

## 集光フェムト秒レーザー照射に伴う神経回路網の誘発応答解析

### Analysis of neuronal network activity induced by a focused femtosecond laser

阪市大院理 ◯瀬川 夕海, 箕嶋 渉, 細川 千絵

Osaka City Univ., ◯Yumi Segawa, Wataru Minoshima, Chie Hosokawa

E-mail: m20sb018@vh.osaka-cu.ac.jp

ヒト脳内の約 1000 億個の神経細胞はシナプス結合を介して複雑なネットワークを形成している。神経回路網の結合特性と伝達強度は外部刺激に応じて変化することが知られ、記憶や学習に重要な役割を果たしている。従来の刺激手法である電気刺激手法や薬理学的手法はパーキンソン病やてんかんの治療法として利用されているが、組織に対する侵襲性や空間分解能の低さが問題となる。そこで我々は、高精度かつ非侵襲な刺激が期待できるフェムト秒レーザーを用いて神経細胞の活動を誘発し、蛍光  $\text{Ca}^{2+}$  イメージングと細胞外電位計測によりレーザー照射に伴う神経細胞の活動変化を評価した。従来の電気刺激手法と比較することにより、フェムト秒レーザー照射に伴う神経回路網の誘発応答の特性について検証した。

フェムト秒チタンサファイアレーザー (パルス幅:  $\sim 100$  fs, 中心波長: 800 nm, 繰り返し周波数: 82 MHz) を正立型蛍光顕微鏡に導入し、60 倍水浸対物レンズにより  $8 \times 8$  個の多電極アレイ (電極間隔:  $150 \mu\text{m}$ , 電極サイズ:  $50 \times 50 \mu\text{m}$ ) 上に播種したラット海馬由来培養神経細胞に集光した。蛍光カルシウム指示薬 Oregon Green BAPTA-1, AM (OGB-1) を神経細胞に負荷してレーザー照射に伴う細胞内  $\text{Ca}^{2+}$  濃度変化について評価し、多点電極アレイを用いた細胞外電位多点計測によりレーザー照射に伴う細胞外電位変化を解析した。OGB-1 を負荷した培養 18 日目の神経細胞にフェムト秒レーザー (レーザー光強度: 30 mW, レーザー照射時間: 8 ms) を照射したところ、細胞体において蛍光強度が急激に増大し、細胞外  $\text{Ca}^{2+}$  の流入が確認された (Fig. 1(a)). また、レーザー照射直後より複数の電極において細胞外電位のスパイクが見られ (Fig. 1(b)), 約 60 ms にわたって高頻度なスパイク変動が持続した (Fig. 2). 対照実験として、レーザー照射した神経細胞に隣接する電極に双極パルス電流 (電流振幅:  $5 \mu\text{A}$ , 電流パルス幅:  $100 \mu\text{s}$ ) を印加したところ、印加直後に細胞外電位のスパイクがみられ、その後約 40 ms にわたって高頻度なスパイク変動が確認された。フェムト秒レーザー照射で誘発された神経活動は、電気刺激により誘発された活動と比べ長時間にわたり持続することが示唆された。講演では、レーザー照射に伴い誘発された電位変化の空間伝搬についても報告する。

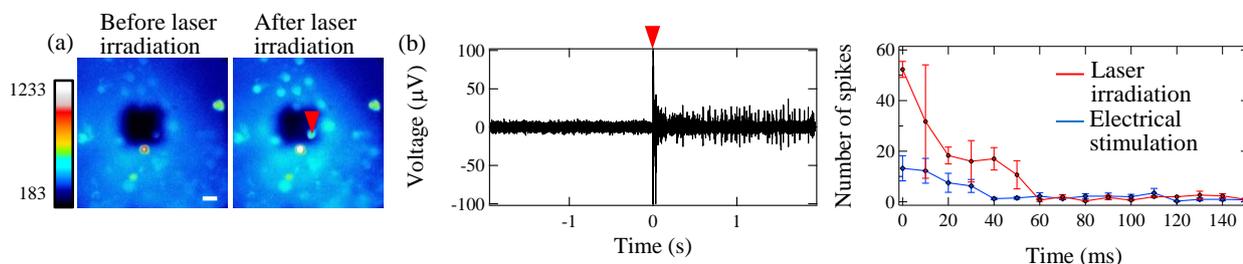


Fig. 1 (a) Fluorescence images and (b) electrical activity changes of neurons (18 DIV) before and after laser irradiation. Red arrows indicate the laser focus and the irradiation time, respectively. The scale bar is 20  $\mu\text{m}$ .

Fig. 2 Time courses of the number of spikes in neuronal networks at all electrodes after laser irradiation (red line) and electrical stimulation (blue line).