Mechanical Dissociation of Retinal Neurons with Vibration

Tamami Motomura Student Member (Kumamoto University)

Yuki Hayashida Member (Kumamoto University, yukih@cs.kumamoto-u.ac.jp)

Nobuki Murayama Member (Kumamoto University)

Keywords : neurophysiological engineering, neuromorphic device, single neuron, nonlinear membrane conductance, cell dissociation, patch-clamp technique

The neuromorphic artificial device, like silicon retinas, has been collecting much attention in the engineering fields in the last decade. Concurrently, progress in neuroscience research has revealed the nonlinear computation in single neuron levels, suggesting that individual neurons are not merely the circuit elements but computational units. Thus, elucidating the properties of neuronal signal processing is thought to be an essential step for developing the next generation of neuromorphic devices. However, the methods previously used for dissociating the retinal tissue into single neurons have commonly entailed enzymatic digestions which might distort the membrane conductances. In the present study, we developed a new method for dissociating neurons from specific sublayers of mammalian retinas with using no proteolytic enzyme but rather combining tissue incubation in a low- Ca^{2+} medium and the vibro-dissociation technique developed for the slices of brains and spinal cords previously.

Figure 1 shows the protocol in the method for dissociating cells from the ganglion cell layer (see the legend for detail). When compared with the conventional enzymatic method, our method took shorter time of the procedure, and required less elaborate skill; nevertheless it yielded enough number of the neurons available for acute electrophysiological experiments. The isolated neurons were in morphologically good condition, and could be identified as ganglion cells with the size criterion. Those cells were useful for the measurements of intrinsic membrane properties under the perforated-patch whole-cell configuration. In response to depolarizing constant current injections, some of the cells could generate spikes in the sustained manner with the accommodation and some others showed transient firing or burst of spikes. Under the voltage-clamp, the cells showed the large amplitude of voltage-gated Na^+ current and the delayed activation of net outward currents in response to depolarization steps. Moreover, since the cells dissociated by our method were never exposed to proteolytic enzymes, they enabled us to examine the effects of enzymatic digestion on the membrane properties in those cells. Spike firing of the cells in response to a depolarizing current injection was continuously recorded before, during and after the application of an enzyme solution. And we found an evidence for possible distortion of the membrane excitability by the enzyme. These results indicate that the single retinal neurons dissociated by our new method are superior to ones dissociated by the previous enzymatic method, in terms of the native electrophysiological properties without the influence of proteolysis. We believe this is valuable for quantitative analyses on the computational properties in single neuron levels.

Fig. 1. Protocol in the method we developed to dissociate retinal neurons. *A*, Low- Ca^{2+} tissue incubation. After isolating neuronal retinas from rat eyes, the tissue was cut into 2-4 pieces, and incubated in a low- Ca^{2+} medium for 3-5 min. TH: tissue holder. *B*, Microphotograph of the tip of a fire-blunted glass pipette. *C*, Vibrodissociation. After the low- Ca^{2+} incubation in *A*, the retinal piece was placed under a microscope. High-speed horizontal vibration was applied to the retinal surface with using the glass pipette (GP) mounted on the vibrator unit. Position of the pipette tip was controlled with the manipulator. *Top inset*, Photograph of the view in microscope. *Bottom inset*, Schematic drawing of the pipette vibrating at the retinal surface, and of the cells dissociated from the ganglion cell (GP) layer. PC: photoreceptor cell

網膜神経細胞の機械的振動単離法

学生員 本村 珠美* 正員 林田 祐樹*

正員 村山 伸樹*

Mechanical Dissociation of Retinal Neurons with Vibration

Tamami Motomura*, Student Member, Yuki Hayashida*, Member, Nobuki Murayama*, Member

The neuromorphic device, which implements the functions of biological neural circuits by means of VLSI technology, has been collecting much attention in the engineering fields in the last decade. Concurrently, progress in neuroscience research has revealed the nonlinear computation in single neuron levels, suggesting that individual neurons are not merely the circuit elements but computational units. Thus, elucidating the properties of neuronal signal processing is thought to be an essential step for developing the next generation of neuromorphic devices. In the present study, we developed a method for dissociating single neurons from specific sublayers of mammalian retinas with using no proteolytic enzymes but rather combining tissue incubation in a low- Ca^{2+} medium and the vibro-dissociation technique developed for the slices of brains and spinal cords previously. Our method took shorter time of the procedure, and required less elaborated skill, than the conventional enzymatic method did; nevertheless it yielded enough number of the cells available for acute electrophysiological experiments. The isolated retinal neurons were useful for measuring the nonlinear membrane conductances as well as the spike firing properties under the perforated-patch whole-cell configuration. These neurons also enabled us to examine the effects of proteolytic enzymes on the membrane excitability in those cells.

キーワード：神経生理工学，神経模倣型デバイス，単一神経細胞，非線形膜コンダクタンス，細胞単離，パッチクランプ法

Keywords : neurophysiological engineering, neuromorphic device, single neuron, nonlinear membrane conductance, cell dissociation, patch-clamp technique

1. はじめに

近年，生体神経の機能や構造を模倣した人工デバイスが工学の分野で注目を集めている。中でも十数年前に Mead らにより開発されたシリコン網膜は，脊椎動物網膜を持つ神経回路構造を CMOS 回路技術によりインプリメントしようとしたものであり，それまでの汎用電子計算機を用いたシステムが不得手とした感覚情報の並列実時間処理に対して，新しい実現手法を提案するものであった⁽¹⁾。しかし近年の神経科学研究により，それまで単純なアナログ素子として近似されてきた個々の神経細胞が，生体においては一つの演算ユニットとして機能していることが示されるようになってきた⁽²⁾。これは，神経細胞自体が持つ信号処理特性を定量的に明らかにすることが，次世代の生体神経模倣型デバイスを開発する上での重要なステップであることを示唆している。

