D., Murai, K.K., 2011. Astrocytes display complex and localized calcium responses to single-neuron stimulation in the hippocampus. *J. Neurosci.* 31, 8905–19.
- Bhattacharjee, N., Li, N., Keenan, T.M., Folch, A., 2010. A neuron-benign microfluidic gradient generator for studying the response of mammalian neurons towards axon guidance factors. *Integr. Biol. (Camb)*. 2, 669–79.
- Bock, D.D., Lee, W.A., Kerlin, A.M., Andermann, M.L., Hood, G., Wetzel, A.W., Yurgenson, S., Soucy, E.R., Kim, H.S., Reid, R.C., 2011. Network anatomy and in vivo physiology of visual cortical neurons. *Nature* 471, 177–82.
- Bonifazi, P., Difato, F., Massobrio, P., Breschi, G.L., Pasquale, V., Levi, T., Goldin, M., Bornat, Y., Tedesco, M., Bisio, M., Kanner, S., Galron, R., Tessadori, J., Taverna, S., Chiappalone, M., 2013. In vitro large-scale experimental and theoretical studies for the realization of bi-directional brain-prostheses. *Front. Neural Circuits* 7, 40.

- Bordbar, a. K., Saboury, a. a., Moosavi-Movahedi, a. a., 1996. The Shapes of Scatchard Plots for Systems with Two Sets of Binding Sites. *Biochem. Educ.* 24, 172–175.
- Brewer, G.J., Boehler, M.D., Pearson, R. a, DeMaris, a a, Ide, a N., Wheeler, B.C., 2009. Neuron network activity scales exponentially with synapse density. *J. Neural Eng.* 6, 014001.
- Brustein, E., Marandi, N., Kovalchuk, Y., Drapeau, P., Konnerth, A., 2003. “In vivo” monitoring of neuronal network activity in zebrafish by two-photon Ca^{2+} imaging. *Pflugers Arch.* 446, 766–73.
- Cao, G., Gardner, A., Westfall, T.C., 2007. Mechanism of dopamine mediated inhibition of neuropeptide Y release from pheochromocytoma cells (PC12 cells). *Biochem. Pharmacol.* 73, 1446–54.
- Catterall, W.A., 2010. Ion channel voltage sensors: structure, function, and pathophysiology. *Neuron* 67, 915–28.
- Chen, Z., 2013. An overview of Bayesian methods for neural spike train analysis. *Comput. Intell. Neurosci.* 2013, 251905.
- Chiappalone, M., Bove, M., Vato, A., Tedesco, M., Martinoia, S., 2006. Dissociated cortical networks show spontaneously correlated activity patterns during in vitro development. *Brain Res.* 1093, 41–53.
- Cohen, E., Ivenshitz, M., Amor-Baroukh, V., Greenberger, V., Segal, M., 2008. Determinants of spontaneous activity in networks of cultured hippocampus. *Brain Res.* 1235, 21–30.
- Colombi, I., Mahajani, S., Frega, M., Gasparini, L., Chiappalone, M., 2013. Effects of antiepileptic drugs on hippocampal neurons coupled to micro-electrode arrays. *Front. Neuroeng.* 6, 10.
- Cossart, R., Ikegaya, Y., Yuste, R., 2005. Calcium imaging of cortical networks dynamics. *Cell Calcium* 37, 451–7.

- Das, K.P., Freudenrich, T.M., Mundy, W.R., 2004. Assessment of PC12 cell differentiation and neurite growth: a comparison of morphological and neurochemical measures. *Neurotoxicol. Teratol.* 26, 397–406.
- De Araujo, I.E., Gutierrez, R., Oliveira-Maia, A.J., Pereira, A., Nicoletis, M. a L., Simon, S. a, 2006. Neural ensemble coding of satiety states. *Neuron*.
- Eberhard, M.J.B., Gordon, S.D., Windmill, J.F.C., Ronacher, B., 2014. Temperature effects on the tympanal membrane and auditory receptor neurons in the locust. *J. Comp. Physiol. A Neuroethol. Sensory, Neural, Behav. Physiol.* 200, 837–847.
- Ebina, T., Sohya, K., Imayoshi, I., Yin, S.-T., Kimura, R., Yanagawa, Y., Kameda, H., Hioki, H., Kaneko, T., Tsumoto, T., 2014. 3D Clustering of GABAergic Neurons Enhances Inhibitory Actions on Excitatory Neurons in the Mouse Visual Cortex. *Cell Rep.* 9, 1896–1907.
- Eckerman, P., Scharruhn, K., Horowitz, J.M., 1990. Effects of Temperature and Acid-Base State on Hippocampal Population Spikes in Hamsters. *Am. J. Physiol.* 258, R1140–R1146.
- Erickson, J., Tooker, A., Tai, Y.-C., Pine, J., 2008. Caged neuron MEA: a system for long-term investigation of cultured neural network connectivity. *J. Neurosci. Methods* 175, 1–16.
- Eric R. Kandel, James H. Schwartz, Thomas M. Jessell, 2000. *Principles of Neural Science*, 4th ed., McGraw-Hill, Health Professions Division
- Fields, R.D., Stevens-Graham, B., 2002. New insights into neuron-glia communication. *Science* 298, 556–62.
- Freeman, D.K., Eddington, D.K., Rizzo, J.F., Fried, S.I., 2010. Selective activation of neuronal targets with sinusoidal electric stimulation. *J. Neurophysiol.* 104, 2778–91.

