二点からの刺激による培養神経細胞群のスパイク数の変化

非会員 荒木 信之 (富士ゼロックス) 正員 神保 泰彦 (NTT)

非会員 市川 一寿 (富士ゼロックス) 非会員 川名 明夫 (拓殖大学)

非会員 鳥光 慶一 (NTT)

Changes in the number of spikes induced by double site stimulation in cultured neocortical neurons

Nobuyuki Araki, Non-member (Fuji Xerox), Yasuhiko Jimbo, Member (NTT), Kazuhisa Ichikawa, Non-member (Fuji Xerox), Akio Kawana, Non-member (Takushoku University), Keiichi Torimitsu, Non-member (NTT)

It is reported that correlation of inputs in a time domain plays an important role in plasticity of synaptic transmission. Here, we studied how correlated external stimulation modified responses of the cortical networks. Rat neocortical neurons were cultured on electrode-array substrates and activity evoked by electrical stimulation from a single site was compared between before and after double site stimulation. Double site stimulation was applied either simultaneously or with time difference of 500ms. Either increase or decrease in evoked responses was observed in seven cases of nine samples. The next step will be to understand the correlation between these changes in activity and the applied stimuli.

キーワード：電極アレイ、神経活動の変化、スパイク数

1. はじめに

脳は膨大な神経細胞とそのネットワークから成るシステムである。人間の脳（大脳）には約 10^{10} 個の神経細胞があり 1 つの神経細胞につき平均して $10^3 \sim 10^5$ 個のシナプスがある。このような膨大で複雑な脳を探索するため、様々なアプローチが取られてきている。そのような中、生物より取り出した神経細胞そのものを特殊な電極アレイ基板上に長期間培養し、その活動を探索することにより脳の機能に迫ろうとする研究方法がある。この研究方法により哺乳動物の CNS (Central Nervous System: 中枢神経系) を初めて電極アレイ基板上に培養、計測に成功したのは 1982 年である⁽¹⁾。このような電極アレイ基板での計測は従来の方法と比較して非侵襲であり且つ毒性を伴わないで長時間測定可能な点で優れている。近年このような電極アレイ基板を用いて、大脳皮質より取り出した神経細胞の電気活動の測定⁽²⁾、神経細胞の発達段階における自発発火の研究^{(3) (4)}や、

外部電極からの刺激に対する培養神経細胞の可塑性に関する研究^{(5) (6)}が行われてきた。これらの研究により培養神経細胞の発達時の発火活動や、培養神経細胞が LTP (Long-Term Potentiation: 長期増強)、LTD (Long-Term Depression: 長期抑圧) といった神経細胞特有の可塑的な性質を持ち合わせていることなどが示されたが、まだそのメカニズムを完全に解明するには至っていない。LTP, LTD 研究において、Debanne らは単結合している神経細胞のプレ細胞とポスト細胞にそれぞれ刺激を与えたとき、その刺激を与えるタイミングの差により LTP が引き起こされたり LTD が引き起こされることを発見した⁽⁷⁾。Debanne らによるとポスト細胞に比べて 25~15ms 先行してプレ細胞に刺激を与えた場合に LTP が引き起こされ、15ms 先行~200ms 遅延の時間差で与えた場合は LTD が起こることを観測した。

本研究では、このような入力の時間的な関係がランダムネットワークである培養神経細胞の神経回路活動に及ぼす影

響につき検討した。ラットから採取した大脳皮質神経細胞を電極アレイ基板上に培養し、得られた神経回路に対して2ヶ所の基板電極から電気刺激を行った際に引き起こされる変化の観測を試みた。大脳皮質培養神経回路の応答特性を考慮し、2ヶ所から与える刺激については、これを同時に行う場合と500msの時間差を設ける場合の2通りについて検討した。

2. 実験方法

2. 1 電極アレイ基板

電極アレイ基板は透明導電材料ITO(Indium-tin-oxide)膜をフォトエッチングによりパターン形成したものを用いた。電極は64ヶ所あり電極部は $30\mu\text{m} \times 30\mu\text{m}$ で各電極間距離を $150\mu\text{m}$ 間隔で格子状に並んでいる(図1)。電極アレイ基板は、神経細胞との接着性を高める為に、事前にラミネン、ポリD-リジンでコーティングを行った。