最近，“時空間コントラスト順応”や“運動の予測”，“地と図の運動分離”などといった高次の視覚情報処理が，網膜の段階で既に始まっていることが分かってきた⁽³⁾。特に，回路の出力段に位置する神経節細胞において行われる非線形演算が，それら高次機能に大きく寄与していることが示唆されている^{(4)~(6)}。しかし，その処理を支える非線形膜特性に関しては定量的な生理学実験データが乏しく，依然として神経節細胞の正確なバイオフィジックスモデルを構築できるまでには至っていない^{(7)~(9)}。

一般的に回路の構成ユニットが持つ特性を計測するには，他との相互干渉を除くため，各ユニットを回路から切り離す必要がある。従来，神経組織より個々の神経細胞を単離する過程では，細胞間の結合を弱めるために蛋白質分解酵素を用いた処理が用いられてきた⁽¹⁰⁾。しかしながら神経細胞の細胞膜上に存在する伝達物質受容体やイオンチャネルの特性が，その酵素処理により著しく変性を受けてしまうことが報告されている (Na^+/K^+ /陽イオン/ Ca^{2+} チャネル^{(11)~(17)}，ACH/NMDA 受容体⁽¹⁷⁾⁽¹⁸⁾)。したがって過去の生理学実験で計測された神経細胞の受動的/能動的な膜特性

* 熊本大学大学院自然科学研究科
〒860-8555 熊本県熊本市黒髪 2-39-1
Graduate school of Sci. & Tech. Kumamoto Univ.,
2-39-1 Kurokami, Kumamoto-shi, Kumamoto 860-8555

は、その酵素処理の悪影響を受けている可能性がある。これに対し、酵素を一切使用することなく、主に機械的振動処理によって組織から神経細胞を単離する“vibro-dissociation 法”が近年開発され⁽¹⁹⁾、大脳基底核、視床下部、海馬、脊髄などのスライス試料に適用されてきた⁽²⁰⁾。そこで本研究では、網膜細胞の単離に有効な低濃度 Ca^{2+} 溶液インキュベーション⁽²¹⁾と、この機械的振動処理とを組み合わせ、網膜組織の特定の細胞層から神経細胞を機械的に単離する新規方法を開発した⁽²²⁾。さらに、この方法によって得られた単離神経細胞が、非線形膜特性の計測などの急性の電気生理学実験に使用可能な試料であるかを、perforated-patch whole-cell (穿孔パッチホールセル) 記録⁽²³⁾により検証した。

2. 実験方法

〈2・1〉 細胞単離 エーテル麻酔下のラット (Wistar 系、生後 7-25 日) より摘出した眼球をエタノール及び生理食塩水で濯いだのち、メンブレンフィルタ上に置き角膜側から十字に切開した (図 1A 上段)。レンズ、内境界膜等を取り除き、強膜より剥離した網膜を 2 片ないし 4 片に切り分けた (図 1A 中段)。網膜片は冷やした細胞外溶液内で一時保存した。この溶液の組成は (mM) : 140 NaCl, 3.5 KCl, 1 MgCl_2 , 2.5 CaCl_2 , 10 D-glucose, 5 HEPES であり、NaOH により pH 7.3 に滴定した (浸透圧は 280-290 mOsmol/kg⁽²⁴⁾)。表面加工の施された細胞培養皿 (3801, FALCON, Franklin Lakes, NJ ; 直径 35 mm) に網膜片を取り出し、神経節細胞層 (図中 GC layer) を上にして平らに広げ、ナイロン線と張った U 字型の試料押さえ (図中 TH) で固定した。組織内の細胞間結合を緩めるため、網膜片を low- Ca^{2+} 溶液中 (0.4 mM) にて 3-5 min のインキュベーションを行った (図 1A 下段)。ここで用いた low- Ca^{2+} 溶液の組成は (mM) : 140 sucrose, 2.5 KCl, 70 CsOH, 20 NaOH, 1 NaH_2PO_4 , 15 CaCl_2 , 20 EDTA, 11 D-glucose, 15 HEPES であり、HCl により pH 7.2 に滴定した (浸透圧は 290-300 mOsmol/kg)。この溶液中の推定遊離 Ca^{2+} 濃度は 100-200 nM であった。インキュベーション処理を施さなかった網膜試料においては、後述の機械的振動処理によって神経細胞は殆ど単離されなかった⁽²¹⁾。

インキュベーション終了後、熱処理により細く滑らかに加工したガラス管の先端を (図 1B, 図 1C 中 GP)、実体顕微鏡下のマニピュレータ操作により網膜片の表面に僅かに接触させ、水平方向に振幅 0.2-0.5 mm、周波数 10-100 Hz で振動させた (図 1C 上中段)。ガラス管は予め電動式の振動ユニット (SI-10, K. T. Labs., 埼玉; 振動周波数 10-100 Hz 可変) に取り付けられた。水平振動するガラス管で網膜表面全体を走査することにより、表層の神経節細胞層より細胞が単離された (図 1C 下段、以下、振動処理と呼ぶ)。網膜片 1 枚当たり約 5 min の振動処理を行った後、試料押さえと残った網膜片を取り除き、培養皿内を細胞外溶液 3ml で満たした。単離細胞を培養皿底面に定着させるため、培養皿を除振台上で 15 min 程度静置した。培養皿内の溶液を培養液 (上

図 1 開発した網膜神経細胞単離法の操作手順

Fig. 1. Protocol in the method we developed to dissociate retinal neurons. TH: tissue holder, GP: glass pipette, GC: ganglion cell, PC: photoreceptor cell.