- Fukuda, J., Kameoka, Y., Suzuki, H., 2011. Spatio-temporal detachment of single cells using microarrayed transparent electrodes. *Biomaterials* 32, 6663–9.
- Furukawa, Y., Shimada, A., Kato, K., Iwata, H., Torimitsu, K., 2013. Monitoring neural stem cell differentiation using PEDOT-PSS based MEA. *Biochim. Biophys. Acta* 1830, 4329–33.
- Gopal, K. V, 2003. Neurotoxic effects of mercury on auditory cortex networks growing on microelectrode arrays: a preliminary analysis. *Neurotoxicol. Teratol.*
- Greene, L.A., Tischler, A.S., 1976. Establishment of a noradrenergic clonal line of rat adrenal pheochromocytoma cells which respond to nerve growth factor. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 73, 2424–8.
- Grigoryan, G., Segal, M., 2013. Prenatal stress affects network properties of rat hippocampal neurons. *Biol. Psychiatry* 73, 1095–102.
- Gross, G.W., Wen, W.Y., Lin, J.W., 1985. Transparent indium-tin oxide electrode patterns for extracellular, multisite recording in neuronal cultures. *J. Neurosci. Methods* 15, 243–52.
- Hanakawa, T., Mima, T., Matsumoto, R., Abe, M., Inouchi, M., Urayama, S.-I., Anami, K., Honda, M., Fukuyama, H., 2009. Stimulus-response profile during single-pulse transcranial magnetic stimulation to the primary motor cortex. *Cereb. Cortex* 19, 2605–15.
- Hatakeyama, D., Mita, K., Kobayashi, S., Sadamoto, H., Fujito, Y., Hiripi, L., Elekes, K., Ito, E., 2010. Glutamate transporters in the central nervous system of a pond snail. *J. Neurosci. Res.* 88, 1374–86.
- Hennekinne, L., Colasse, S., Triller, A., Renner, M., 2013. Differential control of thrombospondin over synaptic glycine and AMPA receptors in spinal cord neurons. *J. Neurosci.* 33, 11432–9.
- Herzog, N., Shein-Idelson, M., Hanein, Y., 2011. Optical validation of in vitro extra-cellular neuronal recordings. *J Neural Eng* 8, 56008.

- Hill, A. V., 1910. A new mathematical treatment of changes of ionic concentration in muscle and nerve under the action of electric currents, with a theory as to their mode of excitation. *J. Physiol.* 40, 190–224.
- Hofmann, F., Bading, H., 2006. Long term recordings with microelectrode arrays: studies of transcription-dependent neuronal plasticity and axonal regeneration. *J. Physiol. Paris* 99, 125–32.
- Hogberg, H.T., Sobanski, T., Novellino, A., Whelan, M., Weiss, D.G., Bal-Price, A.K., 2011. Application of micro-electrode arrays (MEAs) as an emerging technology for developmental neurotoxicity: evaluation of domoic acid-induced effects in primary cultures of rat cortical neurons. *Neurotoxicology* 32, 158–68.
- Homma, K., Kitamura, Y., Ogawa, H., Oka, K., 2006. Serotonin induces the increase in intracellular Ca^{2+} that enhances neurite outgrowth in PC12 cells via activation of 5-HT₃ receptors and voltage-gated calcium channels. *J. Neurosci. Res.* 84, 316–25.
- Hosmane, S., Yang, I.H., Ruffin, A., Thakor, N., Venkatesan, A., 2010. Circular compartmentalized microfluidic platform: Study of axon-glia interactions. *Lab Chip* 10, 741–7.
- Ikegaya, Y., Aaron, G., Cossart, R., Aronov, D., Lampl, I., Ferster, D., Yuste, R., 2004. Synfire chains and cortical songs: temporal modules of cortical activity. *Science* 304, 559–64.
- Inoue, M., Takeuchi, A., Horigane, S., Ohkura, M., Gengyo-Ando, K., Fujii, H., Kamijo, S., Takemoto-Kimura, S., Kano, M., Nakai, J., Kitamura, K., Bito, H., 2015. Rational design of a high-affinity, fast, red calcium indicator R-CaMP2. *Nat. Methods* 12, 64–70.
- Ito, D., Komatsu, T., Gohara, K., 2013. Measurement of saturation processes in glutamatergic and GABAergic synapse densities during long-term development of cultured rat cortical networks. *Brain Res.* 1534, 22–32.

