(19)日本国特許庁(JP)　(12)特　許　公　報(B2)　(11)特許番号
特許第6047579号
(P6047579)
(45)発行日　平成28年12月21日(2016.12.21)　(24)登録日　平成28年11月25日(2016.11.25)

(51)Int.Cl.			F I		
C12M	3/00	(2006.01)	C12M	3/00	A
C12N	5/0793	(2010.01)	C12N	5/0793	
C12M	1/34	(2006.01)	C12M	1/34	B
C12M	1/00	(2006.01)	C12M	1/00	A
G01N	27/416	(2006.01)	C12M	1/00	C

請求項の数 8　(全 38 頁)　最終頁に続く

(21)出願番号　特願2014-536618(P2014-536618)
(86)(22)出願日　平成25年3月21日(2013.3.21)
(86)国際出願番号　PCT/JP2013/057976
(87)国際公開番号　WO2014/045618
(87)国際公開日　平成26年3月27日(2014.3.27)
審査請求日　平成27年2月4日(2015.2.4)
(31)優先権主張番号　特願2012-205561(P2012-205561)
(32)優先日　平成24年9月19日(2012.9.19)
(33)優先権主張国　日本国(JP)

（出願人による申告）平成２０年度、独立行政法人科学技術振興機構、戦略的創造研究推進事業、「プロセスインテグレーションによる機能発現ナノシステムの創製」委託研究、産業技術力強化法第１９条の適用を受ける特許出願

(73)特許権者　503360115
国立研究開発法人科学技術振興機構
埼玉県川口市本町四丁目１番８号
(74)代理人　100099759
弁理士　青木　篤
(74)代理人　100077517
弁理士　石田　敬
(74)代理人　100087871
弁理士　福本　積
(74)代理人　100087413
弁理士　古賀　哲次
(74)代理人　100117019
弁理士　渡辺　陽一
(74)代理人　100150810
弁理士　武居　良太郎

最終頁に続く

(54)【発明の名称】神経細胞ネットワークの形成及びその利用、並びに神経細胞播種デバイス

(57)【特許請求の範囲】

【請求項１】

貫通孔を有する電気絶縁性基板と、当該電気絶縁性基板の第一表面側に形成された第一液溜部と、その反対側である第二表面側に形成された第二液溜部と、第一液溜部及び第二液溜部に導入される導電性液体に対してそれぞれ通電可能に配置された電極部を含む、神経細胞ネットワーク用培養型プレーナーパッチクランプ装置であって、

電気絶縁性基板の第一表面側の貫通孔の周縁に複数の突起部で囲まれた細胞定着部を備え、ここで、複数の突起部が、神経細胞の細胞体を通過させない間隔を有し、そして

電極部が、以下の（ａ）～（ｃ）

（ａ）前記液溜部に導電性液体が導入された際にその導電性液体に接することとなる容器壁の少なくとも一部が無機多孔質材料で構成されている電極容器；

（ｂ）上記の電極容器内に収容された、貴金属Nmの表層部にその貴金属の塩化物NmCl層を形成した電極；

（ｃ）上記の電極容器内に充填された、前記貴金属の塩化物NmCl及びアルカリ金属塩化物が飽和濃度で溶解した電極溶液；

を備えることを特徴とする、前記神経細胞ネットワーク用培養型プレーナーパッチクランプ装置。

【請求項２】

前記複数の突起部により規定される細胞定着部の内径が、１～数個の神経細胞の細胞体を収容できるサイズである、請求項１に記載の神経細胞ネットワーク用培養型プレーナー

パッチクランプ装置。
【請求項３】
前記細胞定着部を構成する基板面に、細胞外マトリクス形成物質がコーティングされている、請求項１又は２に記載の神経細胞ネットワーク用培養型プレーナーパッチクランプ装置。
【請求項４】
前記電気絶縁性基板上に、複数の貫通孔及び細胞定着部を備え、神経細胞ネットワークの形成を可能にする間隔で細胞定着部が配置される、請求項１～３のいずれか一項に記載の神経細胞ネットワーク用培養型プレーナーパッチクランプ装置。
【請求項５】
前記神経細胞ネットワーク用培養型プレーナーパッチクランプ装置が以下（Ａ）～（Ｃ）のいずれかの目的に使用されるものであることを特徴とする請求項１～４のいずれか１項に記載の神経細胞ネットワーク用培養型プレーナーパッチクランプ装置。
（Ａ）神経細胞ネットワークにおける神経細胞イオンチャンネル電流の計測・解析に用いる。
（Ｂ）少なくとも、Caイメージング解析、前シナプス部位のマーカーであるsynaptophysin又は synapsinの標識によるイメージング解析、樹状突起のマーカーであるMAP2の標識によるイメージング解析、及び、エンドソームやエキソソームを標識するFM1-43又はFM4-64によるイメージング解析を包含するイメージング解析に用いる。
（Ｃ）神経細胞ネットワークのハイスループットスクリーニングシステムに用いる。
【請求項６】
前記神経細胞ネットワーク用培養型プレーナーパッチクランプ装置が請求項５の（Ｂ）に記載のイメージング解析に用いるものである場合に、更に下記（Ｄ）～（Ｆ）の１以上の要素を備えることを特徴とする請求項５に記載の神経細胞ネットワーク用培養型プレーナーパッチクランプ装置。
（Ｄ）前記基板の上部に、神経細胞が発する光の受光装置を設置している。
（Ｅ）前記基板の上部に、神経細胞あるいは基板表面に光を照射する照射装置を設置している。
（Ｆ）上記（Ｅ）の照射装置は、所定の単一の神経細胞にのみ光を照射するための集光系を装備している。
【請求項７】
請求項１～６のいずれか１項に記載の神経細胞ネットワーク用培養型プレーナーパッチクランプ装置を用いて、任意の研究目的のもとに培養下の神経細胞ネットワークを形成させる方法であって、
（１）細胞培地充填下の前記基板上に神経細胞を播種する工程と、
（２）細胞定着部の細胞外マトリクス形成物質により、及び／又は、細胞定着部の底面の微細貫通孔から液体培地を吸引することにより、一つの細胞定着部ごとに１～数個の神経細胞を配置・定着させる工程と、
（３）細胞定着部に定着した神経細胞の移動を複数の突起部により制約しつつ、複数の突起部の間隔部分により相互に相手の神経細胞の存在を認識させて軸索又は樹状突起による神経細胞間のシナプス接合を形成させる工程と、
を含むことを特徴とする神経細胞ネットワーク形成方法。
【請求項８】
前記神経細胞ネットワーク形成方法において、（１）の工程で神経細胞を播種する際、併せてグリア細胞を細胞定着部以外の部分に播種することを特徴とする請求項７に記載の神経細胞ネットワーク形成方法。
【発明の詳細な説明】
【技術分野】
【０００１】
本発明は神経細胞ネットワークの形成及びその利用、並びに神経細胞播種デバイスに関

する。更に詳しくは本発明は、神経細胞の軸索と他の神経細胞の樹状突起によるシナプス接合を介した神経細胞ネットワーク（neural network）を培養下に形成させる神経細胞ネットワーク形成用培養装置と、同装置を用いてそのような神経細胞ネットワークを形成する方法に関する。更に本発明は、このような神経細胞ネットワークを用いたハイスループットスクリーニング（high throughput screening）技術、プレーナーパッチクランプ（planar patch-clamp）技術、神経細胞イメージング技術等に関する。

【０００２】

更に本発明は、神経細胞ネットワーク形成用培養装置又はこの培養装置を利用したプレーナーパッチクランプ装置における多数の選択領域（細胞定着部）に効率的に神経細胞を播種するための神経細胞播種デバイスに関する。

【０００３】

本発明において、「神経細胞」とは、第１に、中枢神経細胞、末梢神経細胞等の各種の神経細胞を包含する。神経細胞としては、未だ軸索や樹状突起を突出させていない状態のものが好ましい。又、「神経細胞」とは、第２に、例えばｉＰＳ細胞やＥＳ細胞のように神経細胞に分化可能な細胞、より好ましくは、ｉＰＳ細胞やＥＳ細胞から神経細胞への分化の完成途上にある神経幹細胞等の状態にあるものを包含する。更に、「神経細胞」とは、第３に、細胞相互間にネットワークを形成する性質を持つ細胞、及び、細胞相互間にネットワークを形成する性質を持つ細胞に分化が可能な細胞も包含する。

又、「神経細胞の細胞体」とは、神経細胞における軸索や樹状突起のような突出部分を除いた細胞の本体部分を言う。

【０００４】

更に、「選択領域」又は「細胞定着部」とは、神経細胞ネットワーク形成の中心となり、又はイオンチャンネル電流計測や各種イメージングにおける電流／電圧印加等の対象となるべき神経細胞が配置される基板上の領域を言い、「選択細胞」とは、選択領域（細胞定着部）に配置される神経細胞を言う。

【背景技術】

【０００５】

従来、研究目的あるいは実用目的から、培地（特に液体培地）中に神経細胞を保持して、神経細胞が生きたままの状態で神経細胞ネットワークをin vitroで構成しようとする提案がなされている。

【０００６】

例えば下記の非特許文献１では、図２に示すようにトランジスターを配置したSi基板上に複数の突起部で囲まれた領域を設け、ここに巻貝（stagnalis）の末梢神経細胞集合体である大きな神経節（ganglion）を配置して、神経細胞の電位変動を検出している。下記の非特許文献２では、基板上に図３に示すような「ケージ」と称する略円盤形の囲い（高さ約９μｍ）を複数形成し、各ケージの中央部のスペースに神経細胞を配置すると共に、ケージに設けた幾つかのトンネルを通じて神経細胞の軸索等を隣接のケージ中の神経細胞に向かって伸長させるニューロチップを開示している。

【先行技術文献】

【非特許文献】

【０００７】

【非特許文献１】G.Zeck, et al., PNAS 98 (2001) 10457-10462

【非特許文献２】J.Erickson, et al., J. Neurosci. Methods, 175 (2008) 1-16

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【０００８】

本願発明者の研究によれば、例えば哺乳動物の神経細胞を用いた神経細胞ネットワークの形成には、次のような問題点がある。

【０００９】

即ち、良好な網目状の形態を有する神経細胞ネットワークを構成するためには、神経細

胞を所定の選択領域（網目の結節点となる領域）に定着させておく必要がある。しかし液体培地中で生きた状態にある哺乳動物の神経細胞は能動性を持ち、ランダムに移動する恐れがあるため、移動を制約する必要がある。

【００１０】

ところが、例えば図１に示すように、基板上に、軸索の伸長をガイドするための細い溝によって連絡された円形の凹部（深さ５μｍ）を設け、これらの凹部中に神経細胞を配置する構造を用いたところ、神経細胞の移動を制約できた反面、凹部中に配置した神経細胞の多くが２～３日後に死滅し、良好な神経細胞ネットワークを構成できないと言う問題が判明した。

【００１１】

この問題に関して、神経細胞は培養条件や細胞付近の状況に敏感であり、神経細胞ネットワークの形成に当たっては、隣接する神経細胞との間で相互に相手の神経細胞の存在を容易に認識できる状態にあることが必要であろうと推定される。上記の試作構造においては、各神経細胞が凹部中に収容されており、隣接する神経細胞との間に基板表面の５μｍの段差があるため相互に相手細胞を確認し難い。そのため、神経細胞ネットワークの形成が阻害され、神経細胞の死亡率の増大、シナプス形成の未成熟等の不具合を生じると考えられる。

【００１２】

非特許文献１は、複数の突起部で囲まれた領域に神経組織を配置するものの、対象は、能動的な移動性を有しない巻貝の巨大な神経節である。そして、複数の突起部の相互間隔は優に５０μｍを超え、通常の神経細胞の移動を全く制約できない。しかも５μｍの高さを超える凹凸に富んだトランジスター基板上に構成されるものである。

【００１３】

次に非特許文献２では、各ケージ中の神経細胞は相互に高さ約９μｍのケージと称する凹凸構造に囲まれている。そしてケージには、幅１０μｍ、高さ１μｍの軸索伸長用のトンネルを設けているが、このような狭いトンネルを通じてケージ中の神経細胞が互いに相手の神経細胞を認識するは困難である。従って、非特許文献１、２においては上記の問題点を解決できず、その解決手段の示唆もない。

【００１４】

更に、ハイスループットスクリーニング応用を前提とした神経細胞ネットワークの形成方法としては、いかにして神経細胞を播種するかという点も重要な技術である。例えば、測定点を１００点とし、測定点の周囲に細胞定着部を２５点有するネットワークを形成する場合、合計で２５００点の細胞定着部に所定の数の神経細胞の細胞体を短時間に、通常は１時間以内に播種する必要がある。

【００１５】

しかし、非特許文献１、２では多数の細胞定着部に効率的に神経細胞を播種するための神経細胞播種システムを開示しない。又、通常のピペットや、計量機能付きのピペット、あるいはマイクロインジェクター等の器具を用いて、手作業により個々の細胞定着部に神経細胞を播種すると言う方法では、第１に極めて微小な細胞定着部に正確に播種することが困難であり、第２に播種効率が極端に劣るため、非現実的である。

【００１６】

従って、多数の細胞定着部に、短時間で、かつほぼ同時に無損傷で細胞を播種することができる神経細胞播種用のデバイスが求められる。このデバイスは、装置基板上における平面方向への神経細胞ネットワークの形成を阻害しないように構成されなければならない。

【００１７】

そこで本発明は、上記の問題点を解決できる神経細胞ネットワーク形成用の培養装置と神経細胞ネットワーク形成方法を提供することを、解決すべき第１の課題とする。更に、このような神経細胞ネットワークを利用するプレーナーパッチクランプ装置、ハイスループットスクリーニング技術、神経細胞イメージング技術等を提供することを、解決すべき

第２の課題とする。

【００１８】

更に、神経細胞ネットワーク形成用培養装置又はこの培養装置を利用したプレーナーパッチクランプ装置における多数の細胞定着部に効率的に神経細胞を播種するための神経細胞播種デバイスを提供することを、解決すべき第３の課題とする。

【課題を解決するための手段】

【００１９】

（第１発明の構成）

上記課題を解決するための第１発明の構成は、細胞培地を充填可能な平坦な基板上に、複数の突起部で囲まれた細胞定着部を形成し、この細胞定着部が下記（１）～（３）の条件を備えている、神経細胞ネットワーク形成用培養装置である。

（１）細胞定着部を構成する複数の突起部間には、神経細胞の細胞体を通過させない限りにおいて広い間隔が設定されている。

（２）複数の突起部により規定される細胞定着部の内径が、１～数個の神経細胞の細胞体を収容できるサイズである。「数個」とは、２～１０個、より好ましくは２～６個、更に好ましくは３～５個である。

（３）細胞定着部の底面を構成する基板面には、以下の（ア）及び（イ）の内の少なくとも一方の要素を備える。

（ア）細胞外マトリクス形成物質をコーティングしている。

（イ）前記基板面の下部に設けた吸引装置による培地吸引用の微細貫通孔であって、神経細胞を通過させない孔径のものを設けている。

なお、上記の第１発明において、「１～数個の神経細胞の細胞体」とは、１個以上で１０個以下、より好ましくは１個以上で５個以下の神経細胞の細胞体を意味する。

【００２０】

（第２発明の構成）

上記課題を解決するための第２発明の構成は、前記第１発明に係る培養装置が以下（１）～（３）のいずれかに該当する、神経細胞ネットワーク形成用培養装置である。

（１）前記基板上に選択領域としての細胞定着部が形成され、この細胞定着部に選択細胞としての神経細胞が１～数個配置されると共に、他の神経細胞は単に基板上に播種される。

（２）前記基板上に複数の細胞定着部が適宜な相互間隔をもって形成され、これらの細胞定着部には神経細胞が１～数個配置されると共に、その内の１の細胞定着部が神経細胞を配置した選択領域として用いられる。

（３）前記基板上に上記（１）又は（２）に該当する神経細胞ネットワークのユニットを複数ないし多数形成できるように、上記の細胞定着部を適宜な位置に分散して形成させた、神経細胞ネットワークのハイスループット解析用培養装置。