図1 64電極アレイ基板
Fig. 1. 64-channel electrode array substrate

2. 2 神経細胞の培養

18日目のラット胎児より大脳皮質を取り出した。取り出した大脳皮質にパパイニン酵素(Boehringer)を加え 36°C の湯槽に約20分間入れた。その後数回のピペッティングにより神経細胞を単離した。この神経細胞に培養液を加え上記の電極アレイ基板上に培養した。培養液はDulbecco's Eagle's modified medium(DMEM)(Gibico)に5%非働化ウマ血清(Gibco)、5%ウシ胎児血清、 $2.5\mu\text{g/ml}$ のインシュリン(Sigma)にペニシリンを加えたものを用いた。培養は 37°C 、 CO_2 10パーセントの雰囲気を保ったインキュベーター内で行われた。培養液は1週間に2回半量ずつ入れかえた。測定実験には培養後40~90日経過したものを用いた。培養した神経細胞は発達に伴いその電気生理学的な性質を変化させる。しかし、40~90日経過すると自発的な発火活動が発達段階として安定した段階にあることが知られている⁽⁸⁾。測定は室温で、 NaCl 148mM、 KCl 2.8mM、

CaCl_2 2.0mM、 MgCl_2 1.0mM、HEPES 10mM、glucose 10mMでpHを7.22、浸透圧を302 Osmolに調節した溶液を1ml/minでフローさせる条件下で行った。

2. 3 実験システム

実験システムは刺激装置として、刺激を送り出すパルスジェネレーター、刺激チャンネルを指定するスイッチング回路、それをコントロールするコンピュータで構成される。電極アレイ上の各電極へは、あらかじめ組まれたプログラムにより、様々な電気刺激を送り出すことができる。刺激に用いた電極は、5ms遅れて記録電極とすることができる。また測定装置はアンプ、A/D変換器からなり、計測した神経活動のデータ(スパイクの時間的な幅、活動電位、スパイクの発生した時間)はサンプリング周波数25kHzのA/D変換器、アンプを経てワークステーションに取りこまれ保存された(図2)。この測定値は、各電極周辺の神経細胞による電気的な神経活動を拾ったものである。測定されたデータは、電極からの神経活動に対応するスパイク状の活動電位を閾値操作し、スパイクとした。この閾値はスパイク信号を含まない部分の標準偏差を5倍したものを用いた。

2. 4 刺激方法

64点の電極を順に、0.5VのSingle Bipolar Pulse(100 μs)を3秒間隔で与えた。64点のうち、その応答のアンプリチュードが大きく、自発発火だけではないと思われるはっきりした応答の得られる2点を任意に選び、これをS1、S2とした。この2点を刺激入力部位としてphase Iからphase IIまでの測定を行った(図3)。各phaseでは次のように刺激を与えた。Single Bipolar Pulse(100 μs) 2.5Vの刺激を60回3秒間隔で点S1に与え、その時引き起こされた神経活動を64点の電極から記録した(phase I)。次に刺激を2点、S1、S2から60回3秒間隔で与えた(phase II)。この時、刺激を2点同時に与えた場合(phase II-①、同時刺激)、500msの時間差を持って与えた場合(phase II-②、時間差刺激)の2通りを行った。更にもう1度、phase Iと同じ刺激を3秒間隔で60回与えた(phase III)。

2. 5 データ解析方法

本実験ではphase Iとphase IIIで、刺激によって引き起こされた電極アレイ基板から記録されたスパイク数を数え、phase IIの2点からの刺激により、神経活動がどのように変化したのかを観測した。また2点刺激を2種類の方法で行い、刺激方法の違いによる差が現れるかを観測した。

図2 実験システム
Fig. 2. Stimulation and recording system

図3 刺激の手順
Fig. 3. Procedure of the stimulation

3. 結果

3. 1 神経活動の変化

64 点の電極より記録された 1 回ごとの刺激によって引き起こされたスパイク数を合計し、神経活動の変化の指標とした。本実験では、phase II (S1,S2 へ同時あるいは時間差刺激 60 回: 180 秒間) によってその前後、つまり第 I、III 期 (S1 へ 60 回 3 秒間隔で刺激: 180 秒間) でのスパイク数がどのように変化するか注目し、グラフ化した。またこれら phase I と phase III の 180 秒間のスパイク数を合計してグラフ化すると共に、t 検定を用いてその差の有意性を確認した (p < 0.05)。培養神経細胞のスパイク数は、phase II の 2 点刺激によってその後 phase III で増加する場合、減少する場合、そして全く変化しない場合が観測された。変化する場合 phase III の後数十分間続くが、その後しばらく放置することによりほぼ元の状態に戻り、同じ現