- Jensen, R.J., Ziv, O.R., Rizzo, J.F., 2005. Thresholds for activation of rabbit retinal ganglion cells with relatively large, extracellular microelectrodes. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 46, 1486–96.
- Jeon, C., Jin, J., Koh, Y., Chun, W., Choi, I., Kown, H., Kim, Y., Park, J., 2010. Neurites from PC12 cells are connected to each other by synapse-like structures. *Synapse* 64, 765–72.
- Jimbo, Y., Kasai, N., Torimitsu, K., Tateno, T., Robinson, H.P.C., 2003. A system for MEA-based multisite stimulation. *IEEE Trans. Biomed. Eng.* 50, 241–8.
- Kanagasabapathi, T.T., Ciliberti, D., Martinoia, S., Wadman, W.J., Decré, M.M.J., 2011. Dual-compartment neurofluidic system for electrophysiological measurements in physically segregated and functionally connected neuronal cell culture. *Front. Neuroeng.* 4, 13.
- Kang, G., Lee, J.-H., Lee, C.-S., Nam, Y., 2009. Agarose microwell based neuronal micro-circuit arrays on microelectrode arrays for high throughput drug testing. *Lab Chip* 9, 3236–42.
- Klueva, J., Lima, A.D. De, Meis, S., Voigt, T., Munsch, T., 2012. Hyperpolarization-activated cation current contributes to spontaneous network activity in developing neocortical cultures. *Neurosignals.* 20, 35–47.
- Klueva, J., Meis, S., de Lima, A.D., Voigt, T., Munsch, T., 2008. Developmental downregulation of GABAergic drive parallels formation of functional synapses in cultured mouse neocortical networks. *Dev. Neurobiol.* 68, 934–49.
- Konry, T., Marks, R.S., 2005. Physico-chemical studies of indium tin oxide-coated fiber optic biosensors. *Thin Solid Films* 492, 313–321.
- Korkotian, E., Bombela, T., Odegova, T., Zubov, P., Segal, M., 2013. Ethanol affects network activity in cultured rat hippocampus: mediation by potassium channels. *PLoS One.*

- Lei, K.F., Lee, I., Liu, Y., Wu, Y., 2014. Successful Differentiation of Neural Stem/Progenitor Cells Cultured on Electrically Adjustable Indium Tin Oxide (ITO) Surface. *Langmuir*.
- Liu, M., Chen, X., He, T., Li, Z., Chen, J., 2012. Use of multi-electrode array recordings in studies of network synaptic plasticity in both time and space. *Neurosci. Bull.* 28, 409–22.
- Martinoia, S., Bonzano, L., Chiappalone, M., Tedesco, M., Marcoli, M., Maura, G., 2005. In vitro cortical neuronal networks as a new high-sensitive system for biosensing applications. *Biosens. Bioelectron.*
- Matsuzaki, M., Ellis-Davies, G.C., Nemoto, T., Miyashita, Y., Iino, M., Kasai, H., 2001. Dendritic spine geometry is critical for AMPA receptor expression in hippocampal CA1 pyramidal neurons. *Nat. Neurosci.* 4, 1086–92.
- Maturana, M.I., Apollo, N. V, Garrett, D.J., Kameneva, T., Meffin, H., Ibbotson, M.R., Cloherty, S.L., Grayden, D.B., 2015. The effects of temperature changes on retinal ganglion cell responses to electrical stimulation. *Conf. Proc. ... Annu. Int. Conf. IEEE Eng. Med. Biol. Soc. IEEE Eng. Med. Biol. Soc. Annu. Conf. 2015*, 7506–9.
- Michel, K., Michaelis, M., Mazzuoli, G., Mueller, K., Vanden Berghe, P., Schemann, M., 2011. Fast calcium and voltage-sensitive dye imaging in enteric neurones reveal calcium peaks associated with single action potential discharge. *J. Physiol.* 589, 5941–7.
- Millard, D.C., Whitmire, C.J., Gollnick, C. a., Rozell, C.J., Stanley, G.B., 2015. Electrical and Optical Activation of Mesoscale Neural Circuits with Implications for Coding. *J. Neurosci.* 35, 15702–15715.
- Millet, L.J., Stewart, M.E., Nuzzo, R.G., Gillette, M.U., 2010. Guiding neuron development with planar surface gradients of substrate cues deposited using microfluidic devices. *Lab Chip* 10, 1525–35.