記の細胞外溶液にウシ血清アルブミン 1 mg/ml を添加したもの) に新しく交換し、培養皿を除振台上でさらに 1.5 hr 以上静置して、単離操作によるダメージから細胞が十分回復するのを待った。但し、後述の膜電位固定実験における space-clamp の誤差要因を軽減するため⁽²⁵⁾、培養皿は室温 (20-25 $^{\circ}\text{C}$) に保ち、新たな神経突起が再生/伸張するのをできる限り抑えた⁽²⁶⁾ (図 5A)。また単離された段階で比較的長い神経突起を保持していた細胞は、膜電流固定実験に用いた (図 4A)。

今回開発した上述の単離方法に対し、従来の酵素を用いた方法でもラット網膜からの細胞単離を行った ($n=3$)。単離のプロトコルは過去の報告に倣った⁽²⁷⁾⁽²⁸⁾。まず剥離した網膜を酵素溶液中 (29 $^{\circ}\text{C}$) にて 20 min インキュベートした。酵素溶液には、0.25 mg/ml papain (#5125, Calbiochem), 2.5 mM L-cystein を上述の細胞外溶液に添加して用いた。酵素処理後、網膜を冷やした細胞外溶液にて、溶液を新しいものに交換しながら 6 回濯いだ (約 30-40 min)。なお始めの 2 回はウシ血清アルブミン 1 mg/ml を添加したものをを用いた。その後、ガラスピペットによる機械的処理 (trituration と呼ばれる) を、4-5 回の段階に分け熟練者の手により行った (約

30-50 min)。trituration 後の細胞懸濁液を培養皿に滴下し、単離細胞が底面に定着するのを待って培養液を満たした。

〈2・2〉電気生理学実験 上述の方法で単離した神経細胞を用い、膜電位固定下の非線形膜コンダクタンスの測定、および電流注入に対する活動電位（スパイク）発火応答の計測を行った。計測中、培養皿内の溶液を新鮮な細胞外溶液により絶えず灌流した。Y 字型灌流チューブの先端口（内径約 250 μm ）を計測対象の細胞から約 1 mm 離れた位置に置き、流量約 0.4 ml/min で溶液の供給を行った。培養皿の縁から溶液の排出を行い、培養皿内の液量を約 2 ml の一定に保った。試薬投与も Y 字型灌流チューブを用いて行った。

近年、網膜神経節細胞のスパイク発火及び膜コンダクタンスが Zn^{2+} や cAMP などの細胞内生理活性物質により修飾され、従来から広く用いられてきた ruptured-patch whole-cell 記録では、それらの特性が計測の時間経過と共に著しく変化してしまう事が示されている^{(29)~(31)}。そこで本研究においても、細胞内環境をできる限り保持するため、全ての計測を穿孔パッチホールセル記録にて行った。計測に用いるパッチ電極は、垂直式二段引きブラー（PC-10, NARISHIGE, 東京）を用い、洗浄・滅菌したホウケイ酸塩ガラス管（外径約 1.5 mm, 内径約 0.9 mm, 芯入）より、電極抵抗 4-8 M Ω となるよう作製した。電極内液の組成は（mM）：110 K-D-gluconic acid, 15 KCl, 15NaOH, 2.6 MgCl₂, 0.34 CaCl₂, 1 EGTA, 10 HEPES であり、methanesulfonic acid により pH7.2 に滴定した（浸透圧は 260 mOsmol/kg）。実験直前に、パッチ膜の穿孔剤として Amphotericin B⁽³²⁾を電極内液に添加し（260 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Amphotericin B, 200-400 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Pluronic F-127）、パッチ電極に後方充填した。なお電極先端には穿孔剤未添加の内液を充填した。細胞外溶液を寒天橋（10-20 mg/ml Agar, 150 mM NaCl）を介し接地した（信号アース）。電極先端と細胞膜とのギガオームシール形成後、穿孔剤の働きによってパッチ膜部の抵抗が 10-100 M Ω まで下がり安定するのを確認して計測を開始した。信号増幅にはパッチクランプアンプ（EPC-10, HEKA, Lambrecht）を用いた。必要に応じ、電極抵抗およびパッチ膜抵抗（以下、両抵抗の直列合成としてシリーズ抵抗と呼ぶ）、電極容量、膜容量をアンプの内部回路により補償した。パッチクランプアンプの出力信号は、アンプ内蔵の低域通過アナログフィルタ（初段：3-pole Bessel, 10-30 kHz cut-off; 後段：4-pole Bessel, 2-5 kHz cut-off）及び A/D 変換（5-20 kHz sampling）を介しパソコンに取り込んだ。データ取得と刺激波形生成には専用ソフト（pulse ver8.65-8.79, HEKA, Lambrecht）を用いた。計測は単離操作終了後 24 hr 以内に室温にて行った。その他詳細は過去の論文を参照⁽²¹⁾⁽³¹⁾。

3. 実験結果

〈3・1〉単離神経細胞 今回開発した新規方法によりラット網膜の神経節細胞層から単離した細胞を図 2 に示す。単離された細胞の多くはほぼ細胞体部のみであったが（図

図 2 網膜神経節細胞層より単離した細胞の顕微鏡写真

Fig. 2. Micrographs of cells dissociated from retinal ganglion cell layer.