【００２１】

上記の第２発明について、その概念図である図４（ａ）及び図４（ｂ）に基づいて説明する。図４（ａ）は第２発明の（１）に係る培養装置における基板上の要部の平面図を示し、中央に図示した神経細胞１１（実際には１～数個の神経細胞）は複数（６本）の円柱状の突起部１２で囲まれた細胞定着部１３である選択領域中に配置され、その周囲の神経細胞１１は単に基板上に播種されている。そして、これらの神経細胞１１によってネットワークが形成される。

【００２２】

一方、図４（ｂ）は第２発明の（２）に係る培養装置における基板上の要部の平面図を示し、基板上に複数の細胞定着部１３が適宜な相互間隔をもって形成され、これらの細胞定着部１３にはそれぞれ神経細胞１１（実際には１～数個の神経細胞）が配置されると共に、その内の１の細胞定着部１３が選択領域として用いられる。そしてこれらの神経細胞１１によってネットワークが形成される。

【００２３】

なお、第２発明の（３）に係る培養装置においては、図４（ａ）又は図４（ｂ）に示すような神経細胞ネットワークのユニットが、相互に独立したネットワークのユニットとなるように、基板上の適宜な位置に分散して複数ないし多数形成される。

【００２４】

（第３発明の構成）

上記課題を解決するための第３発明の構成は、前記第１発明又は第２発明において、神経細胞ネットワーク形成用培養装置が神経細胞ネットワークを対象とするプレーナーパッチクランプ装置であって、

（１）前記基板が電気絶縁性基板であって、その電気絶縁性基板の細胞定着部の底面を構成する基板面の両側の表面を連通させる前記微細貫通孔を設け、（２）微細貫通孔の第一表面側である神経細胞ネットワーク形成側と、その反対側である第二表面側にはそれぞれ、前記細胞培地である導電性液体を保持するための液溜部と、該液溜部の導電性液体に対して通電可能に配置された電極部とを設け、（３）第一表面側の液溜部が前記細胞定着部に定着された神経細胞用の液溜部とされている、神経細胞ネットワーク形成用培養装置である。

【００２５】

（第４発明の構成）

上記課題を解決するための第４発明の構成は、前記第３発明に係るプレーナーパッチクランプ装置において、前記第一表面側及び第二表面側の電極部が以下の（ａ）～（ｃ）の要素を備える、神経細胞ネットワーク形成用培養装置である。

（ａ）前記液溜部に導電性液体が導入された際にその導電性液体に接することとなる容器壁の少なくとも一部が無機多孔質材料で構成されている電極容器。

（ｂ）上記の電極容器内に収容された、貴金属Nmの表層部にその貴金属の塩化物NmCl層を形成した電極。

（ｃ）上記の電極容器内に充填された、前記貴金属の塩化物NmCl及びアルカリ金属塩化物が飽和濃度で溶解した電極溶液。

【００２６】

（第５発明の構成）

上記課題を解決するための第５発明の構成は、前記第１発明～第４発明のいずれかにおいて、神経細胞ネットワーク形成用培養装置が以下（Ａ）～（Ｃ）のいずれかの目的に使用されるものである、神経細胞ネットワーク形成用培養装置である。

（Ａ）神経細胞ネットワークにおける神経細胞イオンチャンネル電流の計測・解析に用いる。

（Ｂ）少なくとも、Caイメージング解析、前シナプス部位のマーカーであるsynaptophysin又は synapsinの標識によるイメージング解析、樹状突起のマーカーであるMAP2の標識によるイメージング解析、及び、エンドソームやエキソソームを標識するFM1-43又はFM4-64によるイメージング解析を包含するイメージング解析に用いる。

（Ｃ）神経細胞ネットワークのハイスループットスクリーニングシステムに用いる。

【００２７】

（第６発明の構成）

上記課題を解決するための第６発明の構成は、前記第５発明において、神経細胞ネットワーク形成用培養装置が（Ｂ）に記載のイメージング解析に用いるものである場合に、更に下記（Ｄ）～（Ｆ）の１以上の要素を備える、神経細胞ネットワーク形成用培養装置である。

（Ｄ）前記基板の上部に、神経細胞が発する光の受光装置を設置している。

（Ｅ）前記基板の上部に、神経細胞あるいは基板表面に光を照射する照射装置を設置している。

（Ｆ）上記（Ｅ）の照射装置は、所定の単一の神経細胞にのみ光を照射ための集光系を装備している。

【００２８】

（第７発明の構成）

上記課題を解決するための第７発明の構成は、第１発明～第６発明のいずれかに記載の神経細胞ネットワーク形成用培養装置を用いて、任意の研究目的のもとに培養下の神経細胞ネットワークを形成させる方法であって、

（１）細胞培地充填下の前記平坦な基板上に神経細胞を播種する工程と、

（２）細胞定着部の細胞外マトリクス形成物質により、及び／又は、細胞定着部の底面の微細貫通孔から液体培地を吸引することにより、一つの細胞定着部ごとに１～数個の神経細胞を配置・定着させる工程と、

（３）細胞定着部に定着した神経細胞の移動を複数の突起部により制約しつつ、複数の突起部の間隔部分により相互に相手の神経細胞の存在を認識させて軸索又は樹状突起による神経細胞間のシナプス接合を形成させる工程と、

を含む、神経細胞ネットワーク形成方法である。

【００２９】

（第８発明の構成）

上記課題を解決するための第８発明の構成は、前記第７発明の神経細胞ネットワーク形成方法において、（１）の工程で神経細胞を播種する際、併せてグリア細胞を細胞定着部以外の部分に播種する、神経細胞ネットワーク形成方法である。

【００３０】

（第９発明の構成）

上記課題を解決するための第９発明の構成は、神経細胞ネットワーク形成用培養装置又はこの培養装置を利用したプレーナーパッチクランプ装置における細胞培地を充填可能な平坦な装置基板上に設置して、装置基板における複数の突起部で囲まれた多数の細胞定着部に神経細胞を播種するための神経細胞播種デバイスであって、

前記装置基板上への設置が可能なボード状のデバイス本体が、その設置状態において前記多数の細胞定着部を覆う広さを持つと共に、その平坦な底面が多数の細胞定着部における複数の突起部の頂端に接するようになっており、

デバイス本体には、（１）神経細胞を一定密度で懸濁させた神経細胞懸濁液を外部から供給するための懸濁液供給口と、（２）デバイス本体の内部において前記懸濁液供給口から分枝状に延設させた多数の微細な懸濁液流路と、（３）前記各懸濁液流路の端末においてデバイス本体の底面に開口した、神経細胞懸濁液を前記各細胞定着部に注入するための懸濁液注入口と、

を設けた、神経細胞播種デバイスである。

【００３１】

（第１０発明の構成）

上記課題を解決するための第１０発明の構成は、前記第９発明に係る神経細胞播種デバイスにおいて、多数の前記懸濁液流路が実質的に同一の長さに設定され、かつ、神経細胞ネットワーク形成用培養装置又はプレーナーパッチクランプ装置の装置基板上に前記神経細胞播種デバイスを設置した際に個々の前記懸濁液注入口が個々の前記細胞定着部に正確に対応して位置するように設計されている、神経細胞播種デバイスである。

【００３２】

（第１１発明の構成）

上記課題を解決するための第１１発明の構成は、前記第９発明又は第１０発明に係る神経細胞播種デバイスにおけるボード状のデバイス本体が、前記懸濁液供給口を設けた上部ボードと前記懸濁液注入口を設けた下部ボードとを密着状態で接合させてなり、かつ、上部ボードと下部ボードの少なくとも一方の接合面に前記懸濁液流路を構成する溝を形成している、神経細胞播種デバイスである。

【００３３】

（第１２発明の構成）

上記課題を解決するための第１２発明の構成は、前記第９発明～第１１発明のいずれかに係る神経細胞播種デバイスにおける神経細胞ネットワーク形成用培養装置が第１発明に

記載の神経細胞ネットワーク形成用培養装置であり、及び／又は、前記第９発明～第１１発明のいずれかに係るプレーナーパッチクランプ装置が第３発明に記載のプレーナーパッチクランプ装置である、神経細胞播種デバイスである。

【００３４】

（第１３発明の構成）

上記課題を解決するための第１３発明の構成は、前記第９発明～第１２発明のいずれかに係る神経細胞播種デバイスにおけるデバイス本体が、前記神経細胞ネットワーク形成用培養装置又は前記プレーナーパッチクランプ装置の装置基板における前記細胞定着部以外の領域に対して前記神経細胞懸濁液を注入するための第２懸濁液流路を更に備えている、神経細胞播種デバイスである。

【発明の効果】

【００３５】

（第１発明の効果）

第１発明の神経細胞ネットワーク形成用培養装置においては、平坦な基板上に形成された、複数の突起部で囲まれた細胞定着部を備えるので、ここに配置された神経細胞は、複数の突起部によりランダムな移動を制約される。従って、神経細胞のランダムな移動が制約される。

【００３６】

但し、細胞定着部の内側と外側とは同一の平坦な基板面上にあり、その間に段差（凹凸）はない。しかも、細胞定着部における複数の突起部間には神経細胞の細胞体を通過させない限りにおいて広い間隔が設定され、この間隔部分は上方が開放された空間であって、前記非特許文献２に開示するような狭いトンネル空間ではない。従って、細胞定着部に配置された神経細胞はネットワークを形成すべき相手の神経細胞を互いに容易に認識することができ、突起部間の間隔を利用した軸索と樹状突起とのシナプス接合の形成に基づく良好な神経細胞ネットワークを構成することができる。

【００３７】

更に、複数の突起部により規定される細胞定着部の内径が、１～数個の神経細胞の細胞体を収容できるサイズであるため、細胞定着部には１～数個の神経細胞の細胞体が配置され、定着される。一般的に神経細胞（特にiPS細胞等）は数個程度の集合体（クラスター）の状態である方が、長期間にわたり安定に生存できる。反面、細胞定着部に単一の神経細胞が配置されている方が、神経細胞間の信号伝達が単純化されてネットワーク機能の解析が容易となる。第１発明では細胞定着部に１～数個の神経細胞の細胞体が配置・定着されるので、上記の双方の要求をバランス良く満足させることができる。

【００３８】

第１発明の神経細胞ネットワーク形成用培養装置を用いた場合、４週間以上の長期にわたり神経細胞を生存させ、活性な神経細胞ネットワークを維持することが可能である。

【００３９】

更に第１発明では、細胞定着部の底面を構成する基板面には神経細胞に対する接着力を示す細胞外マトリクスをコーティングし、及び／又は、基板の下部に設けた吸引装置による細胞培地吸引用の微細貫通孔であって、神経細胞を通過させない孔径のものを設けている。従って、神経細胞の播種時において網目状の神経細胞ネットワークでの網目の結節点となる細胞定着部には、１～数個の神経細胞の細胞体が確実に配置され、かつ定着される。以上の点から、第１発明によれば、前記した本発明の課題を解決できる。

【００４０】

（第２発明の効果）

第２発明によって、図４（ａ）に示すような神経細胞ネットワークや、図４（ｂ）に示すような神経細胞ネットワークを形成するための神経細胞ネットワーク形成用培養装置が提供され、更に、基板上には、これらの神経細胞ネットワークのユニットを複数ないし多数形成できる。従って、神経細胞ネットワークのハイスループット解析用培養装置も提供される。

【００４１】
（第３発明の効果）
プレーナーパッチクランプ装置とは、シリコンチップのような電気絶縁性の固体基板上に複数のパッチクランプ装置を構成して多点計測を可能にし、各パッチクランプ装置の細胞配置部位にはそれぞれ、イオンチャンネル電流を計測するための微細な貫通孔を設けたものである。第３発明のプレーナーパッチクランプ装置においては、前記第１発明における（３）の（イ）に規定する「基板の下部に設けた吸引装置による細胞培地吸引用の微細貫通孔」が、イオンチャンネル電流計測用の微細な貫通孔として用いられる。
【００４２】
又、第二表面側の細胞培地に、神経細胞を誘引する効果を有するアデノシン５－βチオ二リン酸、ウリジン５－三リン酸三ナトリウム塩水和物、EGF等の物質を混入して神経細胞を第二表面側の細胞培地に誘引すると、神経細胞が微細貫通孔に誘導されるので、培養期間中、神経細胞をより確実に微細貫通孔上に留めることができる。
【００４３】
従来のプレーナーパッチクランプ装置は、細胞培養の機能を有しないため、神経細胞のような培養を必要とする細胞に適用できないと言う問題があった。即ち、測定対象とする細胞の寿命が非培養条件下では１時間ないしは３０分以下と短いため、創薬スクリーニング等の限られた応用しかできず、ピペットパッチクランプが活用されている細胞の機能解析等への応用が困難であった。更に、基板に設けた微細な貫通孔の部位に細胞をうまく運んでトラップすることが困難であった。
【００４４】
しかし、第３発明によれば、第１発明又は第２発明に係る神経細胞ネットワーク形成用培養装置を神経細胞ネットワークを対象とするプレーナーパッチクランプ装置として用いることで、培養を必要とする神経細胞の神経細胞ネットワークを対象とし、かつ、測定対象とする神経細胞の寿命が著しく延長されたプレーナーパッチクランプ装置を提供できる。そして、第２発明の（３）に規定する神経細胞ネットワーク形成用培養装置を利用すれば、神経細胞ネットワークについてハイスループットなスクリーニングを行うことができる。
【００４５】
（第４発明の効果）
ところで、上記第３発明のようなプレーナーパッチクランプ装置においても、次に述べるような課題がある。
【００４６】
即ち、前記第１発明における（３）の（ア）のように、イオンチャンネル電流を計測する微細貫通孔の周縁（細胞定着部）に細胞外マトリックス形成物質を付着させている場合、神経細胞の細胞膜と微細貫通孔周縁の基板表面との間に僅かな隙間ができ、いわゆるシール抵抗が低下してしまう。この隙間を流れる電流は、イオンチャンネル電流に対してリーク電流として加わり、これが変動するとノイズとして寄与することになる。従ってシール抵抗が低下した状態においては、僅かの印加膜電位の変動に対してもノイズ電流が大きくなり、イオンチャンネル電流の正確な計測が困難になる。
【００４７】
細胞のイオンチャンネル電流の正確な計測を図る上で、上記のようにプレーナーパッチクランプ装置のシール抵抗が低い場合はもちろんのこと、シール抵抗が低くない場合でもノイズ電流対策を施しておくことは有効かつ重要である。ノイズ電流対策としては、シール抵抗の増大以外に、電極側の印加膜電位の変動を抑制することも効果的である。
【００４８】
そして、プレーナーパッチクランプ装置の電極として貴金属Nm（例えば銀Ag）の表層部にその貴金属の塩化物NmCl層（例えばAgCl層）を形成した電極を用いる場合、上記のような印加膜電位の変動は、主としてAgCl/Ag電極の表面とそれを取り囲む溶液との間の界面電位の変動や、液－液界面電位の変動によるものである。

【００４９】
そこで第４発明のように、電極部の電極容器内においてAgCl/Ag電極をAgCl及びアルカリ金属塩化物（例えばKCl）の飽和溶液である電極溶液（KCl濃度は百数十ミリモル程度）に浸し、これらを無機多孔質材料で構成された容器壁を介して細胞培養液のような導電性液体（KCl濃度は数ミリモル程度）に接触させておくと、電極容器の内部と外部が電気的に導通した状態となる。しかし、液体そのものは無機多孔質材料の細孔を余り通過できないため、電極容器内部の電極溶液と電極容器外部の導電性液体との混合は無視できる程に小さい。その結果、電極容器の内部と外部におけるKClの大きな濃度差が一定に保たれ、AgCl/Ag電極の界面電位や、液－液界面電位が一定となり、印加膜電位の変動が起こらないのである。