- Mukai, Y., Shiina, T., Jimbo, Y., 2003. Continuous monitoring of developmental activity changes in cultured cortical networks. *Electr. Eng. Japan* 145, 28–37.
- Nakamichi, N., Yoneda, Y., 2006. Maturation-dependent reduced responsiveness of intracellular free Ca^{2+} ions to repeated stimulation by N-methyl-D-aspartate in cultured rat cortical neurons. *Neurochem. Int.* 49, 230–7.
- Nam, Y., Wheeler, B.C., Heuschkel, M.O., 2006. Neural recording and stimulation of dissociated hippocampal cultures using microfabricated three-dimensional tip electrode array. *J. Neurosci. Methods* 155, 296–9.
- Ogawa, H., Cummins, G.I., Jacobs, G. a, Miller, J.P., 2006. Visualization of ensemble activity patterns of mechanosensory afferents in the cricket cercal sensory system with calcium imaging. *J. Neurobiol.* 66, 293–307.
- Paredes, R.M., Etzler, J.C., Watts, L.T., Zheng, W., Lechleiter, J.D., 2008. Chemical calcium indicators. *Methods* 46, 143–51.
- Park, J., Koito, H., Li, J., Han, A., 2009. A multi-compartment CNS neuron-glia Co-culture microfluidic platform. *J. Vis. Exp.*
- Perea, G., Araque, A., 2005. Glial calcium signaling and neuron-glia communication. *Cell Calcium* 38, 375–382.
- Poli, D., Pastore, V.P., Massobrio, P., 2015. Functional connectivity in in vitro neuronal assemblies. *Front. Neural Circuits* 9, 1–14.
- Rizk, S.S., Paduch, M., Heithaus, J.H., Duguid, E.M., Sandstrom, A., Kossiakoff, A. a, 2011. Allosteric control of ligand-binding affinity using engineered conformation-specific effector proteins. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 18, 437–442.
- Rose, G., Siebler, M., 1995. Cooperative effects of neuronal ensembles. *Exp. brain Res.*

- Scatchard, G., 1949. The Attractions of Proteins for Small Molecules and Ions. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 51, 660–672.
- Schock, S.C., Jolin-Dahel, K.S., Schock, P.C., Theiss, S., Arbuthnott, G.W., Garcia-Munoz, M., Staines, W. a, 2012. Development of dissociated cryopreserved rat cortical neurons in vitro. *J. Neurosci. Methods* 205, 324–33.
- Sebastian Seung, 2013. *Connectome: How the Brain's Wiring Makes Us Who We Are*, Mariner Books
- Shein Idelson, M., Ben-Jacob, E., Hanein, Y., 2010. Innate synchronous oscillations in freely-organized small neuronal circuits. *PLoS One* 5, e14443.
- Shepherd, R.K., Javel, E., 1999. Electrical stimulation of the auditory nerve: II. Effect of stimulus waveshape on single fibre response properties. *Hear. Res.* 130, 171–188.
- Sherman, a J., Shrier, a, Cooper, E., 1999. Series resistance compensation for whole-cell patch-clamp studies using a membrane state estimator. *Biophys. J.* 77, 2590–2601.
- Shi, B.-X., Wang, Y., Zhang, K., Lam, T.-L., Chan, H.L.-W., 2011. Monitoring of dopamine release in single cell using ultrasensitive ITO microsensors modified with carbon nanotubes. *Biosens. Bioelectron.* 26, 2917–21.
- Shindo, Y., Fujimoto, A., Hotta, K., Suzuki, K., Oka, K., 2010. Glutamate-induced calcium increase mediates magnesium release from mitochondria in rat hippocampal neurons. *J. Neurosci. Res.* 88, 3125–32.
- Simms, B.A., Zamponi, G.W., 2014. Neuronal voltage-gated calcium channels: structure, function, and dysfunction. *Neuron* 82, 24–45.
- Smetters, D., Majewska, a, Yuste, R., 1999. Detecting action potentials in neuronal populations with calcium imaging. *Methods* 18, 215–21.