2A 矢頭、図 5A)、中には樹状突起と思われる神経突起を保持した状態で細胞が単離される例もあった（図 2B-C, 図 4A）。また今回は室温下であったため、樹状突起のような比較的太い神経突起が新たに再生/成長することは殆ど無かったが、成長円錐の活動は確認された。位相差顕微鏡による観察から、細胞体の厚みと適度な透明度、膜表面の平滑さを認め、また単離後 48 hr 経過しても形態学的変性が認められないことから、新規単離法で得られた単一細胞試料が、少なくとも形態学的には健全な状態であると言えた。

ラット網膜の神経節細胞層には神経節細胞以外に異所性アマクリン細胞が存在する⁽³³⁾。但し過去のラット網膜単離細胞に関する形態学的研究によれば、細胞体直径が 12 μm よりも大きい細胞は神経節細胞として同定できる事が示されている⁽³⁴⁾。また別の研究では、神経節細胞の軸索切断後に核小体肥大が起こることが分かっている⁽³⁵⁾。本研究においても、細胞体直径が 13 μm 以上の細胞で僅かながら核小体肥大が見られ（図 2D-E 矢印）、神経節細胞の同定基準に関する過去の結果を支持するものであった。また 13 μm 以上の単離細胞に対して電流注入を行ったところ、全ての細胞でスパイク発火が惹起され、神経節細胞としての電気生理学的な必要条件を満たしていた。

〈3・2〉単離細胞数 単離される細胞の数と振動処理（〈2・2〉節参照）に用いる振動周波数との関係を調べた。その結果を図 3 に示す。なおここでは、細胞単離後 2-3 hr 経過した後、形態学的に健全と判断した細胞体直径 13 μm 以上の細胞のみを計数対象とした。このとき位相差顕微鏡による観察では、ステージ上に置いた培養皿内の中央直径約 20 mm 以内で正常な位相コントラストの像が得られた。従ってこの範囲内にある細胞を観察及び計数の対象とし、それ以外の培養皿内周辺にある細胞の計数は行わなかった。振動周波数には、10, 50, 100 Hz の 3 つを用い、各周波数につき二等分した網膜片 13 枚を用いた。その結果、網膜片 1 枚当たりの単離細胞数の平均±標準誤差は、10 Hz で 7.3 ± 1.2 , 50 Hz で 11.6 ± 1.4 , 100 Hz で 13.2 ± 1.4 となった。一元配置分散分析による検定の結果、3 群間に統計的有意差が認められ（ $F=5.06$, $P=0.012$ ）、また Holm-Sidak 法による多重比較の結果、10 Hz と 100 Hz との間に統計的有意差（ $t=3.07$, $P=0.004$ ）が認められた。そこで今回は主に 100 Hz の振動周

図3 振動周波数と単離細胞数との関係

Fig. 3. Number of large cells dissociated with different vibration frequencies.

波数を神経節細胞層からの細胞単離に用いた。

培養皿内周辺部では細胞の形態学的観察は困難であったが、単離された細胞は培養皿全体におよそ均一に分布していた。従って、100 Hzを用いた場合に両眼網膜から単離された細胞（但し細胞体直径 13 μm 以上）の総数は、培養皿底面の面積比率から平均 160 程度と推定された。今回、振動処理の時間を約 5 min としたが（2・1 節参照）、さらに長時間の処理を行うことで単離される細胞数は増加した。しかし通常の急性実験は単離後 24 hr 以内に行うことが多いため⁽³⁶⁾、上記の細胞数は単離細胞の電気生理学的特性の計測を行う上で十分な数であると判断した。

〈3・3〉 従来法との比較 今回、網膜組織の持つ層構造を利用することにより、神経節細胞層から選択的に細胞を単離した（図 2A）。形態学的観察のみからアマクリン細胞と細胞体直径の比較的小さい神経節細胞とを区別する事はできなかったが⁽³⁴⁾、少なくとも双極細胞や水平細胞と思われる細胞は殆ど単離されなかった。同様の手順により視細胞側に対して振動処理を適用した場合には、単離された細胞は 9 割以上が桿体視細胞（外節部と内節部が一体のもの、もしくは分離したもの）であった。これに対し酵素を用いた方法により細胞単離を行った場合には、細胞体直径 13 μm 以上の細胞の数は他の細胞に比べて数%に満たず、過去の報告と同様であった⁽³⁴⁾（図無し）。

新規方法においては、左右両方の眼球摘出から単離操作終了までに要する時間は 40-50 min であった。これに対し、従来の酵素処理を用いた方法では 2 倍以上の 1.5-2 hr を要した。このとき、酵素溶液中での網膜片のインキュベーション時間は 20 min としたが、過去の報告では 30 min 以上のインキュベーション時間を設けることもあり、この場合単離操作時間はさらに長くなる⁽²⁸⁾⁽³⁴⁾。

今回の方法では、機械的振動処理の振動は電動式で与え、操作も実体顕微鏡観察による直視下で行うため比較的容易に細胞単離が実行できる（図 1C）。未経験者（3 名）であっても、眼球摘出以降の操作について 10 回以下の訓練により確実に細胞を単離できるようになった。これに対し、従来

法で用いられる機械的処理（trituration）は実験者の手技に依存し、毎回安定した数や状態の細胞試料を得るには熟練を要する。今回も初心者（1 名）では単離細胞の数は非常に少なく、細胞の形態学的状態も良好でなかった（図無し）。

〈3・4〉 電気生理学的特性の計測 単離した網膜神経細胞が急性の電気生理学的計測に使用可能か検証する為、穿孔パッチホールセル記録法による電流注入及び膜電位固定の実験を行った。計測には直径 13 μm 以上の細胞体を持つ細胞を用いた。

