

アガロースマイクロチャンバー上に作製した 神経回路の赤外線レーザー刺激応答

淵上, 利香 / FUCHIKAMI, Rika

(出版者 / Publisher)

法政大学大学院理工学研究科

(雑誌名 / Journal or Publication Title)

法政大学大学院紀要. 理工学研究科編

(巻 / Volume)

65

(開始ページ / Start Page)

1

(終了ページ / End Page)

2

(発行年 / Year)

2024-03-24

(URL)

<https://doi.org/10.15002/00030792>

アガロースマイクロチャンバー上に作製した 神経回路の赤外線レーザー刺激応答

INFRARED LASER STIMULATION RESPONSE OF NEURAL CIRCUITS FABRICATED ON AGAROSE MICRO CHAMBER

淵上利香

Rika FUCHIKAMI

指導教員 金子智行

法政大学大学院理工学研究科生命機能学専攻修士課程

In neuroscience, the control of neural activity is an important issue. Neurons are known to be able to induce or inhibit activity by external stimulation. In this study, I tried to promote neural firing by irradiation to neurons with an infrared laser. I evaluated neural activity using microelectrode array (MEA) and calcium imaging: neurons cultured in vitro were labeled with fluo-4 AM and subjected to irradiation with an infrared laser (wave length: 1480 nm). Neural circuits were fabricated by agarose microfabrication techniques. I observed neural activity suppression with the infrared laser. It was found that stimulation by the infrared laser can suppress activity depending on the distance from the irradiation site without direct stimulation. In the future, I must examine the impact of the culture environment, including temperature changes induced by the infrared laser.

Key Words : Neuron, Microfabrication, calcium imaging, MEA, infrared laser

1. 緒言

脳には多量の神経細胞が存在しており、それらが複雑にネットワークを構成している。神経細胞同士の回路で行われる情報処理によって脳は機能している。脳機能を理解するには神経回路それぞれの作動メカニズムを知ることが重要である[1]。しかし、神経回路はその複雑さから個別に調べることは困難である。そのため神経細胞から神経回路を再構成することは個別の神経回路を調べる方法として有効である。さらに、神経回路の活動を調べるためには神経回路活動の抑制や促進を任意に制御が必要である[2]。本研究では、神経活動制御法として操作が容易である赤外線レーザーに注目し、AMC上に形成された神経ネットワークを赤外線レーザーで刺激することで神経回路の活動制御を試みた。

本研究室にはアガロースマイクロチャンバー(AMC)を利用して少数の神経細胞からなる神経回路を作製する技術がある。AMCとはアガロース微細加工技術によって制限された細胞接着領域のことである。AMC内に作製した神経回路に赤外線レーザーを照射し、神経活動の変化をカルシウムイメージングおよびMEAを用いて測定した。

2. 実験方法

(1) アガロース微細加工技術と神経回路作製

ポリエチレンイミン(PEI)を下層に、アガロースを上層

にコートしたディッシュに赤外線レーザーを照射するとアガロースが融解し細胞接着領域が現れる(図1A)。作製したAMCにニワトリ胚から単離した神経細胞を播種して神経回路を作製した。

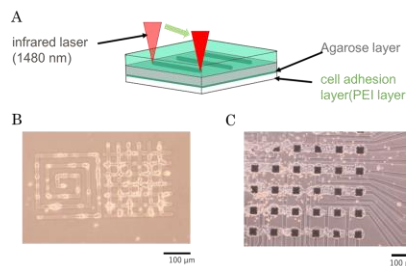


図1 AMC作製方法及び播種された細胞

(A) アガロース微細加工技術 (B) カルシウムイメージング用 AMC (C) MEA 測定用 AMC

(2) カルシウムイメージングと赤外線レーザー

Fluo-4 AM で染色して蛍光観察をしながら、1480 nm、0.3 W または 0.45 W で 10 秒間照射して蛍光輝度の変化を測定した(図2)。

(3) 細胞外電位測定と赤外線レーザー照射

AMC内の神経回路に1480 nm、0.3 Wで赤外線レーザーを照射した(図3)。検出されたピークを抽出して解析を行った。各電極での照射地点からの距離との照射前と照射終