- Soudry, D., Meir, R., 2012. Conductance-based neuron models and the slow dynamics of excitability. *Front. Comput. Neurosci.* 6, 4.
- Stacey, W.C., Durand, D.M., 2000. Stochastic resonance improves signal detection in hippocampal CA1 neurons. *J Neurophysiol* 83, 1394–1402.
- Stacey, W.C., Durand, D.M., 2001. Synaptic noise improves detection of subthreshold signals in hippocampal CA1 neurons. *J. Neurophysiol.* 86, 1104–1112.
- Stacey, W.C., Durand, D.M., 2002. Noise and coupling affect signal detection and bursting in a simulated physiological neural network. *J. Neurophysiol.* 88, 2598–611.
- Stacey, W.C., Lazarewicz, M.T., Litt, B., 2009. Synaptic noise and physiological coupling generate high-frequency oscillations in a hippocampal computational model. *J. Neurophysiol.* 102, 2342–57.
- Stetter, O., Battaglia, D., Soriano, J., Geisel, T., 2012. Model-free reconstruction of excitatory neuronal connectivity from calcium imaging signals. *PLoS Comput. Biol.* 8, e1002653.
- Sun, X., Gillis, K.D., 2006. On-chip amperometric measurement of quantal catecholamine release using transparent indium tin oxide electrodes. *Anal. Chem.* 78, 2521–5.
- Suzuki, I., Fukuda, M., Shirakawa, K., Jiko, H., Gotoh, M., 2013. Carbon nanotube multi-electrode array chips for noninvasive real-time measurement of dopamine, action potentials, and postsynaptic potentials. *Biosens. Bioelectron.*
- Suzuki, I., Yasuda, K., 2007. Detection of tetanus-induced effects in linearly lined-up micropatterned neuronal networks: application of a multi-electrode array chip combined with agarose microstructures. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 356, 470–5.

- Takayama, Y., Moriguchi, H., Kotani, K., Jimbo, Y., 2009a. Spontaneous calcium transients in cultured cortical networks during development. *IEEE Trans. Biomed. Eng.* 56, 2949–56.
- Takayama, Y., Moriguchi, H., Saito, A., Kotani, K., Jimbo, Y., 2009b. Ensemble stimulation of embryoid bodies using microfabricated ITO substrates. *Conf. Proc. IEEE Eng. Med. Biol. Soc.*
- Takayama, Y., Saito, A., Moriguchi, H., Kotani, K., Jimbo, Y., 2011a. Ensemble recording of electrical activity in neurons derived from P19 embryonal carcinoma cells. *Electron. Commun. Japan* 94, 9–19.
- Takayama, Y., Saito, A., Moriguchi, H., Kotani, K., Suzuki, T., Mabuchi, K., Jimbo, Y., 2011b. Simultaneous induction of calcium transients in embryoid bodies using microfabricated electrode substrates. *J. Biosci. Bioeng.* 112, 624–9.
- Tanamoto, R., Shindo, Y., Miki, N., Matsumoto, Y., Hotta, K., Oka, K., 2015. Electrical stimulation of cultured neurons using a simply patterned indium-tin-oxide (ITO) glass electrode. *J. Neurosci. Methods* 253, 272–278.
- Tao, P., Viswanath, A., Schadler, L.S., Benicewicz, B.C., Siegel, R.W., 2011. Preparation and optical properties of indium tin oxide/epoxy nanocomposites with polyglycidyl methacrylate grafted nanoparticles. *ACS Appl. Mater. Interfaces* 3, 3638–3645.
- Ullian, E.M., Sapperstein, S.K., Christopherson, K.S., Barres, B. a, 2001. Control of synapse number by glia. *Science* 291, 657–61.
- Wagenaar, D.A., Madhavan, R., Pine, J., Potter, S.M., 2005. Controlling bursting in cortical cultures with closed-loop multi-electrode stimulation. *J. Neurosci.* 25, 680–8.
- Wallach, A., Marom, S., 2012. Interactions between network synchrony and the dynamics of neuronal threshold. *J. Neurophysiol.* 107, 2926–36.