図 4 に電流注入実験の記録例を示す。対象細胞の細胞体に対し（図 4A）、パッチ電極よりステップ状電流パルスを細胞内注入し、その時の膜電位応答を記録した（図 4B）。電流パルスは振幅を -20 pA から +60 pA（10 pA 刻み）とし、持続時間 500 msec で与えた（図中最下段）。各パルス間のインターバルは 10 sec とした⁽³¹⁾。この細胞における入力膜容量は約 5.5 pF、静止膜電位は約 -69 mV であった。過分極性電流注入に対しては、ほぼ線形的な膜電位変化が見られ（図中下から 2 段目）、膜電位約 -60 mV から -95 mV の範囲において過分極活性型陽イオン電流や内向き整流性 K^+ 電流の活性化はこの細胞では確認されなかった。注入電流と膜電位変化の振幅から求めた静止電位近傍の入力抵抗は約 1.2 G Ω であった。脱分極性電流注入に対しては、注入の時間経過に伴って順応的にスパイク間隔が延長する持続性スパイク発火が見られた（例；図中下から 3 段目）。電流振幅を増加させると、最初のスパイク発火までの潜時及びスパイク間隔は短くなった（図中上 5 段）。同様の電流注入実験を行った 50 例の細胞において、脱分極性電流注入に対して単発のみのスパイク発火を示すもの、一過性スパイク発火を示すもの、バースト状スパイク発火を示すものなど様々なものが観測された⁽²⁸⁾。図 4 の細胞と同様に持続性のスパイク発火パターンを示す 5 細胞について、注入電流振幅とスパイク発火率との関係を調べた。電流振幅は +5 pA から +65 pA まで 10 pA 刻み、注入時間は 500 msec。瞬時スパイク周波数（ここではスパイク発火 1 発目から 2 発目までのスパイク間隔の逆数、図中白丸）及び、平均スパイク周波数（スパイク発火の総数を電流注入の持続時間で割った値、図中灰丸）について、平均及び標準誤差（ $n=5$ ）を図 4C に示す。電流振幅の増加に伴いスパイク発火率が上昇し、また瞬時周波数と平均周波数の差も大きくなるのが分かる。振幅 +10 pA 以上において平均周波数の傾きは 0.3-0.8 Hz/pA であった。

図 5 に膜電位固定実験の記録例を示す。対象細胞（図 5A）の細胞体上のパッチ電極を介し、ステップ状に膜電位変化を与えた時の膜電流応答を記録した（図 5B）。電圧ステップは、保持電位を -70 mV とし、-60 mV から +60 mV（5 mV 刻み）の各電位レベルへ持続時間 50 msec で与えた（図ではステップの onset から 10 msec 分を抜粋）。各電圧ステップ間のインターバルは 15 sec とした⁽³¹⁾。またシリーズ抵抗の補償は、補償率 90 %（非補償分約 2 M Ω ）、補償帰還ループの時定数 2 μsec で行った。この細胞の膜容量は約 5.7 pF、静止

図4 穿孔パッチホールセル記録法による電流注入に対するスパイク発火応答の計測

Fig. 4. Recoding of spike firing in response to current injections under perforated-patch whole-cell configuration.

膜電位は約 -70 mV, 静止膜電位近傍の入力抵抗は約 2.8 G Ω であった。脱分極ステップに対して, 保持電位付近でほぼ受動的な電流変化が見られ, 約 -45 mV 以上で比較的振幅の大きい一過性の内向き電流が活性化された。別の細胞において, tetrodotoxin (1 μ M) 投与によりほぼ完全に電流が阻害されたことから, この内向き電流が TTX 感受性の電位駆動型 Na^+ 電流であることを確認した。 -30 mV 以上では内向き電流に引き続き持続性の外向き電流が活性化された。この外向き電流は脱分極後 50 msec においても不活性化を示さなかった。これら膜電流の電圧-電流 (I-V) 特性を図 5C に示す。速い活性化時定数と不活性化を示す Na^+ 電流については, そのピーク振幅 (図中白丸), 比較的遅い活性化を示す外向き電流については電圧ステップの onset 後 10 msec の時点での振幅 (図中灰丸) をプロットした。リーク電流成分 (図中破線) を考慮すると, Na^+ 電流の反転電位は $+53$ mV 付近であり, 今回の計測条件から算出された Na^+ の平衡電位約 $+57$ mV にほぼ合致していた。外向き電流の I-V 特性に

図5 穿孔パッチホールセル記録法による電位固定下の非線形膜コンダクタンスの計測

Fig. 5. Recoding of nonlinear membrane conductance under voltage-clamp in perforated-patch whole-cell mode.

については, Na^+ , Ca^{2+} による内向き電流, 及び K^+ , Cl^- による外向き電流を複合したコンダクタンスの特性を反映していると考えられる⁽³⁷⁾。

(3・5) 電気生理学的特性に対する酵素処理の影響

上述のように, 酵素処理を受けていない哺乳類網膜の単離細胞において, 電気生理学的特性の計測が可能となった。計測された特性は, 単離神経節細胞に関する過去の報告と定性的には一致するように思われた⁽²⁷⁾⁽²⁸⁾。過去, 単離した神経節細胞の膜興奮性には様々なタイプが存在することが報告されている⁽²⁸⁾。しかしそれらが, 網膜内に存在する 10 種類以上の形態学的サブタイプ⁽³⁸⁾⁽³⁹⁾を反映した細胞本来の特性の違いか, あるいは, 酵素処理により細胞膜上のイオンチャネルが受けた影響の違いによるものか不明であるため, 今回の計測結果との対応付けと定量的比較は難しい。そこで, 従来単離法で用いられてきた酵素処理の前後で細胞の膜興奮性を比較し, 網膜神経節細胞の電気生理学的特性が酵素により変性し得るか否かを実験的に検証した。

酵素の影響をより直接的に調べる為, 細胞を穿孔パッチ

図6 膜興奮性および静止膜電位に対する酵素溶液の影響：穿孔パッチホールセル記録法による連続計測。Aの*i*から*vi*のトレースは、Bに示す時間帯で記録した膜電位応答波形を3-8つ重ね書きしたもの。

Fig. 6. Effects of the enzyme solution on membrane excitability and resting membrane potential: Continuous recording under perforated-patch whole-cell configuration. Traces shown in *i* to *vi* of A are superimpositions of membrane voltage responses (3-8 traces) recorded during the periods indicated in B.