了後での振幅の変化率を求めた (図 4)。さらに、測定開始から 10 秒ごとの発火頻度の推移を示した (図 5)。

3. 結果と考察

(1) カルシウムイメージング

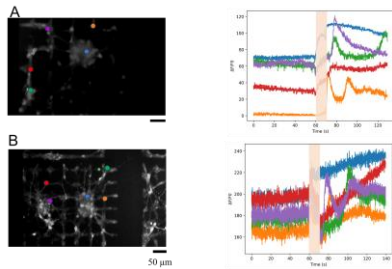


図 2 赤外線レーザー照射前後の蛍光輝度変化
(A)0.45 W で照射(B)は 0.3 W で照射

レーザー照射後、強度に関わらず輝度の変化が激しくなった。このことからレーザー刺激は AMC 上の神経ネットワークにも影響を及ぼすと示された。特に照射部付近では照射直後に輝度が上昇していることが観測された。

(2) 細胞外電位測定

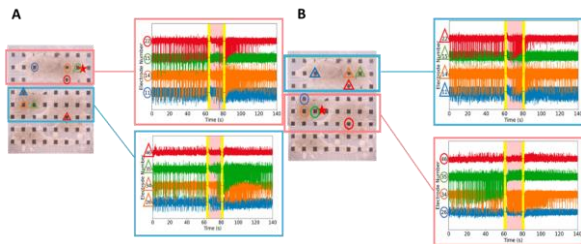


図 3 MEA で測定された細胞外電位の波形
(A)上部の細胞集団にレーザーを照射した際の波形変化
(B)株の細胞集団にレーザーを照射した際の波形変化

図 3 から同期発火している神経回路に対し赤外線レーザーを照射すると発火パターンが変化していることが分かった。さらに、照射部に最も近い電極では波形が観察できなくなっており、さらにレーザーを照射した細胞集団と接続していない独立した細胞集団でも波形パターンの変化が観測された。そこで、照射地点からの距離が赤外線レーザーの効果に影響すると考え、照射地点からの距離、抽出したピークの振幅の変化率と発火頻度の推移を求めて赤外線レーザーが与える影響について調べた。

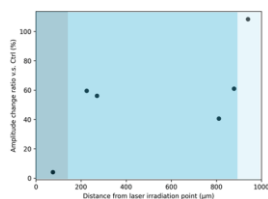


図 4 照射地点からの距離と振幅の変化率
ピークからノイズを引いた値を振幅とした照射前後での変化率

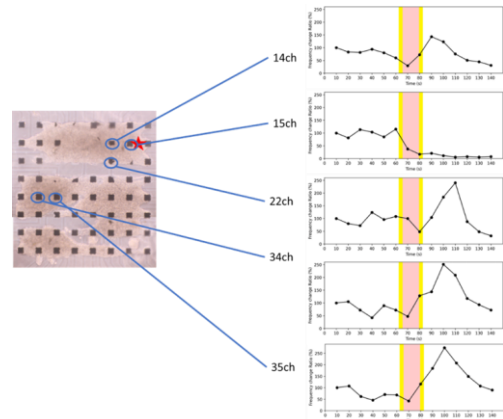


図 5 各電極での発火頻度の推移
各電極での発火頻度を 10 秒ごとに求め、開始 10 秒を 100 とした際の発火頻度の変化率

図 4 より、照射地点に近い地点では発火が抽出できなくなり、離れていると活動が減少し、さらに離れると活動に変化が現れないと判明した。図 5 よりレーザー照射により発火頻度が減少し、照射終了後に発火頻度が上昇する傾向が観察された。この傾向はレーザーが直接照射されていない細胞集団でも同様に見られた。

以上の結果より、赤外線レーザーは直接的な刺激でなくとも神経活動を抑制することが示された。今後は、赤外線レーザーが神経活動を減少させた原因について温度上昇などの観点から調べる必要がある。

4. 結言

本研究では赤外線レーザー刺激により神経活動を制御することを試みた。カルシウム濃度変化と細胞外電位の測定から連続した赤外線レーザー刺激は直接刺激をしなくとも神経活動を抑制する効果があると示唆された。赤外線レーザーは照射部では活動を失い、距離が離れていると抑制され、さらに離れると活動に変化が起こらない傾向が存在した。赤外線レーザーによる神経活動抑制効果は照射地点からの距離に依存することが推測される。

謝辞：法政大学本研究を行う上でご指導賜りました金子智行教授、林真人教務助手、MEA システムを提供して下さった早稲田大学理工学術院 安田賢二教授、日々議論をして下さった金子研究室の皆様へ感謝いたします。

参考文献

- 1) Guobin Shen *et al.* (2023), *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **120**, 39, e2218173120
- 2) Sina Tafazoli *et al.* (2020), *Journal of Neural Engineering*, **17**, 5, 056007