- Wang, R., Xu, Z., 2016. Pyrolysis characteristics and pyrolysis products separation for recycling organic materials from waste liquid crystal display panels. *J. Hazard. Mater.* 302, 45–56.
- Weitz, A.C., Behrend, M.R., Ahuja, A.K., Christopher, P., Wei, J., Wuyyuru, V., Patel, U., Greenberg, R.J., Humayun, M.S., Chow, R.H., Weiland, J.D., 2014. Interphase gap as a means to reduce electrical stimulation thresholds for epiretinal prostheses. *J. Neural Eng.* 11, 016007.
- Weitz, A.C., Behrend, M.R., Lee, N.S., Klein, R.L., Chiodo, V. a, Hauswirth, W.W., Humayun, M.S., Weiland, J.D., Chow, R.H., 2013. Imaging the response of the retina to electrical stimulation with genetically encoded calcium indicators. *J. Neurophysiol.* 109, 1979–88.
- Wierenga, C.J., Walsh, M.F., Turrigiano, G.G., 2006. Temporal regulation of the expression locus of homeostatic plasticity. *J. Neurophysiol.* 96, 2127–33.
- Yamanaka, R., Shindo, Y., Karube, T., Hotta, K., Suzuki, K., Oka, K., 2015. Neural depolarization triggers Mg^{2+} influx in rat hippocampal neurons. *Neuroscience* 310, 731–741.
- Zhan, W., Alvarez, J., Crooks, R.M., 2002. Electrochemical sensing in microfluidic systems using electrogenerated chemiluminescence as a photonic reporter of redox reactions. *J. Am. Chem. Soc.* 124, 13265–70.

公刊論文目録および口頭発表目録

本論文に関する原著論文

Tanamoto R., Shindo Y., Miki N., Matsumoto Y., Hotta K., Oka K.
Electrical stimulation of cultured neurons using a simply patterned
indium-tin-oxide (ITO) glass electrode., *Journal of neuroscience methods*,
253, 272-278 (2015)

Tanamoto R., Shindo Y., Niwano M., Matsumoto Y., Miki N., Hotta K.,
Oka K., Qualitative and quantitative estimation of comprehensive synaptic
connectivity in short- and long-term cultured rat hippocampal neurons with
new analytical methods inspired by Scatchard and Hill plots., *Biochemical
and biophysical research communications*, in press

その他の論文

Shidara H., Kobayashi J., Tanamoto R., Hotta K., Oka K. Odorant-induced
membrane potential depolarization of AIY interneuron in *Caenorhabditis
elegans*., *Neuroscience Letters*, 541, 199–203 (2013)

国際会議

Tanamoto R., Hotta K., Oka K. Ca imaging of hippocampal neurons on
ITO glass electrodes., *Society for Neuroscience 2011*, 2011.11.12-16,
Washington, DC, USA

Shidara H., Kobayashi J. Tanamoto R., Hotta K., Oka K., Neural activity
visualization of AIY interneuron in *Caenorhabditis elegans* with
voltage-sensitive fluorescent protein, *Society for Neuroscience 2012*,
2012.10.13-17, New Orleans, USA

Niwano M., Tanamoto R., Shimoi T., Matsumoto Y., Hotta K., Oka K.,
Analysis of periodically synchronized activities in cultured neural networks,
Society for Neuroscience 2012, 2012.10.13-17, New Orleans, USA

Shidara H., Kobayashi J. Tanamoto R., Hotta K., Oka K., AIY interneurons involved in the cross modality adaptation in *Caenorhabditis elegans*, Society for Neuroscience 2013, 2013.11.9-13, San Diego, USA

国内会議

棚元亮、堀田耕司、三木則尚、松本佳宣、岡浩太郎: μ デバイスを用いた神経細胞形態変化とカルシウムイオン動態に関する研究、第19回日本バイオイメージング学会学術集会、2010/9/9-11、日吉、神奈川県