【００５０】
（第５発明の効果）
第５発明によれば、第１発明～第４発明の神経細胞ネットワーク形成用培養装置を、（Ａ）神経細胞ネットワークにおける神経細胞イオンチャンネル電流の計測・解析、（Ｂ）少なくとも、Caイメージング解析、前シナプス部位のマーカーであるsynaptophysin又はsynapsinの標識によるイメージング解析、樹状突起のマーカーであるMAP2の標識によるイメージング解析、及び、エンドソームやエキソソームを標識するFM1-43又はFM4-64によるイメージング解析を包含するイメージング解析、（Ｃ）神経細胞ネットワークのハイスループットスクリーニングシステム、のいずれかに用いることができる。

【００５１】
（第６発明の効果）
第６発明によれば、前記第５発明の神経細胞ネットワーク形成用培養装置が（Ｃ）に記載のイメージング解析に用いるものである場合に、更に上記した（Ｄ）の受光装置、（Ｅ）の照射装置、（Ｆ）の集光系の１以上の要素を備えるので、第１に多くの場合に非接触かつ非破壊での計測が可能となるため神経細胞ネットワーク機能を阻害することなく解析でき、第２に光計測であるため高速で解析でき、第３に細胞定着部に複数の神経細胞（細胞クラスター）が配置されていても（Ｆ）の集光系により正確に単一の神経細胞を励起して精密に解析できると言う効果が得られる。

【００５２】
（第７発明の効果）
第７発明の神経細胞ネットワーク形成方法によれば、第１発明～第６発明のいずれかに記載の神経細胞ネットワーク形成用培養装置を用いて、前記した（１）～（３）の工程を行う。

【００５３】
従って、細胞培地を充填した平坦な基板上に神経細胞を播種する際、各細胞定着部の細胞外マトリクス形成物質により、あるいは細胞定着部の底面の微細貫通孔から細胞培地を吸引することにより、その細胞定着部に１～数個の神経細胞の細胞体を確実に配置させ、定着させることができる。より具体的には、細胞定着部の微細貫通孔上に細胞体を配置、定着させることができる。

【００５４】
又、その際、各細胞定着部の内径が１～数個の神経細胞の細胞体を収容できるサイズとほぼ対応するので、各細胞定着部には確実に１～数個の神経細胞が配置される。そしてこれらの神経細胞は、細胞定着部を構成する複数の突起部によりランダムな移動を制約される。しかも細胞定着部の内側と外側とは同一の平坦な基板面上にあり、その間に段差（凹凸）はないため、細胞定着部に配置された神経細胞は、細胞定着部を構成する複数の突起部の間隔を通して、ネットワークを形成すべき相手の神経細胞を互いに容易に認識することができる。従って、神経細胞は活性な生存状態に維持されつつ、突起部間の間隔を利用した軸索と樹状突起とのシナプス接合の形成に基づく良好な神経細胞ネットワークを構成することができる。

【００５５】

以上の点から第７発明によれば、各細胞定着部に配置・定着させた１個の神経細胞あるいは数個の神経細胞クラスターの相互間に神経細胞ネットワークを良好に形成させることができる。この方法による場合、ほぼ１００％の確率で神経細胞が安定なネットワークを形成し、４週間以上の長期にわたって培養を継続することができる。従って、神経細胞ネットワークのハイスループットスクリーニング素子制作にきわめて有用な技術である。

【００５６】

（第８発明の効果）

第８発明によれば、上記第７発明の（１）の工程で神経細胞を播種する際、神経細胞を選択領域内と選択領域外とに播種すると共にグリア細胞を選択領域外に播種する。よって「F.W. Pfrieger et al., Science 277(1997)1684-1687」等の文献により知られるように、シナプスの近傍にグリア細胞が存在し神経細胞に接触することになるので、神経細胞ネットワークの成熟度が高まり、時空間的に機能がより均一な神経細胞ネットワークを構成できる。

【００５７】

（第９発明の効果）

第９発明によれば、神経細胞ネットワーク形成用培養装置又はこの培養装置を利用したプレーナーパッチクランプ装置における多数の細胞定着部に効率的に神経細胞を播種するための神経細胞播種デバイスが提供される。よって、ハイスループットスクリーニング応用を前提とした神経細胞ネットワークの形成において、いかにして神経細胞を播種するかという重要な問題の解決手段が提供される。

【００５８】

このデバイスのボード状のデバイス本体には、（１）神経細胞懸濁液を外部から供給するための懸濁液供給口と、（２）この懸濁液供給口から分枝状に延設させた多数の微細な懸濁液流路と、（３）各懸濁液流路の端末においてデバイス本体の底面に開口した懸濁液注入口とを設けている。従って、装置基板上に設けた細胞定着部が例えば数百ケ所と言う極めて多数であっても、これらのすべての細胞定着部に短時間で神経細胞懸濁液を供給できる。

【００５９】

なお、懸濁液供給口への神経細胞懸濁液の供給方法は限定されないが、多数の微細な懸濁液流路における流体摩擦抵抗を考慮すれば、懸濁液供給口に液体を圧入することができる器具や装置（例えば、インジェクターやマイクロシリンジ、あるいは小さなポンプ式の圧入装置等）によって、加圧状態下で神経細胞懸濁液を供給することが好ましい。その際、液体圧入の器具や装置の注口のサイズが懸濁液供給口の内径よりも大きい場合が多いので、そのような場合には、先端側が縮径された接続用パイプを液体圧入器具／装置の注口に装着し、その縮径された先端側を懸濁液供給口に差し込むことができる。接続用パイプにおける先端側の縮径された部分として、例えば、ステンレス製の小さなノズル状のパイプ体を取り付けることができる。

【００６０】

細胞定着部に注入された神経細胞は、細胞定着部の複数の突起部により細胞定着部からの流出を阻止されて細胞定着部内にとどまる。一方、懸濁媒体液は、細胞定着部の複数の突起部の間から流出する。そのため、神経細胞がストレスの小さな無傷の状態で細胞定着部に播種される結果となる。しかも、このような神経細胞の播種が一斉に行われるので、装置基板上の多数の細胞定着部に対する神経細胞の播種が、ほぼ同時に、かつ非常に短い時間内（数十秒程度）に完了する。

【００６１】

更に重要な点として、この神経細胞播種デバイスは、神経細胞ネットワーク形成用培養装置又はプレーナーパッチクランプ装置における、細胞培地を充填可能な平坦な装置基板上に設置するものである。従って、細胞定着部に対して、上方から神経細胞懸濁液を注入する構造である。よって、装置基板上における平面方向への神経細胞ネットワークの形成の障害とならない。

【００６２】
なお、神経細胞播種デバイスを神経細胞ネットワーク形成用培養装置又はプレーナーパッチクランプ装置の装置基板上に固定的に設置することも可能であるが、これを着脱可能に設置する場合、神経細胞播種後に取り外しておけば、播種後の神経細胞の培養において、酸素や炭酸ガスの供給の妨げとならないほか、ネットワークを上部から観測したり、薬液を投与するうえでも妨害とならない。
【００６３】
（第１０発明の効果）
第１０発明によれば、多数の前記懸濁液流路が実質的に同一の長さに設定されているので、装置基板上の多数の細胞定着部に対する神経細胞の播種が正確に同時に完了する。このことは、換言すれば、神経細胞懸濁液における神経細胞の分散密度を調節した上で、懸濁液供給口から供給する神経細胞懸濁液の液量を制御すれば、個々の細胞定着部への神経細胞懸濁液の注入量（ひいては播種される神経細胞の個数）をほぼ正確にコントロールできると言う効果を意味し、しかも、多数の細胞定着部において播種される神経細胞の個数をほぼ均一に制御できると言う効果も意味する。これらの効果は、ハイスループットスクリーニング応用を前提とした神経細胞ネットワークの形成において、重大な効果であると言うことができる。
【００６４】
又、神経細胞ネットワーク形成用培養装置又はプレーナーパッチクランプ装置の装置基板上に前記神経細胞播種デバイスを設置した際に、個々の懸濁液注入口が個々の細胞定着部に正確に対応して位置するように設計されているので、多数の細胞定着部に対する神経細胞の播種が正確に行われる。なお、この点に関しては、神経細胞ネットワーク形成用培養装置又はプレーナーパッチクランプ装置の装置基板上に神経細胞播種デバイスを設置する際の、両者の位置合わせ用の標識マークを、装置基板とデバイス本体の少なくとも一方に設けておいても良く、デバイス本体が透明度の高い材料からなる場合、このような標識マークを透視できるので、特に有効である。
【００６５】
（第１１発明の効果）
第１１発明によれば、ボード状のデバイス本体が懸濁液供給口を設けた上部ボードと懸濁液注入口を設けた下部ボードとを接合させてなり、両者のボードの少なくとも一方の接合面に懸濁液流路を構成する溝を形成しているので、デバイス本体の内部に微細かつ屈曲された形態の懸濁液流路を多数構成するための加工が容易である。但し、懸濁液流路を構成するための加工方法は、このようなものに限定されない。
【００６６】
（第１２発明の効果）
第１２発明によれば、神経細胞ネットワーク形成用培養装置が第１発明に記載のものであり、及び／又は、プレーナーパッチクランプ装置が第３発明に記載のものであると言う、神経細胞播種デバイスの具体的かつ好適な実施形態が提供される。
【００６７】
（第１３発明の効果）
神経細胞ネットワーク形成用培養装置やプレーナーパッチクランプ装置の装置基板における細胞定着部のみに神経細胞を播種したのでは、装置基板における神経細胞の全体的な固体数が不足するため、神経細胞ネットワークが良好に形成されないことも多い。この問題を解決するため、第１３発明によれば、デバイス本体が、装置基板における前記細胞定着部以外の領域に対して神経細胞懸濁液を注入するための第２懸濁液流路を更に備えている。そのため、装置基板における細胞定着部以外の領域に対しても適宜に神経細胞懸濁液を注入して神経細胞を播種することができるので、神経細胞ネットワークが特に良好に形成される。
【図面の簡単な説明】
【００６８】

【図１】本願発明者が試作した基板上の凹部構造（比較例）を示す。
【図２】非特許文献１に開示されたSi基板上の構造を示す。
【図３】非特許文献２に開示されたケージの構造を示す。
【図４】第２発明の（１）、（２）に係る神経細胞ネットワーク形成用培養装置の要部の概念化した平面図を示す。
【図５】第１実施例の断面図を示す。
【図６】第２実施例の概要を示す。
【図７】第３実施例の概要を示す。
【図８】第４実施例の概要を示す。
【図９】第５実施例の概要を示す。
【図１０】第６実施例の概要を示す。
【図１１】第７実施例における神経細胞播種デバイス本体の概要を示す。
【図１２】第７実施例における第１、第２懸濁液流路系の概要を示す。
【図１３】第７実施例における第１懸濁液流路系の要部の詳細を示す。
【図１４】ラット海馬の神経細胞における播種時のサイズを示す。
【図１５】ラット海馬の神経細胞における培養時のサイズを示す。
【図１６】ラット海馬の神経細胞で行った別の実験を示す光学顕微鏡写真である。
【符号の説明】
【００６９】

１	基板
２	細胞定着部
３	神経細胞
４	微細貫通孔
５	電流増幅器
６	マイクロピペット
７	上部電極
８	下部電極
９	細胞外マトリックス形成物質
１１	神経細胞
１２	突起部
１３	細胞定着部
１４	基板
１５	微細貫通孔
１６	スペーサー
１７	スペーサー
１８	培養スペース
１９	切欠き部
２０	プレート
２１	プレート
２２	主液溜
２３	液溜部
２４	通液路
２５	副液溜
２６	導入用通液路
２７	排出用通液路
２８	電極部
２９	電極部
３０	細胞外マトリックス形成物質
３１	電極容器
３２	電極溶液

３３　AgCl/Ag電極
３４　無機多孔質材料
３５　電極ピン
３６　外側細胞定着部
４０　デバイス本体
４１　上部ボード
４２　下部ボード
４３　懸濁液供給口
４３ａ　第２懸濁液供給口
４４　懸濁液流路
４４ａ　第２懸濁液流路
４５　懸濁液注入口
４５ａ　第２懸濁液注入口
４６　注入口設定部

【発明を実施するための形態】

【００７０】

次に本発明の実施形態を、その最良の形態を含めて説明する。本発明の技術的範囲は、これらの実施形態によって限定されない。

【００７１】

〔本発明の技術分野〕

本発明の技術分野は、神経細胞を安定した状態で培養しつつ神経細胞ネットワークを形成させる技術分野に関する。又、細胞表面のイオンチャンネル電流を計測する技術分野に属する。更に、細胞に電流注入あるいは電圧印加により刺激を与えることを行う分野に関する。更に、イオンチャンネル電流を計測あるいは細胞に電流を注入し、あるいは電圧を印加して刺激を与えるタイプのハイスループットスクリーニング技術分野にも属する。更に、神経細胞あるいは神経細胞ネットワークを対象とするCaイメージングその他の種々のイメージング技術分野にも属する。

【００７２】

〔神経細胞、神経細胞ネットワーク〕

神経細胞は、細胞の本体である細胞体とこの細胞体から伸長される軸索及び樹状突起からなる。神経細胞の種類は限定されないが、第１に、中枢神経細胞、末梢神経細胞等の各種の神経細胞が例示され、特に、未だ軸索や樹状突起を突出させていない状態のものが好ましい。又、第２に、例えばｉＰＳ細胞やＥＳ細胞のように神経細胞に分化可能な細胞、より好ましくは、ｉＰＳ細胞やＥＳ細胞から神経細胞への分化の完成途上にある神経幹細胞等の状態にあるものが例示される。更に、第３に、細胞相互間にネットワークを形成する性質を持つ細胞、及び、細胞相互間にネットワークを形成する性質を持つ細胞に分化が可能な細胞が例示される。神経細胞としては、動物の神経細胞、特にヒトを包含する哺乳動物の神経細胞が好ましい。これらの神経細胞における細胞体のサイズは、通常は２０μｍ未満であり、より具体的には３～１８μｍ程度である。

【００７３】

神経細胞ネットワークは、信号を発信するトリガー細胞とそれを受けるフォロワー細胞の一対の神経細胞が構造上の基本単位である。本願発明者は、トリガー細胞とフォロワー細胞の存在する面の高さに細胞の大きさ程度の段差があると、細胞の死亡確率が増大することを見出した。

【００７４】

〔神経細胞ネットワーク形成用培養装置〕

本発明の神経細胞ネットワーク形成用培養装置は、細胞培地（特に好ましくは液体培地）を充填可能な平坦な基板上に、複数の突起部で囲まれた細胞定着部を形成している。

【００７５】

「細胞培地を充填可能な平坦な基板」とは、例えば、後述するプレーナーパッチクラン

プ装置に関して説明するような構成である。細胞定着部は、前記の第２発明の（１）～（３）の構成に準じて基板上に複数ないし多数設定される。但し、神経細胞ネットワークにおいてはトリガー細胞とフォロワー細胞の一対の神経細胞が基本単位であるため、神経細胞の自然発火をトリガーとしてイオンチャンネル電流をフォロワー細胞で受信する構成の場合には、選択領域としての細胞定着部が一ケ所でも、機能解析素子として動作し得る。選択領域としての細胞定着部の相互間隔は、神経細胞ネットワークの種類に応じて異なるので一律に規定できないが、例えば、５０～５００μｍ程度とすることができる。

【００７６】

細胞定着部を構成する複数の突起部の形状は限定されないが、例えば柵又は杭状の突起が好ましい。突起部の高さも限定されないが、一般的に神経細胞のランダムな移動を有効に制約し得る１０μｍ程度の高さが好ましく、例えばマウス大脳皮質や海馬の神経細胞では５～１０μｍ程度の高さが好ましい。

【００７７】

次に、上記の細胞定着部は下記の（１）～（３）の条件を備えている。

【００７８】

（１）細胞定着部を構成する複数の突起部間には、神経細胞の細胞体を通過させない限りにおいて広い間隔が設定されている。突起部の間隔は、３～１８μｍ程度というバラツキを持つ哺乳動物神経細胞の細胞体の大きさに対応して決定されるものであり、一律に絶対値を定めることは困難である。1つの基準として、細胞体の大きさをＸμｍとしたとき、間隔の上限値は０．９Ｘμｍ以下、特に０．７Ｘμｍ以下であることが好ましく、間隔の下限値は０．３Ｘμｍ以上、特に０．５Ｘμｍ以上であることが好ましい。複数の突起部の上端部が相互に連結されていると、実質的にトンネル構造となるため、好ましくない。又、トンネル構造においては、トンネル内でシナプス形成が可能であるとしても、このシナプスでのイメージング観察が不可能となってしまう。

