19a-A2-8

セルケージパターンを有する培養基板上の神経細胞のカルシウムイメージングに用いる灌流装置の開発

Development of perfusion apparatus for calcium imaging of neurons on culture substrate with cell cage pattern

名大　革新ナノバイオデバイス研究センター[1]，JST-CREST[2]，名大　環境医学研究所[3]

○小林　啓[1,2]、長岡　靖崇[1,2]、王　志宏[1,2]、小松　由紀夫[3]、宇理須　恒雄[1,2]

Nagoya Univ. FIRST Research Center for Innovative Nanobiodevices[1], JST-CREST[2], Nagoya Univ. RIEM[3]

°Kei Kobayashi[1,2], Yasutaka Nagaoka[1,2], Zhi-Hong Wang[1,2], Yukio Komatsu[3], Tsuneo Urisu[1,2]

E-mail: kei.kobayashi@nanobio.nagoya-u.ac.jp

我々は、セルケージパターンを有する培養基板上に、ヒトの iPS 細胞から分化誘導した運動ニューロンを播種・培養し、細胞同士がシナプスを介して連結した神経細胞ネットワークの形成を目指している。特に、筋委縮性側索硬化症(ALS)やアルツハイマー病などの神経変性疾患患者から樹立した iPS 細胞からの分化した運動ニューロンを用いて形成したネットワークは、疾患を表現するモデルチップとして、病気の原因の解明への利用が期待できる。

神経変性疾患において、カルシウムは重要な生存決定因子である。例えば、ALS においては異常なカルシウム透過性が観察されている。カルシウムイメージング法は、蛍光指示薬を細胞に取り込ませることによって細胞内カルシウム濃度変化を観察する方法である。カルシウムイメージング法の神経細胞ネットワークへの適用において、ネットワークへの神経伝達物質の容易な添加および除去が可能になれば、疾患モデルチップにおける異常の同定への貢献および薬剤添加による人為的な疾患表現が期待できる。そこで、簡易な灌流装置を作製し、神経伝達物質による神経細胞内カルシウム濃度の変化を観察することにした。

ディッシュ内のジメチルポリシロキサン(PDMS)の一部を切り抜き、灌流する溶液の流入路と流出路、および培養基板の設置場所を含む灌流チャンバを作製した(Fig. 1)。ラットの大脳から単離し、培養基板上に播種・培養した細胞にカルシウム蛍光指示薬 Oregon green 488 BAPTA-1 (invitrogen)を取り込ませた後、基板をチャンバに設置した。興奮性神経伝達物質であるグルタミン酸を含む溶液を灌流し、細胞をタイムラプス撮影することによって、神経細胞内のカルシウム濃度の経時的な変化を観察した結果、グルタミン酸存在下において内部のカルシウム濃度の一時的な増加を断続的に繰り返す細胞を同定した(Fig. 2)。

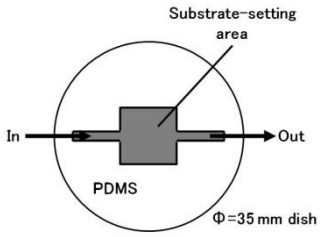

Fig. 1 Perfusion chamber.
PDMS in grey area was cut out.

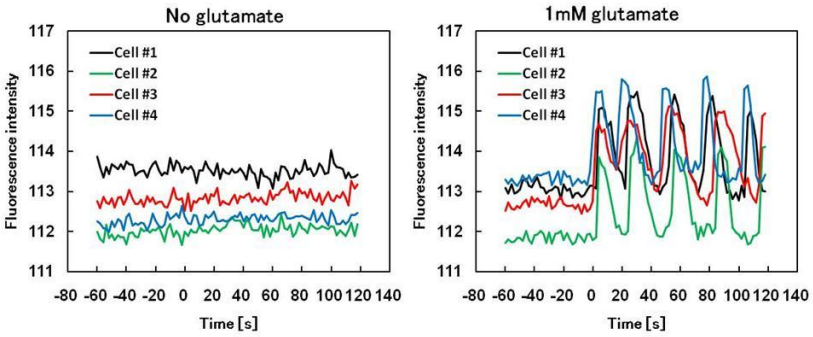

Fig. 2 Transiently increased intraneuronal calcium concentration caused by perfused glutamate.
Perfusate reached into the chamber at 0 s.

© 2014 年　応用物理学会