棚元亮、庭野真理子、堀田耕司、三木則尚、松本佳宣、岡浩太郎: 第20回日本バイオイメージング学会学術集会、2011/8/31-9/2、北海道

棚元亮、庭野真理子、堀田耕司、三木則尚、松本佳宣、岡浩太郎: ITO ガラス上での海馬神経細胞の Ca イメージング、第34回日本神経科学大会、2011年9月14-17日、横浜

棚元亮、庭野真理子、堀田耕司、松本佳宣、岡浩太郎: ITO ガラスを用いた海馬ニューロンの閾値とネットワークの解析、第35回日本神経科学大会、2012年9月18-21日、名古屋

棚元亮、新藤豊、庭野真理子、堀田耕司、松本佳宣、岡浩太郎: ITO ガラス電極を用いた対電極を用いない定電流刺激によるシナプス接続変化の観察、第38回日本神経科学大会、2015年7月28-31日、神戸

設楽久志、小林純也、棚元亮、堀田耕司、岡浩太郎: 線虫 AIY 介在神経細胞における膜電位イメージング、第35回日本神経科学大会、2012年9月18-21日、名古屋

庭野真理子、棚元亮、堀田耕司、松本佳宣、岡浩太郎: 培養神経ネットワークでの記憶保持のための周期的同期活動、第35回日本神経科学大会、2012年9月18-21日、名古屋

設楽久志、小林純也、棚元亮、堀田耕司、岡浩太郎: 線虫 AIY 介在神経細胞での局在した神経活動: 蛍光イメージングによる研究、第50回日本生物物理学会年会、2012年9月22-24日、名古屋

設楽久志、小林純也、棚元亮、堀田耕司、岡浩太郎: 膜電位イメージングが明らかにした線虫 AIY 介在神経細胞での部位特異的な神経活動、2013年2月22日、新学術領域研究 「蛍光生体イメージ」 第3回 Vivid Workshop 金沢

設樂久志、小林純也、棚元亮、堀田耕司、岡浩太郎: 線虫における交差順応、第36回日本神経科学大会、2013年6月20-23日、京都

庭野真理子、棚元亮、堀田耕司、岡浩太郎: 培養神経ネットワークでの確率共鳴、第36回日本神経科学大会、2013年6月20-23日、京都

設樂久志、小林純也、棚元亮、堀田耕司、岡浩太郎: 線虫においてあるモダリティーが異なるモダリティーの順応を引き起こす、第51回日本生物物理学会年会、2013年10月28-30日、京都

設樂久志、小林純也、棚元亮、堀田耕司、岡浩太郎: 第22回日本バイオイメージング学会学術集会、2013/9/14-9/16、東京大学、東京

山中龍、新藤豊、苅部堯応、棚元亮、堀田耕司、鈴木孝治、岡浩太郎: ラット海馬神経細胞における神経活動にともなう細胞内マグネシウムイオン濃度上昇、第37回日本神経科学大会、2014年9月11-13日、横浜

謝辞

本研究は、著者が慶應義塾大学大学院理工学研究科後期博士課程在学中に、同大学理工学研究科基礎理工学専攻の岡浩太郎教授の指導のもとに行ったものである。

本研究を遂行するに当たり慶應義塾大学大学院理工学研究科基礎理工学専攻の教授岡浩太郎先生には、私が博士課程に入学してから研究に対しても人間としても未熟な私をご指導していただきました。失礼なことも多々あったことかと存じますが、私のことを辛抱強く面倒を見ていただいたことに何より感謝しております。先生の生徒個人に自ら考え実践させて自立した研究者を育成する教育方法は大変素晴らしいものであり、そのおかげで私も他の方に頼らずに物事を自ら率先して追究していく姿勢を身につけることができたと思っております。また、先生の研究者としての物事への洞察力やアイデアの素晴らしさに常々感服しておりました。ここに改めて謹んで篤く御礼申し上げますとともに、今後とも更なるご活躍の程をお祈り申し上げます。

本論文の執筆にあたり、卒論修論というご多忙な時期にも関わらず御指示、御高配を賜りました、慶應義塾大学理工学研究科基礎理工学専攻の教授 松本佳宣先生、同専攻准教授舟橋啓先生、同専攻准教授 土居信英先生に深く感謝申し上げます。先生方のご意見なしに本論文の完成はありえませんでした。ここに謹んで篤く御礼申し上げます。

慶應義塾大学理工学研究科基礎理工学専攻の専任講師 堀田耕司先生は、先生でありながら生徒と同じ目線で心優しくご指導していただき、一緒に仕事をやっていてとても和む方でした。先生の生徒と積極的に触れ合うお姿が、気づけば私の中でも先生としての理想像となっておりました。ここに謹んで御礼申し上げますとともに、更なるご活躍をお祈り申し上げます。