【００７９】

（２）複数の突起部により形成される細胞定着部の内径は、１～数個の神経細胞の細胞体を収容できるサイズである。細胞定着部の内径は、神経細胞の細胞体の大きさ、及び細胞定着部における細胞体の個数に対応して適宜に設定される。例えば、細胞定着部における細胞体が哺乳動物神経細胞の細胞体であって、その個数が１個の場合、細胞定着部の内径は１０～２５μｍ程度であることが好ましい。細胞定着部の内径が細胞体のサイズよりも過剰に大きいと一つの選択領域に多すぎる個数の細胞体が配置される恐れがあり、細胞定着部の内径が細胞体の大きさよりも５０％以上小さいと、細胞体が細胞定着部に安定的に配置されなくなる恐れがある。

【００８０】

（３）細胞定着部の底面を構成する基板面には、以下の（ア）及び（イ）の内の少なくとも一方の要素を備える。

【００８１】

（ア）細胞外マトリクス形成物質をコーティングしている。

【００８２】

（イ）前記基板面の下部に設けた吸引装置による培地吸引用の微細貫通孔であって、神経細胞を通過させない孔径のものを設けている。

【００８３】

このような（３）の条件の内、（ア）の細胞外マトリックス形成物質は、神経細胞に対する接着力を示すことにより、神経細胞を細胞定着部の底面に定着させるものであり、その構成材料としては、ポリリジン、コラーゲン（I型、II型、IV型）、フィブロネクチン、ラミニン、プロテオグリカン（バーシカン、デコリンなど）、プロテオグリカン（アグリカン）、リンクタンパク質、エンタクチン、テネイシン、プロテオグリカン〔コンドロイチン硫酸プロテオグリカン、ヘパラン硫酸プロテオグリカン（パールカンなど）、ケラタン硫酸プロテオグリカン、デルマタン硫酸プロテオグリカン〕、ヒアルロン酸（グリコサミノグリカンの一種）、エラスチン、フィブリン、ゼラチン、マトリゲルなどが例示さ

れる。

【００８４】

（イ）の細胞培地吸引用の微細貫通孔は、基板下部側の吸引装置で細胞培地を吸引することにより、細胞定着部に配置された１～数個の神経細胞を細胞定着部の底面に定着させるものであり、その孔径は、神経細胞を通過させない程度の、例えば１～３μｍ程度とすることができる。

【００８５】

〔プレーナーパッチクランプ装置〕

神経細胞ネットワーク形成用培養装置の有効な利用例の一つが神経細胞ネットワークを対象とするプレーナーパッチクランプ装置である。

【００８６】

（一般的なプレーナーパッチクランプ装置）

生命体を構成する細胞の表面には種々の膜タンパク質が配置されており、細胞表面の特定サイトへの化学物質（リガンド等の信号伝達物質）の結合や電気あるいは光の刺激（ゲートトリガー）により膜タンパク質の開口部であるチャンネルが開閉し、細胞膜の外側と内側の間でのイオンや化学物質の輸送が制御されている。この制御を行うイオンチャンネルは生体系の信号伝達に関わる重要な膜タンパク質であり、その機能計測や機能に関連する薬品の開発においてはチャンネルタンパク質の電気的変化、即ちイオンチャンネル電流の計測が求められる。

【００８７】

この要求に対して、これまでにピペットパッチクランプやプレーナーパッチクランプ等の技術が開発されている。ピペットパッチクランプは多点計測によるハイスループットスクリーニングに応用できないという弱点がある。これに対して、プレーナーパッチクランプは、シリコンチップのような固体基板上に複数のパッチクランプ装置を構成して細胞イオンチャンネル電流の多点計測を可能にした平面基板型のパッチクランプ装置であり、各パッチクランプ装置の細胞配置部位にはそれぞれ、イオンチャンネル電流を計測するための微細な貫通孔を設けている。

【００８８】

しかし、従来の一般的なプレーナーパッチクランプ装置は細胞培養の機能を有しないため、神経細胞のような培養を必要とする細胞に適用できないと言う問題があった。即ち、測定対象とする細胞の寿命が非培養条件下では１時間ないしは３０分以下と短いため、創薬スクリーニング等の限られた応用しかできず、ピペットパッチクランプが活用されている細胞の機能解析等への応用が困難であった。更に、基板に設けた微細な貫通孔の部位に細胞をうまく運んでトラップすることが困難であった。

【００８９】

（本発明のプレーナーパッチクランプ装置）

これに対して、本発明のプレーナーパッチクランプ装置は、上記した一般的な構成のプレーナーパッチクランプ装置に比較して、更に神経細胞の培養機能を持ち、イオンチャンネル電流計測時における雑音電流の有効な抑制と細胞の安定的な位置決めが可能な装置である。即ち、この装置の特徴的な構成は、基板に設けた微細な貫通孔における神経細胞定着用開口部に細胞固定力を付与し、かつ、基板における貫通孔の両側の表面部には電極に通電可能な液溜部を設け、この液溜部に導電性液体（例えば細胞培養液）を充填できる点にある。このプレーナーパッチクランプ装置によれば、神経細胞を微細貫通孔の位置に容易にトラップすることができ、しかも、細胞の培養条件下において十分な時間をかけてイオンチャンネル活性の測定を行うことができる。

【００９０】

具体的には、本発明のプレーナーパッチクランプ装置では、前記神経細胞ネットワーク形成用培養装置が、以下の（１）～（３）のように構成される。

【００９１】

（１）前記基板が電気絶縁性基板であって、その電気絶縁性基板の両側の表面を連通さ

せる前記微細貫通孔を設けている。

【００９２】

（２）微細貫通孔の第一表面側である神経細胞ネットワーク形成側と、その反対側である第二表面側にはそれぞれ、導電性液体を保持するための液溜部と、該液溜部の導電性液体に対して通電可能に配置された電極部とを設けている。

【００９３】

（３）第一表面側の液溜部が、前記細胞定着部に定着された神経細胞用の液溜部とされている。

【００９４】

（本発明のプレーナーパッチクランプ装置における主な構成）

従って、本発明に係るプレーナーパッチクランプ装置では、その電気絶縁性の基板における両側の表面である第一表面側（細胞を配置する表面側）と第二表面側とを連通させる微細な貫通孔を設けている。

【００９５】

電気絶縁性の基板として、ガラス製、セラミックス製、プラスチック製等の基板を好ましく使用することができる。一例として、シリコン基板を用いる場合、第一表面側のシリコン層と、中間の酸化シリコン層と、第二表面側のシリコン層とが順次に積層された構造を有するシリコン基板（ＳＯＩ基板)が好ましい。このような積層構造のシリコン基板においては、極めて絶縁性の高い中間層が二つのシリコン層間に存在するので、測定対象細胞のイオンチャンネル閉鎖時に高抵抗状態を確立でき、バックグラウンドのノイズを低減できる。

【００９６】

基板に設ける貫通孔の個数は限定されないが、複数個～多数個であることが好ましく、例えば、２個～数十個、あるいはそれ以上とされる。微細な貫通孔の内径は、液体を通過させるが神経細胞を通過させない程度の内径（例えば１～３μｍ程度）であることが好ましいが、これらの内径に限定されない。

【００９７】

又、プレーナーパッチクランプ装置においては、前記貫通孔の第一表面側と第二表面側にそれぞれ、導電性液体を保持するための液溜部と、該液溜部の導電性液体に対して通電可能に配置された電極部とを設けている。

【００９８】

液溜部の構成は、「導電性液体を保持し、かつ導電性液体に対して電極部を通電可能に配置できる」と言う要求を満たす限りにおいて構成を限定されないが、例えば第１実施例に示すように、基板の第一表面側と第二表面側にそれぞれスペーサー部材やプレート部材を重ね、スペーサー部材には基板の貫通孔に対応する領域に切欠き部を設けることで形成することができる。

【００９９】

必ずしも限定はされないが、第一表面側のスペーサー部材及びプレート部材は光不透過性の材料からなることが好ましく、第二表面側のスペーサー部材及びプレート部材は光透過性の材料からなることが好ましい。

【０１００】

液溜部は、それ自体が液密に構成されると共に、導電性液体（神経細胞を分散させた細胞培地である導電性液体）を導入したり排出したりするための通液路または開閉可能な開口部を備える。基板の第一表面側の液溜部は、その液溜部の上部をカバーグラスのような蓋用部材で塞ぎ、必要により蓋用部材を取り外して液溜部を開口させることもできる。

【０１０１】

プレーナーパッチクランプ装置においては、第一表面側及び第二表面側に新規な構成の電極部を備えるが、この点は「プレーナーパッチクランプ装置における電極部構造」の項において後述する。

【０１０２】

更に、プレーナーパッチクランプ装置においては、前記第一表面側の液溜部を、それぞれ光不透過性の材料によって構成された、細胞を配置するための主液溜と、第一表面側の電極部が配置された副液溜と、これらの液溜を連通させる狭い通液路からなる構成とすることも好ましい。又、前記第二表面側の液溜部が導電性液体を導入及び排出するための通液路と連通され、かつ、この通液路に第二表面側の電極部が配置されている構成とすることも好ましい。

【０１０３】

そして、前記第一表面側の液溜部が前記した神経細胞の選択領域に相当する。従って、第一表面側の液溜部は適宜な２次元方向の相互間隔をもって基板上に複数ないし多数設定され、これらの第一表面側の液溜部中にそれぞれ、複数の突起部で囲まれた細胞定着部が構成される。

【０１０４】

第二表面側の液溜部も、第一表面側の液溜部に対応する位置にそれぞれ設定され、第一表面側と第二表面側の液溜部は基板の微細貫通孔により連絡される。そして第二表面側の液溜部が液体吸引デバイスに連絡されており、この液体吸引デバイスによって第二表面側の液溜部に陰圧を負荷すると、微細貫通孔を通じて第一表面側の液溜部にも陰圧が負荷される。この微細貫通孔が、（イ）として前記した細胞定着部の底面の細胞培地吸引用の微細貫通孔に相当する。又、微細貫通孔における第一表面側の開口部周縁に細胞固定力を持つ細胞外マトリックス形成物質を付着させている。これが（ア）として前記した細胞定着部の底面の細胞外マトリクス形成物質のコーティングに相当する。

【０１０５】

〔プレーナーパッチクランプ装置における電極部構造〕

更に、上記のプレーナーパッチクランプ装置においては、前記第一表面側及び第二表面側の電極部が以下の（ａ）～（ｃ）の要素を備えることが好ましい。

【０１０６】

（ａ）前記液溜部に導入された導電性液体に接することとなる容器壁の少なくとも一部が無機多孔質材料で構成されている電極容器。

【０１０７】

（ｂ）上記の電極容器内に収容された、貴金属Nmの表層部にその貴金属の塩化物NmCl層を形成した電極。

【０１０８】

（ｃ）上記の電極容器内に充填された、前記貴金属の塩化物NmCl及びアルカリ金属塩化物が飽和濃度で溶解した電極溶液。

【０１０９】

上記の電極部構造における貴金属Nmの種類は限定されないが、銀Ag及び白金Ptが好ましく、特に銀Agが好ましい。従って、貴金属の塩化物NmClとしても、銀の塩化物AgCl及び白金の塩化物AgClが好ましく、特に銀の塩化物AgClが好ましい。又、アルカリ金属塩化物としては、限定はされないが、塩化カリウムKClであることが好ましい。容器壁の少なくとも一部を構成する無機多孔質材料は、好ましくは多孔質ガラス又は多孔質セラミックスである。

【０１１０】

更に前記電極部における電極が以下（１）又は（２）であることも好ましい。

【０１１１】

（１）電極容器内部に突出した棒状電極であって、貴金属Nmからなる芯材の表層部に貴金属塩化物NmCl層を形成している。

【０１１２】

（２）電極容器の壁部の内周面に形成した筒状電極であって、容器壁部側の底層が貴金属Nmの蒸着層であり、電極溶液に接する表面層が貴金属塩化物NmClの蒸着層である。

【０１１３】

〔神経細胞ネットワーク形成用培養装置を用いるイメージング解析〕

本発明に係る神経細胞ネットワーク形成用培養装置あるいはプレーナーパッチクランプ装置を用いて、少なくとも、Caイメージング解析、前シナプス部位のマーカーであるsynaptophysin又は synapsinの標識によるイメージング解析、樹状突起のマーカーであるMAP2の標識によるイメージング解析、及び、エンドソームやエキソソームを標識するFM1-43又はFM4-64によるイメージング解析等の各種のイメージング解析を行うことができる。

【０１１４】

（Caイメージング解析）

Caイメージングとは、神経細胞に予めCaプローブ（Caイオンと結合して蛍光を発する色素）を導入しておき、神経細胞に活動電位が発生した時に細胞体にCaイオンが流入する現象を蛍光として捉える方法であり、その細胞のイオンチャンネル電流を活動電位の発生時あるいは活動電位の伝搬時に生じる蛍光の観察により行い解析することができる。

【０１１５】

従って、Caプローブが導入された神経細胞を用いて神経細胞ネットワークを構成し、例えば、それらの内の単一の神経細胞に電流注入あるいは電圧印加することにより、複数ないし多数の神経細胞における前記Caイメージングによる測定を行うことができる。

【０１１６】

この方法によれば、神経細胞ネットワークを構成する単一の神経細胞（第１の神経細胞）を選択して、電流注入あるいは電圧印加により刺激して活動電位を発生させ、同時にその活動電位が神経細胞ネットワークを通じて隣接する周囲の神経細胞（第２の神経細胞）に伝搬し、更には第２の神経細胞からこれに隣接する第３の神経細胞に伝搬する様子をCaイメージングにより計測することができる。

【０１１７】

従来の技術として例えば電極刺激法があるが、この方法の場合、単一の神経細胞を選択的に刺激することが困難であり、解析が複雑となる。又、他の従来技術であるマイクロピペット電極による刺激では、単一の神経細胞を選択的に刺激できるが、ハイスループットスクリーニングに必要な多チャンネル化が困難である。本発明の手法によれば、計測部を非常に小型化できるので、多チャンネル化が容易である。

【０１１８】

（synaptophysin、synapsinによるイメージング解析）

Synaptophysinやsynapsinはシナプスベシクルの膜たんぱく質であり、前シナプス部位のマーカーであるが、これらの抗体に色素を結合させ、抗原抗体反応を利用してこれらのたんぱく質に色素を結合させることができる、これにより、シナプス部位を標識することができる。

【０１１９】

（MAP2によるイメージング解析）

MAP2は樹状突起のマーカーであるが、この抗体に色素を付加し、反応させることにより、樹状突起部位を標識することができる。

【０１２０】

（FM1-43、FM4-64によるイメージング解析）

FM1-43やFM4-64は細胞膜に可逆的に入り、細胞膜を透過せず、細胞膜に結合したときにのみ蛍光を発するという特徴を有し、エンドソームやエキソソームを標識することができる。細胞の生命機能を維持して標識できるという特徴を有する。

【０１２１】

（イメージング解析の光学系）

本発明に係る神経細胞ネットワーク形成用培養装置あるいはプレーナーパッチクランプ装置を用いて上記の各種のイメージング解析を行うに当たり、装置には以下の光学系要素を備えることが好ましい。

【０１２２】

まず、装置の基板の第１表面側の上部に、神経細胞が発する光の受光装置を設置する。又、装置の基板の第１表面側の上部に、神経細胞あるいは基板表面にレーザー光等を照射

するための照射装置を設置する。この照射装置は更に、所定の単一の細胞にのみ光を照射するための集光系を装備していることが特に好ましい。

【０１２３】

以上の光学系要素を備えることで、非接触、非破壊での光計測が可能となり、神経細胞ネットワーク機能を阻害せずに解析できると共に、高速で解析でき、更に、集光系により正確に単一の神経細胞を励起して精密に解析できる。