象を再現できる。この為、この変化は時間的な経過によるものや標本の劣化による可能性は除外される。
サンプル数 9 でのこれらの変化を、phase II に与えた 2 点刺激別にまとめたものを表 1 に示した。2 点からの刺激の種類 (同時あるいは時間差) によって大きな差は見られなかった。どちらも比較的スパイク数の減少が、増加や変化の無いものに比べ多く観測された。

表 1 Phase II 後のスパイク数の変化
Table 1 Summary of changes in number of spikes after phase II in nine cultures

	同時刺激	時間差刺激	合計
スパイク数 増加	1	1	2
スパイク数 減少	3	2	5
変化なし	1	1	2

3. 2 スパイク数の増加した例

スパイク数の増加が顕著であった例を示す。図 4 は phase I から phase III までにおける各刺激が与えられたとき 64 点の電極より観測されたスパイク数の合計をグラフ化したものである。2 点より刺激を与えた phase II は黒い帯部分である。phase III は phase I と比較してスパイク数が増加しているのが分かる。さらに phase I と phase III のスパイク合計数をグラフ化して比較したものが図 5 である。この合計数は t 検定を用いて比較し、統計的に有意であることが分かった (図 5、*印は統計的に有意を示す)

図4 Phase II 後スパイク数増加の例
Fig.4. Example of increase in the number of spikes after phase II (Time series-Number of spikes)

図5 Phase II 前後の各 Phase における合計スパイク数の比較 (図4の例)

Fig. 5. Comparing the total number of spikes in phase I with phase II (data from Fig.4)

3. 3 スパイク数の減少した例

スパイク数の減少が顕著であった例を示す。図6は増加した例と同じく、2点刺激前後でのスパイク合計数を比較したものである。図より明らかに phase III のスパイク数が phase I に比べ減少している様子が分かる。また、phase I と phase III におけるスパイク総合計数を比較したものが図7である。phase I の合計スパイク数と phase III の合計スパイク数の差は、t 検定を用い明らかに有意であることを確かめられた。

4. 考察

2点からの入力を集中的に経験した後では誘発応答の強度が変化するという実験結果が得られた。しかしながら、今回の測定では、2点からの入力間に時間差がある場合とない場合とでは有意な差は見られなかった。単一のシナプスのレベルではこれが重要な意味を持つことが報告されている⁽⁷⁾が神経回路レベルの活動との関係は必ずしも単純ではないことを示唆するものである。

培養した大脳皮質神経回路の誘発応答を計測する場合、「ネットワークとしての不応期」と考えられる現象を無視できない。文献(4)にも触れられているとおり、外部からの刺激に対する応答が直前の活動状態に依存するというものである。すなわち、強い活動を示した直後には次の入力に対して100%の応答をするまでに一定の時間を要し、かつその時間は神経回路としての発達の段階に依存して変化するというものである。この現象が、培養系に特有のものであるのか、また、発達の段階のみに観察されるものであるのかは現時点でははっきりした結論が得られていないが、本研究の実験においては必然的にこの現象の考慮が必要になる。この観点から、今回の実験では、S1とS2との間に時間差を設ける場合、これを500msとした。これが、

図6 Phase II 後スパイク数減少の例

Fig.6. Example of decrease in the number of spikes after phase II (Time series-Number of spikes)

図7 Phase II 前後の各 Phase における合計スパイク数の比較 (図6の例)

Fig.7. Comparing the total number of spikes in phase I with phase II (data from Fig.6)

シナプスの現象として報告されている数値の積み重ねとして適切なものであるかどうかは単純には結論できないが、今後、細胞間の信号伝達における空間的な情報も考慮した入力部位、タイミングの設定により、この時間差と誘発応答の変化との関係に関する情報が得られるものと考えられる。