慶應義塾大学理工学研究科基礎理工学専攻の特任助教 新藤豊博士には、私が岡研究室に入った時から同じ細胞班の中で実験技術についても論文を執筆方法についても身近に相談させていただいておりました。私が研究を進める中で迷走してしまったとき、いつもご親切にお声をかけて下さったことが、何よりの心の支えであり、研究に対するモチベーションを掻き立てるものであり、彼の存在は常に私にとってはかけがえのないものでした。ここに謹んで篤く御礼申し上げますとともに、更なるご活躍をお祈り申し上げます。

岡研究室共同研究員である下井利修氏には、ここ数年の間お隣の席で私が研究でつまずいたり悩んでいたとき、研究についてのアドバイスや指摘のみならず、その他心の悩みの相談にのって下さることもありました。ここに謹んで篤く御礼申し上げます。

私と同じく博士課程であり共に研究を行ってきた山中龍氏、設楽久志氏、鈴木李夏氏は私の中では研究をする上でのライバルでありつつ、いざというときに助け合えるよき仲間でもありました。彼らには負けたくないという気持ちがあったからこそ私はここまで頑張ることができたといっても過言ではありません。共に研究ができたことに深く感謝しております。

岡研究室 OB(現 東京大学博士研究員)の中村允博士とは年齢も近く、私と共に長年博士課程で過ごしてきました。彼の何事に対しても前向きに明るく生きる姿に、私も研究者として見習わなければならないことがあることを感じさせられました。共に研究ができたことに深く感謝しております。

学年としては後輩でありながら私より先に岡研究室にいた、岡研究室 OB 森澤勇馬氏、持田毅彦氏、寺久保洋氏、高山文博氏、山崎亮輔氏に感謝いたします。私が研究室に入りたてで右も左も分からなかった頃、私に実験のための装置や器具の扱い方をご親切に教えて下さったことは、今でも決して忘れることがないほどいい思い出です。

私と同時期に岡研究室に入った OB・OG の小林純也氏、奥田圭輔氏、寺井淳氏、日良祐一朗氏、山本真千子氏、彼らと同期で翌年岡研究室に入った OB 大野陽平氏と共に研究ができたことに感謝いたします。私が岡研に入りたて当初、周囲にいる方が年下ばかりでどのように接していけば分からなかった頃、年齢の壁なく同じレベルで私に接して下さったとき、これほど嬉しかったことはありませんでした。

細胞班の中の先輩 OB である新野祐介博士、藤井智彦博士は、私が岡研究室に入りたての頃、ディスカッションでの鋭いご指摘をしていただいたことを今でも鮮明に覚えております。当時まだまだ未熟であった私に、本来研究者はこうあるべきである、ということを深く痛感させられました。共に研究ができたことに、謹んで篤く御礼申し上げます。

細胞班後輩 OB・OG 小林孝彦氏、永瀬史章氏、庭野真理子氏にも感謝いたします。小林氏はカメラの使い方にとっても詳しく、夜通しで実験を行っていた姿が今でも忘れられません。永瀬氏はムードメーカー的な存在で気持ちが沈んでいる時も彼と話して元気が出ることも多々ありました。庭野氏は私の下で ITO ガラス電極を使った実験を共に行っていた頼もしい存在であり、一緒に実験をやっていて私一人では分からなかったことを教えて頂くこともありました。

細胞班の現役の後輩である中井友美氏、宋戸萌香氏と共に研究を行えたことにも感謝しております。若くてとても頑張っている姿を見て、私も元気をいただき研究活動に専念できたと思っております。

こちらでお名前を挙げるができなかった現役の方や OB・OG の方の中にも、私が岡研究室に入ってからお世話になった方は多く、ここに謹んで篤く御礼申し上げます。

最後に、私がなかなか学位を取得できないでいたなかで常に心配しつつ支援して下さった両親に感謝いたします。また私が大学に入った段階ではまだ小学生でありながら、先に社会人として立派に働きつつ私を見守ってくれた弟にも感謝します。さらにはこの 7 年の間に他界された祖父祖母の皆様のご冥福をお祈りするとともに、これまで私の人生を見守ってくださったことに謹んで篤く御礼申し上げます。

2016 年 2 月
棚元 亮