【０１２４】

〔神経細胞播種デバイス〕

本発明に係る神経細胞播種デバイスは、神経細胞ネットワーク形成用培養装置又はこの培養装置を利用したプレーナーパッチクランプ装置における、細胞培地を充填可能な平坦な装置基板上に設置して、装置基板における複数の突起部で囲まれた多数の細胞定着部に神経細胞を播種するためのものである。

【０１２５】

ここで言う「神経細胞ネットワーク形成用培養装置」とは、細胞培地を充填可能な平坦な装置基板上に複数の突起部で囲まれた多数の細胞定着部を形成したものである限りにおいて、その構成を限定されない。又、「プレーナーパッチクランプ装置」も、神経細胞ネットワーク形成用培養装置を利用した装置であって、細胞培地を充填可能な平坦な装置基板上に複数の突起部で囲まれた多数の細胞定着部を形成したものである限りにおいて、その構成を限定されない。しかし、特に好ましくは、「神経細胞ネットワーク形成用培養装置」とは前記した実施形態に係る本発明の神経細胞ネットワーク形成用培養装置であり、「プレーナーパッチクランプ装置」とは前記した実施形態に係る本発明のプレーナーパッチクランプ装置である。

【０１２６】

本発明の神経細胞播種デバイスにおいては、そのデバイス本体が、神経細胞ネットワーク形成用培養装置又はプレーナーパッチクランプ装置の装置基板上に設置が可能なボード状の形態を有している。一般的に、ボード状とは、薄板状又は厚板状であることを意味し、多くの場合には平面形状が矩形（正方形又は長方形）であることをも意味する。しかし本発明では、神経細胞ネットワーク形成用培養装置又はプレーナーパッチクランプ装置の装置基板上に設置が可能な形態であって、底面が装置基板上の多数の細胞定着部における複数の突起部の頂端に接することとなるように、少なくとも底面が平坦であり、かつ上記の装置基板上に設置した際に、底面が多数の細胞定着部を覆う広さを持つ限りにおいて、「ボード状」の具体的形態は限定されない。

【０１２７】

「ボード状」のデバイス本体としては、基本的には、神経細胞ネットワーク形成用培養装置やプレーナーパッチクランプ装置の装置基板と対応する平面形状と広さ（面積）を持つものが便宜である。デバイス本体の平面形状は矩形のものに限らず、円形、楕円形、その他の不定形であっても良く、その厚さは、例えば、数ｍｍ～数ｃｍ程度とすることができる。デバイス本体の底面の面積は装置基板の面積と対応することが好ましいが、例えば、２～３ｃｍ^{2}程度のものから数十ｃｍ^{2}程度あるいは更に大きいものまで、自由に選択することができる。

【０１２８】

デバイス本体の面積やこれに対応する装置基板の面積は、装置基板における細胞定着部の個数や、デバイス本体における後述の微細加工の集積度等の要因を考慮して、適宜に設定することが好ましい。更に、デバイス本体の構成材料は限定されないが、ガラス等の無機材料やプラスチック等の有機材料を好ましく例示できる。特に、透明な材料を用いることが好ましい。

【０１２９】

ボード状のデバイス本体は、好ましくは、懸濁液供給口を設けた上部ボードと懸濁液注入口を設けた下部ボードとを密着状態で接合させてなり、上部ボードと下部ボードの少なくとも一方の接合面に懸濁液流路を構成する溝を形成している構成が好ましい。溝の断面

形状は、半円形や矩形であり得る。この場合は、上部ボードと下部ボードとの接合後に、結果的に溝が懸濁液流路を構成する。上部ボードと下部ボードの双方に正確に対応する断面半円形の溝を形成した場合には、結果的に断面円形の懸濁液流路が構成される。

【０１３０】

しかし、ボード状のデバイス本体としては、その内部に多数の懸濁液流路を形成するための加工が可能である限りにおいて、単一のボードを用いることも可能である。光硬化性樹脂を用いた３次元光造形法（three-dimensional stereorithography）を用いれば、製造効率は劣るが、このような加工は可能である。

【０１３１】

デバイス本体には、（１）神経細胞を一定密度で懸濁させた神経細胞懸濁液を外部から供給するための懸濁液供給口と、（２）デバイス本体の内部において前記懸濁液供給口から分枝状に延設させた多数の微細な懸濁液流路と、（３）前記各懸濁液流路の端末においてデバイス本体の底面に開口した、神経細胞懸濁液を前記各細胞定着部に注入するための懸濁液注入口とを設ける。

【０１３２】

なお、神経細胞ネットワーク形成用培養装置又はプレーナーパッチクランプ装置の装置基板上に神経細胞播種デバイスを設置した際に、個々の懸濁液注入口が個々の細胞定着部に正確に対応して位置することが必要である。又、前記したように、神経細胞播種デバイスの設置の際の懸濁液注入口と細胞定着部の正確な位置決めのために、透明材料からなるデバイス本体、あるいは神経細胞ネットワーク形成用培養装置又はプレーナーパッチクランプ装置の装置基板に、位置合わせ用の標識（マーカー）を表示しておくことも好ましい。

【０１３３】

上記（１）の懸濁液供給口は、デバイス本体の上面に開口させることが好ましい。しかし、デバイス本体の側面に開口させる場合でも、本体内部に向かって斜め下向きに傾斜した懸濁液供給口であれば、利用可能である。更に、神経細胞懸濁液を懸濁液供給口に加圧状態で供給することを前提として、神経細胞の播種操作の完了後における当該懸濁液供給口からの神経細胞懸濁液の漏出等を気にしない場合には、デバイス本体の側面に懸濁液供給口を水平方向に開口させても構わない。

【０１３４】

懸濁液供給口は、デバイス本体に１ケ所だけ設けても良いが、下記（２）の微細な懸濁液流路と、下記（３）の懸濁液注入口とをかなり多数に設定する場合には、それらに対して流路設計上で連絡させ易いと言う点から、デバイス本体に懸濁液供給口を適所に分散させて複数ケ所に設けることが好ましい。懸濁液供給口を複数ケ所に設ける場合、これらに対する神経細胞懸濁液の供給は、それぞれ別のインジェクター等を用いても良いが、基端側が単一のパイプで先端側が複数のパイプに分岐した接続用パイプの基端側を単一のインジェクター等に接続し、先端側の複数のパイプをそれぞれ複数ケ所の懸濁液供給口に接続することができる。

【０１３５】

いずれの場合でも、懸濁液供給口の内径は例えば数ｍｍ以下ないし数百μｍ程度の小さなものとなる場合が多いので、「発明の効果」の項で前記したように、先端側が縮径された接続用パイプをインジェクターやマイクロシリンジ等の液体圧入用器具の注口に嵌め、先端側の縮径された部分を懸濁液供給口に差し込むことができる。接続用パイプにおける「先端側の縮径された部分」として、例えば、先端に向かって次第に細くなるコニカルな形状に形成されたステンレス製の差し込み用ノズルを用いることができる。前記した「先端側が複数のパイプに分岐した接続用パイプ」を用いて複数ケ所の懸濁液供給口に神経細胞懸濁液を供給する場合にも、分岐した各パイプの先端部に上記の差し込み用ノズルを取り付けることができる。

【０１３６】

上記（２）の懸濁液流路は、例えば、内径が５０μｍ～５００μｍ程度の微細な流路と

することができる。懸濁液流路の断面形状は、円形であっても良いし、半円形や、矩形等であっても良い。この懸濁液流路は、基本的には、デバイス本体内におけるほぼ平面方向に沿って形成するものである。懸濁液流路は、上記の懸濁液供給口から多数、分枝状に延設させるが、その分枝の形態としては、懸濁液供給口から直接に多数の懸濁液流路を分枝して延設させる場合と、懸濁液供給口から１本又は２、３本の少数の幹線状懸濁液流路を分枝させ、これらの幹線状懸濁液流路から順次に多数の懸濁液注入口に連絡する支線状懸濁液流路を分枝させてゆく場合とがある。

【０１３７】

又、懸濁液供給口から個々の懸濁液注入口までの直線距離としては、懸濁液注入口の設定位置次第で、必ずしも同一にはならない。しかし、前記第１０発明の効果に関して述べた理由から、多数の懸濁液流路における（１）の懸濁液供給口から（３）の懸濁液注入口に至るまでの長さを実質的に同一に設定することが、極めて好ましい。このような要求に対しては、例えば、特定の幹線である懸濁液流路において、及び／又は、特定の支線である懸濁液流路において、流路の長さを調節するための迂回路部分を意図的に設定することにより、対応することができる。

【０１３８】

上記（３）の懸濁液注入口に関しては、それぞれの懸濁液注入口は個々の細胞定着部に位置合わせして設定される。そして懸濁液注入口はデバイス本体の平坦な底面に下向きに開口させる。一方、前記したように、デバイス本体を神経細胞ネットワーク形成用培養装置又はプレーナーパッチクランプ装置の装置基板上に設置した際、デバイス本体の底面は細胞定着部における複数の突起部の頂端に接する。以上の点から、懸濁液注入口より注入される神経細胞懸濁液は、確実に細胞定着部の内側に注入される。この点から、懸濁液注入口の開口径は、複数の突起部により規定される細胞定着部の内径とほぼ同一か、それよりもやや小さい、あるいはやや大きい程度であることが好ましい。

【０１３９】

デバイス本体は、更に、神経細胞ネットワーク形成用培養装置又はプレーナーパッチクランプ装置の装置基板における細胞定着部以外の領域に対して神経細胞懸濁液を注入するための第２懸濁液流路系を更に備えることが、前記した第１３発明の効果の欄で記載した理由から、好ましい。

【０１４０】

この第２懸濁液流路系としては、例えば前記（１）と類似した構成の第２懸濁液供給口を、ボード状デバイス本体の適数の箇所に設けることができる。この場合の第２懸濁液供給口は、微細な懸濁液流路系を介することなく、そのままデバイス本体の底面まで貫通するものであっても良いし、前記（２）と類似した複数の第２懸濁液流路に分岐された後に、デバイス本体の底面に開口した、前記（３）に類似した第２懸濁液注入口に連絡するものであっても良い。第２懸濁液流路系においては、複数の第２懸濁液流路が実質的に同一の長さに設定されなくても構わない。

【実施例】

【０１４１】

以下に本発明の実施例を説明する。本発明の技術的範囲は、これらの実施例によって限定されない。

【０１４２】

〔第１実施例〕

第１実施例に係る装置を図５に示す。この装置は、神経細胞ネットワーク形成用培養装置を、イオンチャンンネルバイオセンサーである培養型のプレーナーパッチクランプ装置として構成したものである。

【０１４３】

この装置における電気絶縁性の基板１４として、シリコン基板を用いている。基板１４には、その第一表面側（図の上側）と第二表面側（図の下側）を連通させる、直径１～３μｍの微細貫通孔１５を設けている。図５では微細貫通孔１５を基板１４の中央に１個設

けているが、より大きな基板を用いて、複数ないし多数の微細貫通孔１５を設け、これらの各微細貫通孔１５に対してそれぞれ、以下のように構成しても良い。

【０１４４】

微細貫通孔１５の第一表面側の開口部上の基板面には、複数の突起部１２で囲まれた細胞定着部１３が形成され、この細胞定着部１３には１～数個の神経細胞１１が配置されている（図示の便宜上、１個の神経細胞のみを示す）。

【０１４５】

基板１４はその第一表面側と第二表面側を１対のスペーサー１６、１７で挟着されている。スペーサー１６、１７の構成材料は限定されないが、第一表面側のスペーサー１６については、好ましくは、弾力性のある光不透過性の材料、例えばシリコンゴムやPDMS（polydimethylesiloxane）等を用いることができる。一方、第二表面側のスペーサー１７については、好ましくは光透過性の材料を用いることができる。

【０１４６】

スペーサー１６の中央部分には神経細胞ネットワーク構成用の大きな培養スペース１８が切欠き形成され、この培養スペース１８における基板１４面上に、上記の神経細胞１１を配置した細胞定着部１３が１ケ所又は複数～多数ケ所、設けられている（図示の便宜上１ケ所の細胞定着部のみを示す）。又、基板１４面における細胞定着部１３以外の部分にも、神経細胞１１が播種されている。

【０１４７】

スペーサー１７においては、基板１４の微細貫通孔１５に対応する部分には例えば円形の切欠き部１９が設けられているので、微細貫通孔１５における第二表面側の開口部がこの切欠き部１９に開口している。従って、この切欠き部１９も、細胞定着部１３及び微細貫通孔１５に対応して、１ケ所又は複数～多数ケ所、設けられる（図示の便宜上、１ケ所の切欠き部１９のみを示す）。

【０１４８】

そして、上記の基板１４及び１対のスペーサー１６、１７の全体が１対の丈夫なプレート２０、２１で締め付けられた構造となっている。プレート２０、２１の材料としては、１２０℃程度でのオートクレーブ滅菌に耐えられる材料であれば特段に限定されない。しかし、第一表面側のプレート２０については、好ましくは、光不透過性の材料を用いることができる。一方、第二表面側のプレート２１については、好ましくは、光透過性の材料を用いることができる。

【０１４９】

以上の構成において、第一表面側のプレート２０の中央部には、第一表面側のスペーサー１６における上記培養スペース１８に対応する位置に、培養スペース１８と同様の大きさの、例えば円形の切欠き部が設けられる。この切欠き部の周縁には、プレートの厚さの薄い凹部状の段部を形成し、この段部にカバーグラスのような蓋用部材（図示省略）を設置することによって、上記のスペーサー１６における切欠き部の開口を開閉可能に構成しても良い。こうして、第一表面側に主液溜２２が構成される。

【０１５０】

一方、第二表面側のスペーサー１７における切欠き部１９の開口をプレート２１により塞ぐことで、第二表面側の液溜部２３を形成している。第一表面側の主液溜２２と、第二表面側の液溜部２３とは、微細貫通孔１５を介して連通している。

【０１５１】

主液溜２２は第一表面側の液溜部の第１の領域を構成する。この主液溜２２は、スペーサー１６に設けた狭い通液路２４を介して、第一表面側の液溜部の第２の領域を構成する副液溜２５と連通している。副液溜２５は、スペーサー１６及びプレート２０に共通に設けた穴によって形成されている。副液溜２５には、後述する第一表面側の電極部２８を配置している。

【０１５２】

主液溜２２、通液路２４及び副液溜２５によって構成される第一表面側の液溜部には導

電性液体である細胞培地が導入され、保持される。導電性液体には神経細胞を分散させておくことができる。導電性液体としては、１４０mM NaCl、３mM KCl、１０mM 4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid (HEPES)、２．５mM $CaCl_2$、１．２５mM $MgCl_2$ 及び１０mM glucose at pH 7.4 (with HCl)等の緩衝液、又は１０％(v/v)FBS、１％(v/v)GlutamaxTM(Gibco）を添加したDulbecco’s modified Eagle’s medium (DMEM: Sigma)等の細胞培地を用いる。導電性液体の組成は、神経細胞の種類によって適宜に変更できる。

【０１５３】

第二表面側の液溜部２３には、４０mM CsCl、８０mM $CsCH_3SO_4$、１mM $MgCl_2$、１０ mM HEPES、２．５mM MgATP、０．２mM Na_2EGTA, (pH７．４)等のピペット溶液と呼ばれる緩衝液又は細胞培地などを導入する。液溜部２３に対する導電性液体の導入はチューブ状の導入用通液路２６によって行い、その排出は排出用通液路２７によって行う。本実施例では、導入用通液路２６及び排出用通液路２７として外径１ｍｍ、内径０．５ｍｍのPEEK製のチューブを用いたが、これらの通液路の構成材料についても、１２０℃程度でのオートクレーブ滅菌に耐えられる材料であれば、他の材料を用いても良い。

