

## マイクロパターン上の神経細胞への2針電極による刺激とその応答計測 Stimulation of micropatterned neuron with a pair of needle electrodes and the activity measurement

早大理工<sup>1</sup>, 東北大通研<sup>2</sup>, 東北大 AIMR<sup>3</sup>

○ 鞍掛 碧流<sup>1</sup>, 服部 晃平<sup>1</sup>, 今井 絢子<sup>1</sup>, 橋本 拓弥<sup>1</sup>, 佐藤 晃揮<sup>1</sup>, 高橋 穂乃歌<sup>1</sup>,  
小熊 奏一郎<sup>1</sup>, 石田 実穂子<sup>1</sup>, 山本 英明<sup>2</sup>, 平野 愛弓<sup>2,3</sup>, 谷井 孝至<sup>1</sup>

Waseda Univ.<sup>1</sup>, Tohoku Univ. RIEC<sup>2</sup>, Tohoku Univ. AIMR<sup>3</sup>

○ Hekiru Kurakake<sup>1</sup>, Kouhei Hattori<sup>1</sup>, Junko Imai<sup>1</sup>, Takuya Hashimoto<sup>1</sup>, Koki Sato<sup>1</sup>,  
Honoka Takahashi<sup>1</sup>, Soichiro Oguma<sup>1</sup>, Mihoko Ishida<sup>1</sup>,  
Hideaki Yamamoto<sup>2</sup>, Ayumi Hirano-Iwata<sup>2,3</sup>, Takashi Tani<sup>1</sup>

E-mail: kurakake@tani.nano.waseda.ac.jp

【研究背景】特定の神経細胞への電気刺激は神経細胞回路の活動制御に必須な技術である。このために、これまではパッチクランプ法や微小電極アレイを利用するのが一般的であった<sup>1,2)</sup>。しかしながら、前者は侵襲的であるため長期的計測に、後者は固定電極であるため特定部位への局所刺激に難がある。前回の報告<sup>3)</sup>では、パターンニングした神経細胞に、2針電極刺激装置を適用した最初の計測結果を報告した。今回、オータプスを持つ単一神経細胞、または、少数個の神経細胞からなる回路に対して、より詳細に電圧印加条件を制御し、刺激前後での神経細胞の活動を観測したので、その結果を報告する。

【実験方法】フォトリソグラフィにより、ガラス基板の上に細胞接着領域と非接着領域からなるマイクロパターンを作製した。ラット大脳皮質神経細胞をこのマイクロパターン上で12日間培養した。倒立型顕微鏡に2針電極用の3軸並進機構を新たに付加し、それに針電極をセットした。2本の針はW(タングステン)製で、絶縁コーティングされており、先端部のみのWが露出している。この2針電極に顕微鏡像の焦点を合わせて神経細胞近傍に接近させ(Fig. 1)、2本の針電極間に電圧パルス(例えば、Fig. 2)による電気刺激を加えた。このときの神経細胞の活動をCaイメージング法により計測した。顕微鏡のステージ高さ制御を用いたピント調節により、基板表面と各針電極間との距離を約0.25  $\mu\text{m}$ に調節した。2針電極用の並進機構により、2本の針電極間距離を100  $\mu\text{m}$ ~1 mmに変化させた。

【実験結果】Caイメージング法により取得した蛍光強度(細胞内Ca<sup>2+</sup>濃度)の時間変化をFig. 3に示す。同図に点線で示したタイミングで刺激電圧パルスを印加した。Fig. 3には、10回のパルス印加を1まとまりとして、これを2回繰り返した際の結果が示されている。この10回のうち、最初のパルス振幅が1 Vp-pに、次のパルス振幅が2 Vp-pに、そして最後のパルス振幅が10 Vp-pになるように、パルス毎に1 Vずつ振幅を増加した(Fig. 2)。Fig. 1に示すように、針電極間隔を約120  $\mu\text{m}$ とすると、再現性よく5番目のパルス(5 Vp-p)で細胞が発火した。針電極間距離や、細胞体と電極との相対位置に対して、発火を誘起できる電圧には相関が見られた。これらの結果は、マイクロパターンニング法と融合させることにより、回路中の標的細胞のみに刺激を導入できる可能性を示している。

なお、本研究は科研費(18K19026)および早稲田大学特定課題研究助成費(BARE004443)の助成を受けている。

1) E. Neher, *et al.*, *Nature*, **260** (1976) 799.

2) C. A. Thomas Jr., *et al.*, *Exp. Cell Res.* **74** (1972) 61.

3) K. Hattori., *et al.*, The 80th JSAP Autumn Meeting 2019, PB1-34.

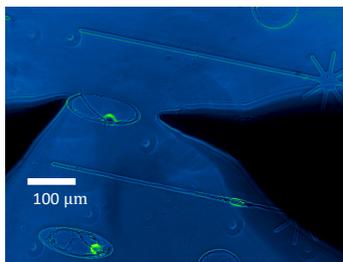


Fig. 1 Phase contrast image of the single neuron cultured on a micropattern. A pair of needle electrodes are also shown.

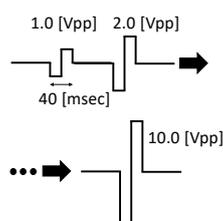


Fig. 2 Waveform of the input voltage pulses for stimulation.

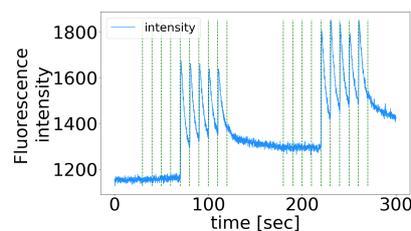


Fig. 3 Intensity of the fluorescence emitted from the targeted neuron. The dotted lines indicate the time when the voltage pulses were applied.