ホールセルの状態におき、電流注入に対する膜電位応答を計測しながら、酵素溶液を細胞外灌流した⁽¹⁶⁾⁽¹⁷⁾。このとき酵素の投与時間は、従来単離法での酵素処理時間と同程度(約20 min)とし、酵素溶液の組成も同じものを用いた(〈2・2〉節参照)。図6にその記録例を示す。図4の実験同様、パッチ電極よりステップ状電流パルスを細胞内注入し、その時の膜電位応答を記録した(図6A)。電流パルスは、振幅+30 pA、持続時間200 msec、各パルス間のインターバル10 sec以上で与えた。この細胞の膜容量は約12.7 pFであった。コントロール条件(B, cntrl.)における静止膜電位は約-73 mV(B, a)、静止膜電位近傍の入力抵抗は約1.4 GΩ、上記の電流注入に対するスパイク発火の瞬時周波数は約8 Hzであった(A, i)。酵素溶液の灌流を開始するとともに(B, enzyme)、静止膜電位は数分以内に脱分極し、スパイク発火の抑制、スパイク振幅の減少が引き起こされた(A, ii)。酵素投与20 min後で静止膜電位は約-59 mVのプラトーに達し(B, b)、スパイク発火は完全に消失した(A, iii)。再び通常の細胞外液を灌流し酵素を洗い流すと(B, wash), 静止膜電位は徐々に再分極し、電流注入に対して再びスパ

イク発火が誘発されるようになった(A, iv-v)。酵素の洗い流し20 min後で静止膜電位約-78 mVに至り(B, c)、スパイク発火の瞬時周波数は約14 Hzで一定となった(A, vi)。他の細胞において同様の実験を試みたが、酵素投与により膜電位の計測が不安定になる傾向があった。今回、図6と同程度に安定した記録を別の2例の細胞において得ることができた。コントロール条件下、酵素投与約20 min後、酵素の洗い流し10-30 min後における静止膜電位(平均±標準誤差, $n=3$)は各々、 -71 ± 0.7 mV, -56 ± 5.7 mV, -74 ± 2.6 mVであり、酵素処理の前後で顕著な変化はなかった。また3細胞において、酵素処理前の瞬時スパイク周波数は、7.7 Hz(上記)、11.9 Hz, 73.8 Hzであり、各々に対応する酵素処理後の瞬時スパイク周波数は、14.1 Hz(上記)、27.5 Hz, 90.8 Hzであった(値は全て3-8試行の平均値)。従って酵素処理による瞬時スパイク周波数の上昇率は 179 ± 31 % (平均±標準誤差, $n=3$)であった。以上の結果は、従来の単離法により得られた網膜細胞試料の電気生理学的特性が、酵素処理により変性を受けていた可能性の高いことを示唆している。

4. まとめ

本研究において、低濃度 Ca^{2+} 溶液インキュベーション及び機械的振動処理を組み合わせることにより、酵素を一切用いず哺乳類網膜組織の特定の細胞層より神経細胞を単離する新規方法を開発した。従来法に比べ熟練を要せず、かつ短時間で確実に細胞試料を得ることができ、また単離した神経細胞が急性の電気生理学実験に使用可能であることが示されたことから、新規単離法の有用性が実証された。さらに今回、従来の単離法で通常用いられる蛋白質分解酵素を用いた処理が、網膜細胞の膜興奮性を変性させ得ることが示された。従って新規単離法で得られた単一細胞試料は、酵素による変性を受けていない膜特性を保持しているという点において、従来法より優れていると考えられる。また同時に今回の細胞試料が、イオンチャネル等の膜蛋白質に対する酵素の影響を調べるうえでも有用であると言える。今後実験例数を増やし、酵素の影響に関するより定量的な検討と、それらを踏まえた上での過去のデータとの比較が望まれる。今回は主に神経節細胞層からの細胞単離を行ったが、アマクリン細胞、双極細胞、水平細胞が存在する内顆粒層や、視細胞内接のある外顆粒層からも、低濃度 Ca^{2+} と振動処理の組み合わせにより細胞単離が可能だと考えられる。その際、振動処理に用いる振動周波数について、細胞の種類に応じた最適周波数の検討が必要であろう。今回は装置の都合上使用できなかった100 Hz以上の周波数については、神経節細胞層からの細胞単離に関しても再度最適条件の絞り込みが望まれる。

これまで、vibrodissociation法を用いて脳や脊髄のスライス試料から単離された神経細胞の細胞膜上には、シナプス前細胞のシナプス終末部のみが機能的シナプス結合(神経伝達物質放出機構)を保持した状態で残存していることが示さ

図7 膜電流固定下で観測されたIPSP様の自発的膜電位変化。A, 50 secの連続記録波形。B, Aの*で示した波形を重ね書きしたもの。C, Aで観測された過分極のピーク振幅のヒストグラム。

Fig. 7. Spontaneous IPSP-like voltage transients recorded under current-clamp. A, Continuous trace of membrane voltage recorded for 50 sec. B, Superimposition of the traces taken from ones indicated by asterisks in A. C, Histogram of the peak amplitude of the hyperpolarizations observed in A.