【０１５４】

排出用通液路２７にも、第一表面側の電極部２８と同様に構成された第二表面側の電極部２９(１点鎖線により簡略化して図示する)を設置している。これらの電極部２８、２９の構成は後述する。通常、第一表面側の電極部２８の電極を接地させ、第二表面側の電極部２９の電極に膜電圧を印加する。

【０１５５】

神経細胞１１を分散させた導電性液体を主液溜２２に導入した場合において、排出用通液路２７に連絡させた適宜な液体吸引デバイスによって液溜部２３の導電性液体を吸引すると、微細貫通孔１５を通じて主液溜２２の導電性液体も吸引される。このような操作によって、神経細胞１１を図５に示す細胞定着部１３（即ち、微細貫通孔１５の開口位置）に効果的に配置させることができる。

【０１５６】

更にこの場合、吸引圧によって微細貫通孔１５に接する部分の神経細胞１１の細胞膜に微細な穴を形成することができる。このような穴を神経細胞１１に形成するには、他にも、nystatin やamphotericin B 等の細胞膜穿孔性の抗生物質の溶液を導入用通液路２６から第二表面側の液溜部２３に導入すると言う方法もある。このような穴を細胞膜に形成すると、神経細胞内と第二表面側の液溜部２３が電気的に導通した状態となる。

【０１５７】

一方、神経細胞１１を細胞定着部１３（微細貫通孔１５の開口位置）に配置させる手段として、基板１４の微細貫通孔１５における第一表面側の開口部周縁に、細胞固定力を持つ細胞外マトリックス形成物質３０を付着させておくこともできる。

【０１５８】

以上の構成において、神経細胞１１には所定のイオンチャンネルが発現されており、そのイオンチャンネルを開く刺激物質が第一表面側の液溜部に加えられると、イオンチャンネルが開き、第一表面側の電極部２８と第二表面側の電極部２９間に印加電圧に応じたチャンネル電流が流れる。このとき、神経細胞１１の細胞膜と基板１４との間に隙間があると、シール抵抗が低下してチャンネル電流にリーク電流が重畳する。

【０１５９】

膜電位は、電極間に実際に印加される電圧に加えて、空間に存在する電磁波による誘導電圧や、電極金属表面とそれをとりまく緩衝液との間の界面電位や、液／液界面電位が重畳されるので、誘導雑音や界面電位の変動によりリーク電流がそれに対応して変動する。そのため、イオンチャンネル電流に対しては、ベースラインの変動という雑音として現れる。

【０１６０】

詳細なデータの提示は省略するが、ギガオーム以上のシール抵抗を容易に得られるピペ

ットパッチクランプにおいては、膜電位の変動が比較的大きくても、ベースライン変動雑音の影響は無視できるほどに小さい。しかし、シール抵抗が比較的小さな（～１０ＭΩ）培養型プレーナーパッチクランプにおいては、この膜電位の変動を小さくする必要がある。そこで、本実施例では、膜電位の変動が小さく安定な電極を開発した。このような電極により、膜電位の変動を大幅に小さくし、シール抵抗が小さくても雑音電流を小さく抑えて、計測することができる。

【０１６１】

以下において、詳細な図示は省略するが、第一表面側及び第二表面側の電極部２８、２９の構造を説明する。内径1ｍｍのパイレックス（登録商標）ガラスからなる筒状の電極容器３１の内部は、KClとAgClが飽和濃度で溶解した電極溶液３２で満たされている。KCl濃度は３．３Ｍ／Ｌ、AgClは約1.1mM/Lを添加している。なお、KClの場合、飽和濃度は常温で約３．３Ｍ／Ｌである。電極容器３１内に収容されたAgCl/Ag電極３３において、銀線の表面にはAgClがコートしてある。このようなAgCl/Ag電極３３は、銀線の表面にAgCl粉末を塗布して形成したり、あるいは、次亜塩素酸ナトリウムを含む漂白剤などに銀線を浸しても製作できる。又、KCl溶液内での電気メッキによっても製作できる。

【０１６２】

電極容器３１の先端部は、多孔質ガラスや多孔質セラミックス等の無機多孔質材料３４で塞いでいる。無機多孔質材料３４として、実際にはバイコールガラス（コーニング社）を使用した。このように電極容器３１の容器壁の一部を構成している無機多孔質材料３４は、その先端が導電性液体（細胞培養液や緩衝液）に浸漬される。導電性液体中のKCl濃度は数ミリモルであるが、無機多孔質材料３４の効果で、電極容器３１の容器内と容器外が電気的には導通した状態でありながら、電極溶液３２と容器外の導電性液体との混合は無視できるほど小さいため、容器内と容器外での大きなKCl濃度差が一定に保たれ、これにより、AgCl/Ag電極３３の界面電位や液／液界面電位が一定に保持される。電極容器３１の基端部はシール材料でシールされ、そこから電極ピン３５が突出している。

【０１６３】

光でチャンネルが開くイオンチャンネルを発現した細胞を用いてチャンネル電流を制御する場合において、以上の第一表面側及び第二表面側の電極部２８、２９を配置すれば、第一表面側の液溜部が光不透過性のスペーサー１６やプレート２０によって形成されるので、主液溜２２に照射される照射光が、第一表面側及び第二表面側の電極部２８、２９のAgCl/Ag電極を照射することがない。又、主液溜２２には神経細胞１１が配置してあり、細胞の外部の導電性液体のカリウムイオン濃度は数ｍＭ程度と小さいので、微量とは言え電極部から漏れ出るKClの影響を抑える事が望ましい、そのため、第一表面側の液溜部については、主液溜２２に加えて副液溜２５を作り、これらの主液溜２２及び副液溜２５を幅１ｍｍ以下の狭い通液路２４で連結している。

【０１６４】

〔第２実施例〕

第２実施例を図６に示す。この第２実施例及び次の第３実施例は第１実施例における要点を更に詳しく述べるものである。これらの実施例における部品番号は第１実施例とは異なるが、同じ部品名のものは実質的に同じ構成である。

【０１６５】

Si基板１の表面にネガテイヴフォトレジストSU8を厚み８～１０μｍでスピンナーによりコートし、あらかじめ用意したフォトマスクを用い通常の工程により現像して、図６（ａ）、図６（ｂ）に一例として示す柵状の複数の突起部１２からなる細胞定着部１３を形成した。

【０１６６】

この場合の突起部は、底面１０μｍ×１０μｍ、高さ８～１０μｍの四角柱であり、突起部間の相互間隔は８～１０μｍである。マウスやラットの大脳皮質や海馬の神経細胞の細胞体の径は通常、播種時に１０μｍ前後、定着時には１５～２０μｍであるので、この複数の突起部からなる細胞定着部２中に配置された神経細胞３は、細胞定着部２の外には

移動しない。しかし細胞培地は細胞定着部２の内外を移動し、細胞定着部２内の細胞の培養には問題ない。突起部の形状は円柱や楕円柱であっても、球状の固形物であっても構わない。

【０１６７】

複数の突起部１２からなる細胞定着部１３による神経細胞３の配置は、神経細胞ネットワークの形成と利用において有用性が発揮される。図６（ｃ）に概念図を示すように、細胞定着部１３の内側に神経細胞３を配置すれば、細胞定着部１３の外側の神経細胞３とネットワークを形成する。このネットワーク形成において、神経細胞３は軸索の先端から神経伝達物質を放出しながら、結合する相手をもとめて軸索の伸長を行い、受ける側の神経細胞３もこの神経伝達物質を受けて樹状突起を伸ばして、シナプス接合を形成する。

【０１６８】

本発明の特徴は、細胞定着部１３内の神経細胞３と細胞定着部１３外の神経細胞３が基板１の同じ平坦面上に存在するため、神経細胞間でのコミュニケーションが妨害されることなく行われ、安定な培養が継続され、安定なネットワークが形成される点にある。本実施例の場合、細胞定着部２の内部に配置した神経細胞３は１ケ月以上の培養が可能であった。

【０１６９】

このように所定の神経細胞の位置を指定してネットワークを形成することは、いろいろな点で有用である。図５に示すような培養型プレーナーパッチクランプ装置に応用すると、その効果は特に大きい。

【０１７０】

細胞定着部１３の内径は、図６（ａ）、図６（ｂ）に示すように容易に変更できる。その内径は、神経細胞ネットワークの長期間の安定な培養を可能とするための複数個（比較的多数）の神経細胞３を配置できる内径とするか、ネットワークの機能解析が容易である１個ないし少数個の神経細胞３を配置できる内径とするか、という配慮に基づく最適の神経細胞の個体数（クラスターサイズ）により決まる。例えば、比較的丈夫なラット大脳皮質神経細胞では１～４個のクラスターが良いが、比較的脆弱なiPS細胞やこれから分化・誘導されるニューロスフェアーでは、安定的培養のためにより多くの細胞体からなるクラスターが好ましい。

【０１７１】

〔第３実施例〕

第３実施例を図７に基づいて説明する。同図において、図７（Ａ）の右下部分の「c」の丸囲いに示す図は、細胞定着部２の中央部の微細貫通孔４付近の断面を拡大した部分図である。培養型プレーナーパッチクランプは、Siやプラスチック、セラミックス、ガラスなどの基板１に直径１～数μｍの微細貫通孔４を形成し、この微細貫通孔４の上に神経細胞３を置き、基板１の上部、下部をそれぞれ所定の緩衝液で満たし、かつ上部電極７、下部電極８を設置した構成である。下部電極８は電流増幅器５に連絡されている。

【０１７２】

微細貫通孔４に接する神経細胞３の細胞膜に微細な穴をあけて、神経細胞３内と、基板１の下側の緩衝液溜めとが電気的に導通したホールセル状態を形成する。この神経細胞３に微細な穴をあける方法としては、第１実施例でも述べたように、下部液溜めに陰圧をかけて細胞膜を破る方法がある。又、ナイスタチンやアンフォテリシンなどの抗生物質を溶解した緩衝液を下部液溜めに流して、細胞膜にこれらの抗生物質を細胞膜に埋め込み、細胞内と下部液溜めとを電気的に導通した状態とすることを利用する方法もある。

【０１７３】

この場合、微細貫通孔４の周辺の基板１表面に細胞外マトリックス形成物質９を塗布しておくことが、神経細胞３を長時間生かしておく上で有効である。細胞外マトリックス形成物質９としては多くのものが公知であるが、ポリ－Ｌ－リジン、ラミニンなどがよく知られている。この系への神経細胞３の播種については、細胞定着部２の内部に単一細胞あるいは複数の細胞を間違いなく播種する必要から、図示するようなマイクロピペット６を

利用して行うことが特に有効である。

【０１７４】

更に、この場合、図７（Ａ）の右下の要部拡大図である「c」の丸囲いに示すように、マイクロピペット６から所定の速度で神経細胞３の懸濁液を細胞定着部２の上部に注入すると同時に、当該下部液溜めに所定の陰圧を印加し、図７（Ｂ）に示すように、微細貫通孔４の上に神経細胞３を効率よく配置することができる。但し、陰圧を大きくしすぎると神経細胞３が死んでしまうので、細胞種ごとに適切な圧力を設定する必要がある。図７（Ｂ）ではHEK293細胞を用いて吸引の実験を行い、２ｋＰａの陰圧ならば神経細胞３が損傷を受けないことを確認した。５ｋＰａの陰圧であると、８割の神経細胞３が損傷を受けないことを確認した。但し、吸引により神経細胞３が微細貫通孔４の上に配置された直後に吸引圧力の解除を始めると、損傷が少なくなることも確認された。

【０１７５】

本実施例においては、神経細胞３にはCaイメージング用のプローブ分子があらかじめ導入してある。また、神経細胞３には、レーザー光などの光で刺激ができるようチャンネルロドプシンなどの光受容体イオンチャンネルも遺伝子導入により発現されている。この場合、チャンネルロドプシンの励起波長とCaプローブ分子の励起波長が干渉しないよう十分に離れていることが重要である。本実施例で利用したチャンネルロドプシンの励起波長は４７０～４８０ｎｍであり、Caプローブとしては、励起波長４９４ｎｍ、発光波長５２３ｎｍのオレゴングリーンBAPTA-1を用いた。この第３実施例で実施した動作モードは以下の4種類である。

【０１７６】

（第一の動作モード）

微細貫通孔４の上の神経細胞３に所定の膜電位（通常－８０～＋８０mV）を上部電極７、下部電極８により印加しておき、自然発火などにより神経細胞３内に流れるイオンチャンネル電流をホールセルモードにより観測する（図７（Ａ）における矢印記号「ａ」）。この場合、周辺の神経細胞３の自然発火によるCaイオンの流入や、神経伝達物質を受けてのNa^+、K^+、Cl^-などのシナプス電流が観測され（K.S.Wilcox et al., Synapse 18 (1994) 128-151）、これにより軸索の状態や神経細胞３の状態に関する情報を得ることができる。

【０１７７】

（第二の動作モード）

微細貫通孔４の上の神経細胞３に上部電極７、下部電極８より所定の電流を注入し、あるいは電圧を印加（図７（Ａ）における矢印記号「ｂ」）して、神経細胞３に刺激を与え、活動電位を発生させる。これにより、刺激を受けた神経細胞３にCaイオンが流入する。そのため、Caプローブの蛍光（図７（Ａ）における矢印記号「d1」）が観測されると共に、発生した活動電位が周辺の神経細胞３に伝搬して当該周辺の神経細胞３のCaプローブの発光（図７（Ａ）における矢印記号「d2」）を生じさせる。この発光を観測することにより、信号の伝搬を確認することができる。すなわち神経細胞ネットワークの信号伝搬特性についての情報を得ることができる。

【０１７８】

（第三の動作モード）

微細貫通孔4の上（細胞定着部２内）の神経細胞３の付近に存在し、かつ、チャンネルロドプシンを発現している単一の神経細胞３に４７０～４８０ｎｍのレーザー光を集光して照射（図７（Ａ）における矢印記号「ｅ」）して、この単一の神経細胞３に活動電位を発生させる。そうすると、この活動電位信号がネットワークを通して微細貫通孔上の神経細胞３に伝搬され、Caチャンネルが開いて、Caイオンの流入が誘起される。その結果、あらかじめホールセルモードとなっている微細貫通孔上の神経細胞３に膜電位を印加している上部電極７、下部電極８により、イオンチャンネル電流を観測できる。第三の動作モードによれば、神経細胞ネットワークの信号伝搬特性を単一細胞レベルで測定し詳細に解析できる。