5. 結論

培養した神経細胞を2点から刺激することにより、神経活動が変化することを観測した。しかし今回の測定実験においては、2点からの刺激入力の時間差による神経活動の変化への有意な差は見られなかった。

今後の課題としてあげられるのは、新たな解析手段の導入、新たな実験方法の導入である。まず新たな解析方法については、次のようなことが考えられる。本実験においては、神経活動の指標としてスパイク数の増減をみた。しか

しこれは電極全体で観測されたスパイク数の合計であり、刺激点と比較して空間的にどの位置にある電極で活動が高まったのかは解析していない。また新たな実験方法については、2点からの刺激の与え方に、本実験では 0 s、500 m s の 2 つの時間設定しかしておらず、今後は新たな時間差を導入することが考えられる。

以上のように、今後はこれらの手法を取り入れた実験・解析を行い、培養神経細胞群の性質を調べてゆきたい。

(平成 12 年 1 月 13 日受付, 同 12 年 7 月 24 日再受付)

文献

- (1) Gross, G. W., Williams, A. N., Lucas, J. H. (1982) Recording of spontaneous activity with photoetched microelectrode surfaces from mouse spinal neurons in culture. *J Neurosci Methods* 5:13-22
- (2) Boppart, S., Wheeler, B. C., Wallace, C. S. (1992) A flexible perforated microelectrode array for extended neural recordings. *IEEE Trans Biomed Eng* 39:37-42
- (3) Meister, M., Wong, R. O., Baylor, D. A., Shatz, C. J. (1991) Synchronous bursts of action potentials in ganglion cells of the developing mammalian retina. *Science* 252:939-943
- (4) Robinson, H. P., Torimitsu, K., Jimbo, Y., Kuroda, Y., Kawana, A. (1993) Periodic synchronized bursting and intracellular calcium transients elicited by low magnesium in cultured cortical neurons. *J Neurophysiol* 70:1606-16
- (5) Jimbo Y, Tateno T., Robinson H.P.C. (1999) Simultaneous induction of pathway-specific potentiation and depression in networks of cortical neurons. *Biophys J* 76:670-8
- (6) Tateno T., Jimbo Y. (1999) Activity-dependent enhancement in the reliability of correlated spike timings in cultured cortical neurons. *Biol Cybern* 80:45-55
- (7) Debanne D., Gähwiler BH, Thompson SM (1998) Long-term synaptic plasticity between pairs of individual CA3 pyramidal cells in rat hippocampal slice cultures. *J Physiol (Lond)* 507.1:237-47
- (8) Kamioka, H., Maeda, E., Jimbo Y., Robinson H.P.C., Kawana, A. (1996) Spontaneous periodic synchronized bursting during formation of mature patterns of connections in cortical cultures. *Neurosci Lett* 206:109-112

荒木 信之

(非会員) 平成 9 年筑波大学工学研究科(電子情報専攻)修士課程修了。同年富士ゼロックス株式会社入社。現在中央研究所知識研究室所属。日本神経科学会会員。

神保 泰彦

(会員) 昭和 63 年東大大学院(電子工学)修了、工学博士。同年より NTT 物性科学基礎研究所にて主として神経科学の研究に従事。平成 4-5 年、フランス CNRS 客員研究員。電気学会、電子情報通信学会、日本神経科学学会、日本 ME 学会等の会員。

市川 一寿

(非会員) 昭和 49 年早稲田大学理工学部卒業。日本 IBM (株) を経て、平成 3 年富士ゼロックス (株) 基礎研究所。理学博士。日本神経科学学会、生物物理学会、Society For Neuroscience 会員。

川名 明夫

(非会員) 昭和 46 年東京大学大学院修士課程修了。同年電電公社電気通信研究所入社、サザンブトン大学客員研究員、NTT 基礎研究所を経て、平成 11 年より拓殖大学工学部教授。工学博士。電子情報通信学会、日本神経科学会会員。

鳥光 慶一

(非会員) 昭和 61 年慶應義塾大学工学研究科博士課程修了。同年日本電信電話 (株) 基礎研究所入所、同年東京大学医学部第一生理学教室客員研究員、平成 2 年米国立衛生研究所客員研究員。現在 NTT 物性科学基礎研究所機能物質科学研究部主幹研究員。工学博士