れている⁽¹⁴⁾。今回我々が計測を行った細胞においても、約10-20%の割合で、抑制性後シナプス電位(IPSP)の性質に類似した、自発的膜電位変化が観測された。図7Aは、持続的な電流注入により平均の膜電位レベルを約-40 mVに脱分極したときに観測された自発的膜電位変化の記録例である。時間波形の互いに酷似した一過性の過分極が見られ(B)、ピーク振幅も離散的な値を取る傾向にあった(C)。このような自発的な一過性膜電位変化が急性単離の網膜細胞において観測された例は過去の報告には見当たらない。これが自発IPSPを捉えたものか否か、今後薬理学的及び形態学的に詳細な検討が必要である。

今回開発した新規細胞単離法と穿孔パッチ記録法とを組み合わせることにより、細胞本来が持つ電気生理学的特性をより正確且つ定量的に計測することが可能となった。この事は、今後、網膜神経細胞が持つ非線形信号処理のメカニズムをモデル化/ハードウェア化していく上で極めて重要であると考えられる。

謝辞

本研究に対して非常に有益な御教示を下され、さらに実験装置を快くお貸し頂きました熊本保険科学大学の赤池紀扶教授に深謝いたします。

本研究の一部は文部科学省科学研究費補助金若手研究(B)(課題番号: 17700398, 林田)の助成を受けて行った。

(平成19年1月25日受付, 平成19年5月15日再受付)

文 献

- (1) C. Mead and M. Mahowald : "A Silicon model of early visual processing", *Neural Networks*, Vol.1, No.1, pp.91-97 (1988)
- (2) C. Koch and I. Segev : "The role of single neurons in information processing", *Nature Neuroscience*, Vol.3, suppl. 1, pp.1171-1177 (2000)
- (3) S. A. Baccus : "Timing and computation in Inner retinal circuitry", *Annual Review of Physiology*, Vol.69, pp.271-290 (2007)
- (4) K. J. Kim and F. Rieke : "Temporal contrast adaptation in the input and

- output signals of salamander retinal ganglion cells", *Journal of Neuroscience*, Vol.21, No.1, pp.287-299 (2001)
- (5) M. J. 2nd Berry, I. H. Brivanlou, T. A. Jordan, and M. Meister : "Anticipation of moving stimuli by the retina", *Nature*, Vol.398, No.6725, pp.334-338 (1999)
- (6) B. P. Olveczky, S. A. Baccus, and M. Meister : "Segregation of object and background motion in the retina", *Nature*, Vol.423, No.6938, pp.401-408 (2003)
- (7) M. C. van Rossum, B. J. O'Brien, and R. G. Smith : "Effects of noise on the spike timing precision of retinal ganglion cells", *Journal of Neurophysiology*, Vol.89, No.5, pp.2406-2419 (2003)
- (8) K. J. Kim and F. Rieke : "Slow Na⁺ inactivation and variance adaptation in salamander retinal ganglion cells", *Journal of Neuroscience*, Vol.23, No.4, pp.1506-1516 (2003)
- (9) Y. Hayashida and A. T. Ishida : "Dopaminergic modulation of spike-generation mechanism in retinal ganglion cells", *Society for Neuroscience Abstract*, 264.17 (2003)
- (10) A. R. Kay and R. K. S. Wong : "Isolation of neurons suitable for patch-clamping from adult mammalian central nervous systems", *Journal of Neuroscience Methods*, Vol.16, No.3, pp.227-238 (1986)
- (11) K. S. Lee, N. Akaike, and A. M. Brown : "Trypsin inhibits the action of tetrodotoxin on neurons", *Nature*, Vol.265, No.5596, pp.751-753 (1977)
- (12) S. Hestrin and J. I. Korenbrot : "Voltage-activated potassium channels in the plasma membrane of rod outer segments: a possible effect of enzymatic cell dissociation", *Journal of Neuroscience*, Vol.7, No.10, pp.3072-3080 (1987)
- (13) T. Budde, J. A. White, and A. R. Kay : "Hyperpolarization-activated Na⁺-K⁺ current (I_h) in neocortical neurons is blocked by external proteolysis and internal TEA" *Journal of Neurophysiology*, Vol.72, No.6, pp.2737-2742 (1994)
- (14) J. Shen, S. Watanabe, and A. Kaneko : "Cell dissociation with papain reduces the density of cGMP-activated channels of the retinal rod" *Japanese Journal of Physiology*, Vol.45, No.1, pp.151-164 (1995)
- (15) P. M. Hermann, K. Lukowiak, W. C. Wildering, and A. G. Bulloch : "Pronase acutely modifies high voltage-activated calcium currents and cell properties of Lymnaea neurons", *European Journal of Neuroscience*, Vol.9, No.12, pp.2624-2633 (1997)
- (16) C. E. Armstrong and W. M. Roberts : "Electrical properties of frog saccular hair cells: distortion by enzymatic dissociation", *Journal of Neuroscience*, Vol.18, No.8, pp.2962-2973 (1998)
- (17) J. C. Holt, M. Lioudyno, G. Athas, M. M. Garcia, P. Perin, and P. S. Guth : "The effect of proteolytic enzymes on the α 9-nicotinic receptor-mediated response in isolated frog vestibular hair cells", *Hearing Research*, Vol.152, No.1-2, pp.25-42 (2001)
- (18) N. Akaike, M. Kaneda, N. Hori, and O. A. Krishtal : "Blockade of N-methyl-D-aspartate response in enzyme-treated rat hippocampal neurons", *Neuroscience Letters*, Vol.87, No.1-2, pp.75-79 (1988)
- (19) V. S. Vorobjev : "Vibrodissociation of sliced mammalian nervous tissue", *Journal of Neuroscience Methods*, Vol.38, No.2-3, pp.145-150 (1991)
- (20) N. Akaike and A. J. Moorhouse : "Techniques: Applications of the nerve-bouton preparation in neuropharmacology", *Trends in Pharmacological Sciences*, Vol.24, No.1, pp.44-47 (2003)
- (21) Y. Hayashida, G. J. Partida, and A. T. Ishida : "Dissociation of retinal ganglion cells without enzymes", *Journal of Neuroscience Methods*, Vol.137, No.1, pp.25-35 (2004)
- (22) Y. Hayashida, T. Motomura, and N. Murayama : "Vibrodissociation of rat retinal ganglion cells attached with inhibitory synaptic boutons", *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, Vol.47, E-Abstract 3763 (2006)
- (23) R. Horn and A. Marty : "Muscarinic activation of ionic currents measured by a new whole-cell recording method", *Journal of General Physiology*, Vol.92, No.2, pp.145-159 (1988)
- (24) E. E. Nattie, M. B. Bergin, J. Daley, and J. Melton : "CSF and brain ions, acid-base balance, and ventilation in acute hyponatremia", *Journal of Applied Physiology*, Vol.49, No.1, pp.95-101 (1980)
- (25) C. M. Armstrong and W. F. Gilly : "Access resistance and space clamp problems associated with whole-cell patch clamping", *Methods in Enzymology*, Vol.207, pp.100-122.
- (26) A. T. Ishida and M. H. Chen : "Cold inhibits neurite outgrowth from single retinal ganglion cells isolated from adult goldfish", *Experimental Eye*