【０１７９】
（第四の動作モード）
前記の第一～第三の動作モードにおいては、細胞定着部２と微細貫通孔4の組み合わせからなる図７（Ａ）に示す構造は、最低で１ケ所あれば素子として動作する。そして、この構造を基板１上に多数構成すれば、ハイスループットスクリーニング装置として動作する。これに対して、以下の第四の動作モードでは、前記のトリガー細胞とフォロワー細胞に対応してそれぞれ一つ（合計二つ）の図７（Ａ）に示す構造体をもって素子が構成される。
【０１８０】
基板１の上の複数ケ所に図７（Ａ）に示す微細貫通孔４と細胞定着部２の組み合わせのシステムを形成する。その内の幾つかの微細貫通孔４上にある神経細胞３（トリガー細胞）の活動電位の発生を電流注入あるいは電圧印加で行う。そして、それ以外の微細貫通孔４上にある神経細胞３（フォロワー細胞）への活動電位の伝搬を、このフォロワー細胞におけるイオンチャンネル電流のホールセルモードでの記録により解析することが考えられる。これらの装置において、神経細胞３を位置を指定して配置することは極めて重要であり、位置を指定しながらも安定な神経細胞ネットワークを形成できる本発明が極めて有用であることは明白である。
【０１８１】
又、上記の第一、第三、第四の動作モードにおいて、微細貫通孔４でのイオンチャンネル電流だけでなく、基板１の上部でのCaイメージングの観測を同時に行うことにより、ネットワークの機能解析をより精密に行うことができ、極めて効果的である。
【０１８２】
〔第４実施例〕
第４実施例を図８（ａ）、（ｂ）に示す。平面写真である図８（ａ）において小さな円形で示される、直径約１０μｍ、高さ約8μｍの円柱１２本からなる細胞定着部２をＳｉ基板の表面に形成し、１７日齢のラット胎仔の大脳皮質から採取した神経細胞３を播種し、１４日間培養後に神経細胞ネットワークの形成を蛍光顕微鏡により確認した。培地を所定の緩衝液に交換したのち、この緩衝液にオレゴングリーンBapta-1というCaプローブを混入し、約２時間後再び、緩衝液をCaプローブを含まない液に交換して蛍光顕微鏡で神経細胞３を観察した。
【０１８３】
細胞定着部２内に安定に数個の神経細胞３が設置されていることと、細胞定着部２内と細胞定着部２外の神経細胞がネットワークでつながっている様子が観察される。また、図８（ｂ）は細胞定着部２内の神経細胞３の蛍光強度の時間変化を観察した結果であり、神経細胞３が活発に自然発火を繰り返し、神経細胞３内のCa濃度が変動している様子が観察される。本実施例では細胞定着部２は一組設置されているのみであるが、これを複数設置することにより、特定の細胞定着部２から別の細胞定着部２への信号伝搬の様子を観測することができ、ネットワークの機能解析を正確かつ安定に実施できる。
【０１８４】
〔第５実施例〕
第５実施例を図９に示す。Si基板を用いて構成した培養型プレーナーパッチクランプ素子の微細貫通孔を囲むように、複数の突起部からなる細胞定着部を、ネガティブホトレジストを用いて、第２実施例～第４実施例と同様の方法で形成した。ラット胎仔の大脳皮質から採取した神経細胞を第４実施例と同様な手法で播種し、培養１４日後に細胞定着部の中の神経細胞が微細貫通孔の上に配置されていること、及び、当該神経細胞が周辺の神経細胞とネットワークを形成していることを確認した。
【０１８５】
その後、培地を基板の上側、下側でそれぞれ所定の緩衝液と交換し、下側の緩衝液にナイスタチン５００μｇ／ｍｌ濃度で混入し、約１０分間放置後、ホールセルモードの配置で基板１の下側に設置した電極に流入する電流を電流増幅器（Axopatch200B）により検出

した。

【０１８６】

その結果を図９（Ａ）に示す。図９（Ａ）は、電流の膜電位依存性を示す。また、４０ｍＶ－TTXは膜電位が４０ｍＶで、かつ上側の緩衝液にNaチャネルのブロッカーであるテトロドトキシン（ＴＴＸ）を混入した時に観測された電流である。膜電位が－から＋に変化すると電流の波形の向きも下（－）から上（＋）に代わり、自然発火した神経細胞からの信号伝搬や、神経伝達物質の自然放出の場合のシナプス電流の特徴を示す。これらの波形はネットワークの特徴を反映しており、アンタゴニストやアゴニストの薬剤により、波形が変化する。細胞定着部と微細貫通孔の占める面積は非常に小さいので１００点ほどの多点計測は容易であり、ハイスループットスクリーニングに必要な多点計測は容易に可能である。

【０１８７】

なお、図９（Ｂ）、図９（Ｃ）は、基板の上方部より、各神経細胞のCaイメージングによる蛍光強度の時間変化を計測した結果をまとめたものである。横軸が時間、縦軸が各々の神経細胞に付せられた番号である。円の大小はCa蛍光強度の強弱を表す。図９（Ｂ）に示す場合は神経細胞の密度が小さく、３５ｍｍデイッシュあたり2×10^{5}個であるため、神経細胞からの発光は完全にランダムである。

【０１８８】

これに対して、図９（Ｃ）に示す場合は神経細胞の密度が大きく、３５ｍｍデイッシュあたり2×10^{6}個であるため、Caイメージングによる発光が同期して起こるようになることが分かった。これらの結果は、基板の下側でイオンチャンネル電流を計測し、同時に上側でCaイメージングを行うことにより、より精密な計測と解析ができることを意味する。

【０１８９】

〔第６実施例〕

第６実施例は細胞定着部１３の改良実施例に関する。図１０に示すように、微細貫通孔の第一表面側の開口部上の基板面には、第１実施例の場合と同様に複数の突起部１２で囲まれた細胞定着部１３が形成され、この細胞定着部１３には神経細胞１１が配置されている。そして細胞定着部１３をリング状に構成する複数の突起部１２の外側に、更に多くの突起部１２で囲まれた外側細胞定着部３６が形成されている。即ち、第６実施例では、突起部１２で構成されるリングが、細胞定着部１３と、外側細胞定着部３６との二重リング構造となっているのが特徴である。

【０１９０】

内側のリングで囲まれた領域である細胞定着部１３には微細貫通孔があり、この領域に１ないし数個の神経細胞１１が定着されており、神経細胞１１が確実に微細貫通孔の上に存在する。そして同時に、内側のリングと外側のリングとの間の領域である外側細胞定着部３６にも多数の神経細胞１１が播種される。従って、細胞定着部１３内部の神経細胞１１間だけでなく、細胞定着部１３の神経細胞１１と外側細胞定着部３６の神経細胞１１との間にも神経細胞ネットワークが形成される。

【０１９１】

このような細胞定着部１３と外側細胞定着部３６からなる構成においては、例えばiPS細胞などのように、単一細胞では不安定で、多数の細胞が集合していないと安定的な培養ができない神経細胞について、確実に一個の神経細胞を微細貫通孔の上に定着させると共に、長期間、安定に培養できるというメリットがある。

【０１９２】

なお、第６実施例の場合において細胞定着部１３と外側細胞定着部３６にそれぞれ神経細胞１１を播種する方法の１例については、次の第７実施例で簡単に述べる。

【０１９３】

〔第７実施例〕

第７実施例は、本発明の神経細胞播種デバイスに関する。神経細胞播種デバイスのデバ

イス本体は、上記の実施例に係る神経細胞ネットワーク形成用培養装置又はプレーナーパッチクランプ装置の装置基板上に設置し、装置基板における複数の突起部で囲まれた多数の細胞定着部に神経細胞を播種するためのものである。

【０１９４】

図１１（ａ）に斜視図を示すように、本実施例に係る神経細胞播種デバイスのデバイス本体４０は、４～６ｍｍ程度の厚さと２×２ｃｍ程度の方形の平面形状を有する平坦なボード状であり、上部ボード４１と下部ボード４２からなる。上部ボード４１と下部ボード４２は、それぞれ、例えばプラズマ処理等で表面を清浄化したＰＤＭＳ（ポリジメチルシロキサン）、ＰＭＭＡ（ポリメチルメタクリレート）等の透明なプラスチック又はシリコンゴムからなり、これらは密着状態で加熱して接合された２層構造体を構成している。

【０１９５】

上部ボード４１の上面の中央部の一端側には、神経細胞を一定密度で懸濁させた神経細胞懸濁液を外部から供給するための、第１懸濁液流路系を構成する懸濁液供給口４３を開口させている。又、その上面の中央部の他端側には、第２懸濁液流路系を構成する第２懸濁液供給口４３ａを開口させている。以下において、まず、第１懸濁液流路系について説明する。第２懸濁液流路系に関しては、後述する。

【０１９６】

（第１懸濁液流路系）

第１懸濁液流路系は、前記の第９発明～第１２発明に係る懸濁液供給口と、懸濁液流路と、懸濁液注入口からなる。

【０１９７】

まず図１１（ａ）のＸ－Ｘ線に沿う断面図（一部省略）を図１１（ｂ）に示すが、図１１（ｂ）から分かるように、上部ボード４１の下面（下部ボード４２との接合面）には、懸濁液供給口４３から分枝状に延設させた、内径と深さがそれぞれ５０～５００μｍ程度の微細な溝を形成している。そのため、上部ボード４１と下部ボード４２とを密着状態で接合させると、これらの溝と下部ボード４２の上面とによって、神経細胞懸濁液を流通させるための複数の微細な懸濁液流路４４が構成される。

【０１９８】

上部ボード４１の下面図（底面図）を図１２（ａ）に示す。図１１（ｂ）においては単一の懸濁液流路４４のみを図示するが、実際には、図１２（ａ）から分かるように、図の下側に示す懸濁液供給口４３から複数の懸濁液流路４４を分枝状に延設させている。これらの懸濁液流路４４には、それぞれ適当な部位において余分な迂回路を設けることにより、それらの流路長が互いに近似するように調節している。

【０１９９】

なお、図１２（ａ）において、懸濁液流路４４は、図示の便宜上、単に太い実線で示している。これらの図で示す後述の第２懸濁液流路４４ａも単に太い実線で示している。

【０２００】

次に、図１２（ｂ）は神経細胞ネットワーク形成用培養装置又はプレーナーパッチクランプ装置の基板１の上面図（平面図）を概念的に示し、基板１の上面には複数の突起部で囲まれた細胞定着部２（簡略化して単一のドットで示す）が集合的に多数設定された５ケ所の定着部設定エリアが図示されている。図１２（ｂ）には、併せて、後述する第２懸濁液注入口４５ａも示されているが、これらは、実際には下部ボード４２に形成されたものであって、基板１に形成されたものではないが、上記の５ケ所の定着部設定エリアとの位置関係を明示するために、あえて図示したものである。

【０２０１】

基板１の上に神経細胞播種デバイスのデバイス本体４０が設置された状態を仮定して、上記の図１２（ｂ）との関係で図１２（ａ）に基づく説明を更に加えると、懸濁液供給口４３から分枝状に延設させた複数の懸濁液流路４４は、基板１上の細胞定着部２が集合的に多数設定された５ケ所の定着部設定エリアの真上にそれぞれ至り、その位置において、下部ボード４２に設けた多数の懸濁液注入口４５と連絡する５ケ所の注入口設定部４６を

形成している。

【０２０２】

この注入口設定部４６の拡大図を図１３に示す。それぞれの注入口設定部４６においては、懸濁液流路４４が縦向きの５条の流路に分枝され、それらの５条の分枝された流路は、それぞれ下部ボード４２に設けた多数の懸濁液注入口４５と連絡している。即ち、図１２（ｂ）に示すように、基板１上の５ケ所の定着部設定エリアには縦方向に５条の細胞定着部２が形成され、その各１条には５つの細胞定着部２が含まれているが、これら全ての細胞定着部２に完全に対応して、懸濁液流路４４の縦向きの５条の流路が位置しており、かつ、下部ボード４２にも、全ての細胞定着部２に完全に対応して、懸濁液注入口４５が形成されている。

【０２０３】

懸濁液注入口４５の内径は細胞定着部２の内部領域の大きさとほぼ同じか、やや大きく、但し、突起部１２も含めた細胞定着２の外形よりは小さい。そのため、突起部１２が懸濁液注入口４５の内部に入り込まない構成となっている。

【０２０４】

従って、第１懸濁液流路系を構成する懸濁液供給口４３に神経細胞懸濁液を例えば加圧状態で供給したとき、懸濁液流路４４と懸濁液注入口４５を通じて、基板１上の５ケ所の定着部設定エリアに設けた合計２５０ケ所の細胞定着部２の全てに対して、極めて短時間の内に、しかもほとんど同一量の神経細胞懸濁液が注入される。その結果、「発明の効果」の欄で述べたような好ましい形態で、細胞定着部２に対して神経細胞が播種される。

【０２０５】

（第２懸濁液流路系）

第２懸濁液流路系は、前記第１３発明に係る、装置基板における細胞定着部以外の領域に対して神経細胞懸濁液を注入するための懸濁液流路系であって、図１１（ａ）に示す第２懸濁液供給口４３ａと、この第２懸濁液供給口４３ａから図１２（ａ）に示すように分枝状に延設させた複数の第２懸濁液流路４４ａと、これらの第２懸濁液流路４４ａの各端末において下部ボード４２に形成した第２懸濁液注入口４５ａからなる。それぞれの第２懸濁液注入口４５ａは、図１２（ａ）においては破線で示すが、図１２（ｂ）においては実線で示す。

【０２０６】

第２懸濁液供給口４３ａ、第２懸濁液流路４４ａ及び第２懸濁液注入口４５ａの構造的な関係は、第１懸濁液流路系に関して図１１（ｂ）に示した懸濁液供給口４３、懸濁液流路４４及び懸濁液注入口４５の場合と同様である。但し、第２懸濁液流路系においては、複数の第２懸濁液流路４４ａの流路長は相違していても構わず、又、第２懸濁液注入口４５ａは、図１２（ｂ）に示すように、基板１上における細胞定着部以外の領域に対して開口している。

【０２０７】

従って、第２懸濁液流路系を構成する第２懸濁液供給口４３ａに神経細胞懸濁液を例えば加圧状態で供給したとき、第２懸濁液流路４４ａ及び第２懸濁液注入口４５ａを通じて、基板１上における細胞定着部以外の領域に神経細胞が播種される。

【０２０８】

なお、第６実施例のように細胞定着部１３と外側細胞定着部３６が形成されている場合は、デバイス本体４０には、外側細胞定着部３６に神経細胞を播種するために、デバイス本体４０に懸濁液流路４４と第２懸濁液流路４４ａに加えて、外側細胞定着部３６に神経細胞を播種するための第３懸濁液流路（図示を省略）を形成することができる。あるいは、基板１上のデバイス本体４０の位置を僅かにズラした後、懸濁液流路４４を利用して、外側細胞定着部３６に神経細胞を播種することもできる。

【０２０９】

〔第８実施例〕

以上のように、神経細胞播種デバイスのデバイス本体４０に設けた第１懸濁液流路系を

利用し、各細胞定着部２に対して所定の濃度の神経細胞懸濁液を注入する。そして細胞定着部２の複数の突起部１２の相互間隔が、播種時の神経細胞の細胞体の寸法より小さく、かつ、神経細胞懸濁液の媒体液（例えば神経細胞の培養液）が容易に流出できるよう十分に広いので、細胞定着部２に対して上部より神経細胞懸濁液を導入することで、媒体液が流出するも神経細胞は細胞定着部２の内部に留まり、そこに播種される。

【０２１０】

よって、多数の細胞定着部２に短時間で、かつ、ほぼ同時に無損傷で細胞を播種することができる。その結果、多数の細胞定着部（プレーナーパッチクランプ装置の多数のチャンネル電流計測点）からなる神経細胞ネットワークを安定かつ容易に形成することができる。

【０２１１】

このように、突起部１２間に隙間があることを利用して播種をする場合、その隙間と細胞体の寸法との関係をより詳細に検討することが重要である。即ち、神経細胞の細胞体は播種時と培養中では形状が大きく異なる場合が多い。又、細胞体の形状も真円ではなく、細長い楕円状となる。

【０２１２】

従って、突起部１２の相互間隔を、播種時の細胞体の寸法最小値（短軸方向の寸法）、及び、培養中の細胞体の寸法最小値の、いずれか小さいほうの値以下とし、かつ、神経細胞懸濁液の媒体液が容易に流出できるよう、あるいは神経細胞の軸索や樹状突起が容易に細胞定着部２に出入りできるようできるだけ大きな値となるように、形成されている必要がある。

【０２１３】

一例として、ラット海馬の神経細胞で実験を行った結果を図１４、図１５に基づいて述べる。図１４においては、ラット海馬の多数の神経細胞体の播種時における寸法最大値（長軸方向の寸法）の分布を左側のグラフに示し、その寸法最小値（短軸方向の寸法）の分布を右側のグラフに示す。図１４に示すように、播種時の細胞体の寸法最小値は約７．５μｍであった。

【０２１４】

一方、図１５においては、同上の細胞体の培養時における寸法最大値（長軸方向の寸法）の分布を左側のグラフに示し、その寸法最小値（短軸方向の寸法）の分布を右側のグラフに示す。図１５に示すように、培養時では、細胞体が細長くなり、細胞体の寸法最小値は約８μｍであった。

【０２１５】

更に、ラット海馬の神経細胞で行った別の実験について、図１６に基づいて述べる。図１６は培養４日目の神経細胞の様子を示す光学顕微鏡写真であって、写真中の４個の大きな円形は細胞定着部２を構成する４個の突起部１２であり、白抜きの実線で示す輪郭が神経細胞を表している。図１６に示すように、神経細胞が外部から突起部１２間の隙間を通って細胞定着部２に侵入しようとしている。結果的に、この神経細胞は侵入することができず、しばらくしてから後退した。突起部１２間の隙間は１１μｍ、神経細胞の細胞体の短軸方向の寸法は８．５μｍである。従って図１６の場合、突起部１２間の隙間をもう少し狭くした方が安全であることを示す。