- Research, Vol.52, No.2, pp.175-191 (1991)
- (27) S. A. Lipton and D. L. Tauck : "Voltage-dependent conductances of solitary ganglion cells dissociated from the rat retina", Journal of Physiology, Vol.385, pp.361-391 (1987)
- (28) B. A. Barres, B. E. Silverstein, D. P. Corey, and L. L. Chun : "Immunological, morphological, and electrophysiological variation among retinal ganglion cells purified by panning", Neuron, Vol.1, No.9, pp.791-803 (1988)
- (29) T. Tabata and A. T. Ishida : "A zinc-dependent Cl^- current in neuronal somata", Journal of Neuroscience, Vol.19, No.13, pp.5195-5204 (1999)
- (30) C. F. Vaquero, A. Pignatelli, G. J. Partida, and A. T. Ishida : "A dopamine- and protein kinase A-dependent mechanism for network adaptation in retinal ganglion cells", Journal of Neuroscience, Vol.21, No.21, pp.8624-8635 (2001)
- (31) Y. Hayashida and A. T. Ishida : "Dopamine receptor activation can reduce voltage-gated Na^+ current by modulating both entry into and recovery from inactivation", Journal of Neurophysiology, Vol.92, No.5, pp.3134-3141 (2004)
- (32) J. Rae, K. Cooper, P. Gates, and M. Watsky : "Low access resistance perforated patch recordings using amphotericin B", Journal of Neuroscience Methods, Vol.37, No.1, pp.15-26 (1991)
- (33) V. H. Perry : "The ganglion cell layer of the retina of the rat: a Golgi study", Proceedings of the Royal Society of London. Series B, Containing papers of a Biological character. Royal Society, Vol.204, No.1156, pp.363-375 (1979)
- (34) E. Guenther, S. Schmid, R. Grantyn, and E. Zrenner : "In vitro identification of retinal ganglion cells in culture without the need of dye labeling", Journal of Neuroscience Methods, Vol.51, No.2, pp.177-181 (1994)
- (35) A. T. Ishida and B. N. Cohen : "GABA-activated whole-cell currents in isolated retinal ganglion cells", Journal of Neurophysiology, Vol.60, No.2, pp.381-396 (1988)
- (36) H. Gao, X. Qiao, F. Hefti, J. G. Hollyfield, and B. Knusel : "Elevated mRNA expression of brain-derived neurotrophic factor in retinal ganglion cell layer after optic nerve injury", Investigative Ophthalmology & Visual Science, Vol.38, No.9, pp.1840-1847 (1997)
- (37) A. T. Ishida : "Ion channel components of retinal ganglion cells", Progress in Retinal and Eye Research, Vol.15, No.1, pp.261-280 (1995)
- (38) K. R. Huxlin and A. K. Goodchild : "Retinal ganglion cells in the albino rat: revised morphological classification", Journal of Comparative Neurology, Vol.385, No.2, pp.309-323 (1997)
- (39) B. J. O'Brien, T. Isayama, R. Richardson, and D. M. Berson : "Intrinsic physiological properties of cat retinal ganglion cells", Journal of Physiology, Vol.538, No.3, pp.787-802 (2002)

本 村 珠 美

(学生員) 2005 年熊本大学工学部電気システム工学科卒業, 2007 年同大学院自然科学研究科電気システム専攻博士前期課程修了, 現在同博士後期課程在学中。神経生理学研究に従事。電子情報通信学会会員。

林 田 祐 樹

(正員) 1993 年九州工業大学情報工学部卒業, 1998 年同大学院情報工学研究科博士後期課程満了, 1999 年学振未来開拓学研推進事業プロジェクトリサーチアソシエイト, 2001 年カリフォルニア大学デビス校生物学部神経生物生理行動学科ポストドクトラルフェロー, 2004 年熊本大学工学部電気システム工学科助教授, 現在同大学院自然科学研究科情報電気電子工学専攻准教授。博士(情報工学)。神経科学/工学研究に従事。電子情報通信学会 MBE 研究専門委員幹事, 日本計測自動制御学会, 日本電気学会, 日本神経科学学会, 米国神経科学学会, 米国視覚と眼科学研究協会(ARVO) 各会員。

村 山 伸 樹

(正員) 1974 年熊本大学工学部電気工学科卒業, 宮崎医科大学医学部生理学第一講座, 熊本大学医学部生理学第二講座を経て, 1987 年同大学工学部電気情報工学科助教授, 1995 年教授, 現在に至る。医学博士。感覚, 脳・神経系に関する電気生理学的研究に従事。日本生理学会, 日本臨床神経生理学会, 日本生体磁気学会 各評議員, 電子情報通信学会 MBE 研究会専門委員長, 日本味と匂学会監査委員, 日本神経科学学会, 日本神経学会 各会員。