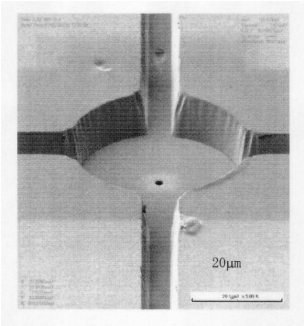
【０２１６】

〔第９実施例〕

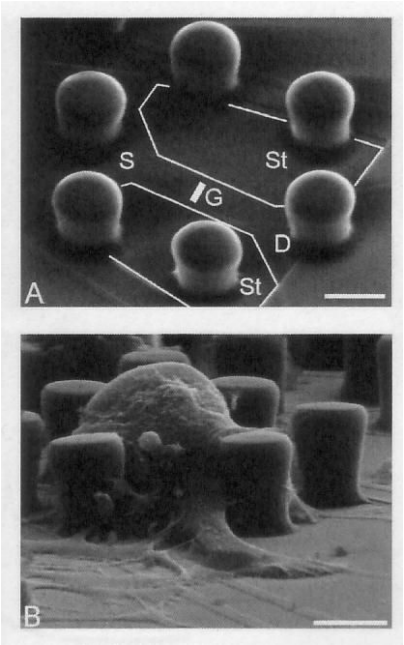
第９実施例は、播種に用いるラット神経細胞懸濁液の調製方法に関する。この懸濁液の調製は以下のように行った。即ち、１７～１８日齢のWistar Rat胎児の脳から大脳皮質または海馬を採取し、０．２５％の Trypsin溶液を用いた酵素処理（３７℃、２０分間）を経て組織をばらばらにした。次に、Minimum Essential Medium (MEM)を基本培地とした血清含有の培地を用いて１．０×１０^{7}cells/mlの細胞懸濁液を調製した。そして、この細胞懸濁液をマイクロ流路もしくはマイクロインジェクターを用いて細胞定着部に導入して播種した。

【０２１７】
〔第１０実施例〕
第１０実施例は、播種するiPS細胞の調製に関する。即ち、独立行政法人　理化学研究所（日本国）のCELL BANKよりヒト人工多能性幹細胞（iPS細胞）株である201B7を入手し、マイトマイシンCにより増殖能を不活性化処理したSTO細胞由来細胞（SNL）をフィーダー細胞として培養した。フィーダー細胞は、iPS細胞の自己複製を補助する役割を果たす他の細胞を意味する。
【０２１８】
培養液としては、代替血清であるKSR、L-グルタミン、非必須アミノ酸、2-メルカプトエタノールを含む哺乳動物細胞培養用培地（DMEM/F12培地）を用い、更に組み換えヒトbasic fibroblast growth factor（bFGF）を使用直前に添加した。フィーダー細胞を３×１０^{4}cells/cm^{2}の濃度として、フィーダー細胞に適したコーティングを施した６ｃｍのデイッシュに播種し、その１日後にiPS細胞をフィーダー細胞上へ播種した。良い状態のiPS細胞は、コロニーの輪郭が明瞭で内部の細胞密度が高くなる。iPS細胞の継代は通常、３～４日に１回の頻度で継代を行う。３～４代の継代を行った後に、運動ニューロンへの分化誘導を目的として、オンフィーダー培養から、表面をゼラチンもしくはマトリゲルでコートした６ｃｍのデイッシュに細胞を移し、フィーダーレス培養へ移行させた。
【０２１９】
フィーダーレス培養で３～４代の継代を行った後に、運動ニューロンへの分化誘導を開始した。フィーダーレス培養されたiPS細胞を、増殖因子の存在下で浮遊培養することによって、神経幹細胞へ分化誘導した。分化誘導培地は、グルコース、グルタミン、インスリン、トランスフェリン、プロジェステロン、プトレシン、塩化セレンを添加したDMEM/F12培地である。分化誘導の浮遊培養工程として５×１０^{4}cells/mlの密度で2 日間浮遊培養を行った。その後、レチノイン酸（10^{-8} M）を添加した分化誘導培地に交換し、4 日間の浮遊培養を行った。更にその後、FGF2（２０ng/ml）、SHH-N(３０nM) を添加した分化誘導培地に交換し、7 日間培養した。この処理により細胞の形態は神経幹細胞となった。
【０２２０】
この神経幹細胞をバラバラにし、poly-L-lysineにてコーティングした培養ディッシュで接着培養を行うことで、接着培養開始５週間後に成熟した運動ニューロンへ分化した。センサー基板上に神経細胞ネットワークを形成する場合は、基板表面をpoly-L-lysineにてコーテイングし、その上にバラバラにした神経幹細胞を播種し接着培養開始5週間後に運動ニューロンを含むネットワークを形成した。基板上に神経細胞ネットワークを形成する場合に当り、基板表面をpoly-L-lysineにてコーティングし、その上にバラバラにした神経幹細胞を播種し、接着培養開始５週間後に運動ニューロンを含むネットワークを形成した。
【産業上の利用可能性】
【０２２１】
本発明によって、細胞培地中で生きた状態にある神経細胞の移動を制約しつつ良好な神経細胞ネットワークを構成できる神経細胞ネットワーク形成用培養装置と、その利用手段が提供される。

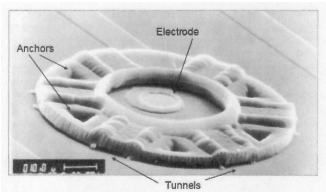
【図１】


20μm

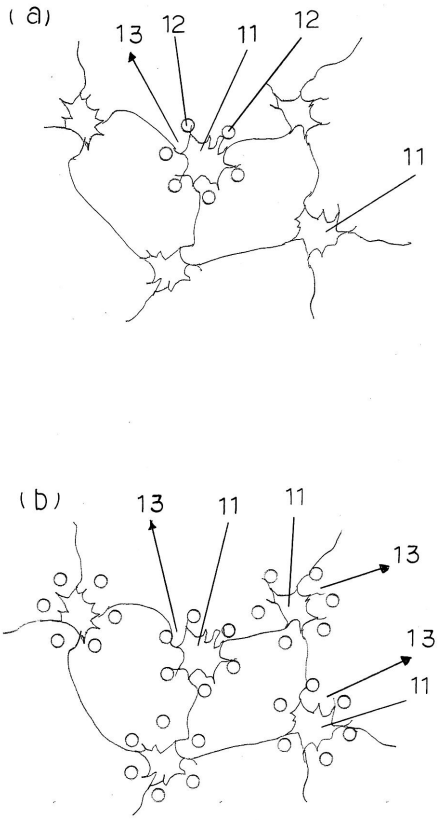
【図２】


S
St
G
D
St
A
B

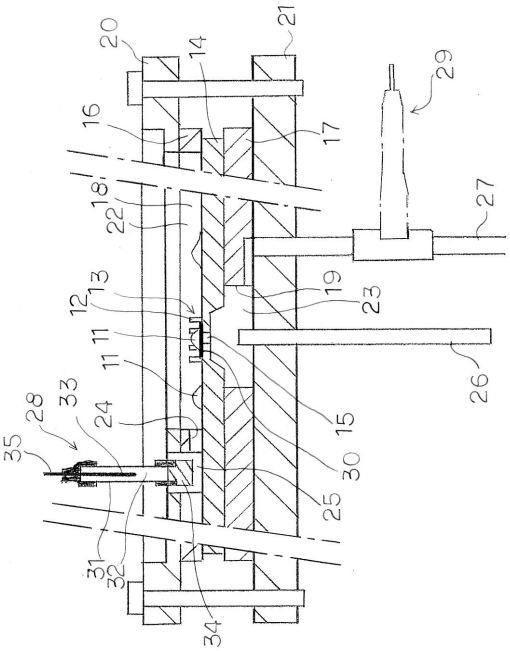
【図３】


Electrode
Anchors
Tunnels

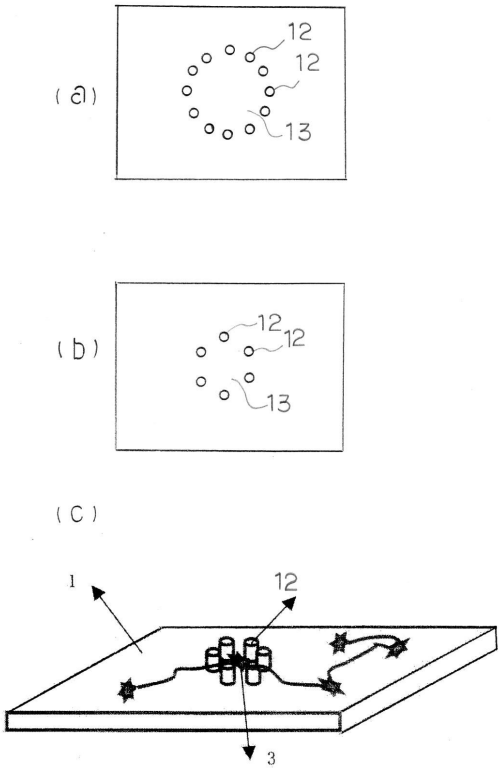
【図４】


(a)
13
12
11
12
11
(b)
13
11
11
13
13
11

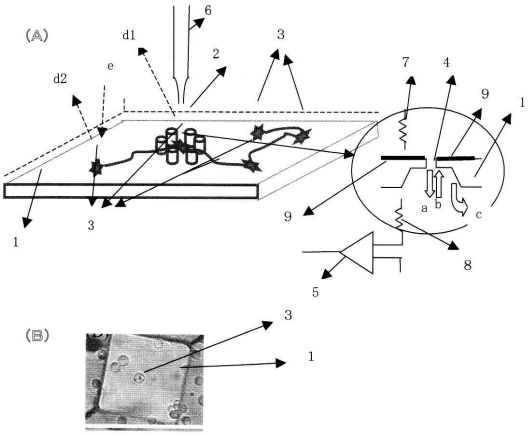
【図５】


20
21
14
29
16
17
18
22
27
13
12
19
23
11
11
26
28
33
24
15
35
30
25
31
32
34

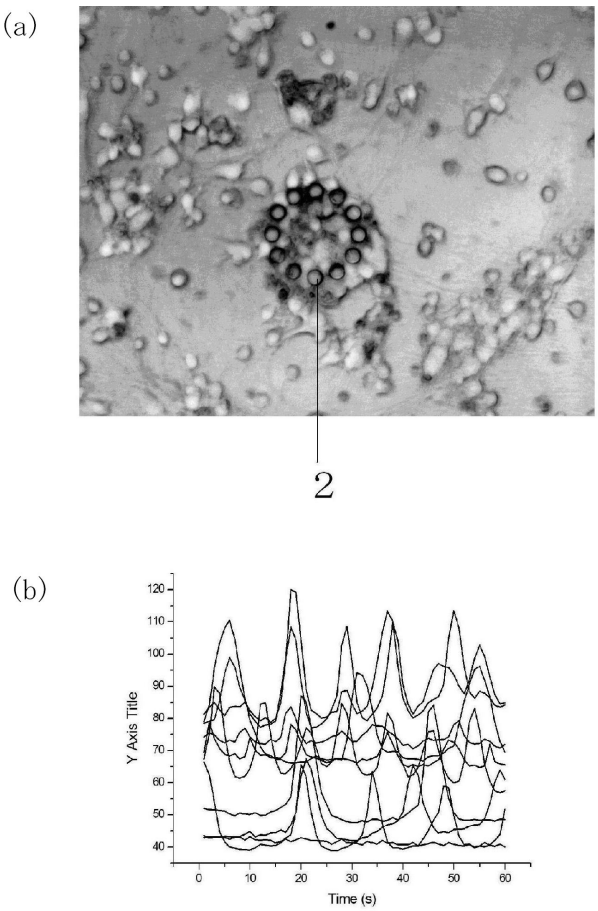
【図６】


(a)
12
12
13
(b)
12
12
13
(c)
1
12
3

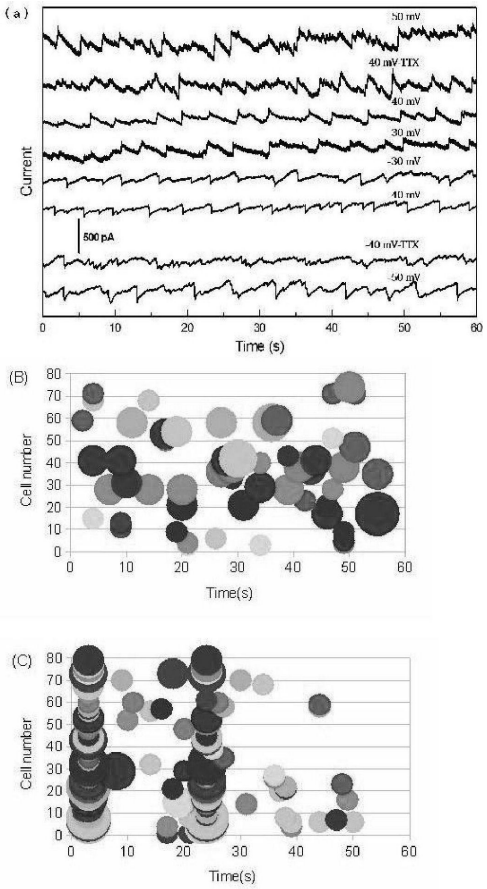
【図７】


(A)
d1
d2
e
6
2
3
7
4
9
1
a
b
c
8
5
(B)
3
1

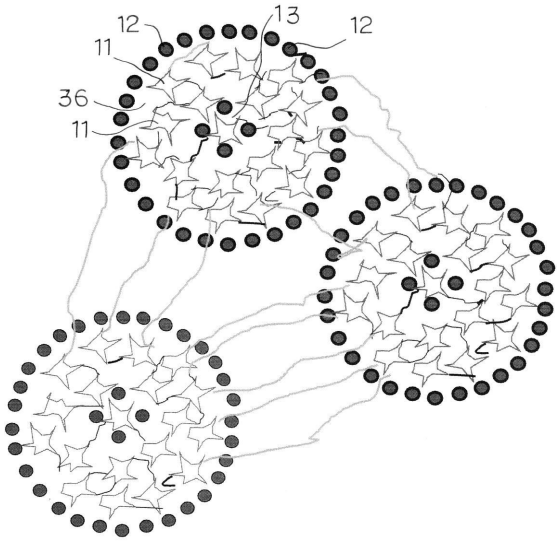
【図８】


(a)
2
(b)
Y Axis Title
Time (s)

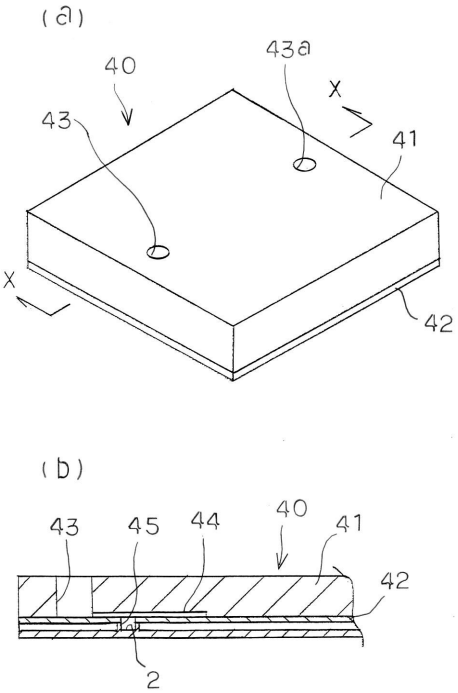
【図９】


(a)
50 mV
40 mV TTX
40 mV
30 mV
-30 mV
40 mV
500 pA
-40 mV-TTX
-50 mV
Current
Time (s)
(B)
Cell number
Time(s)
(C)
Cell number
Time(s)

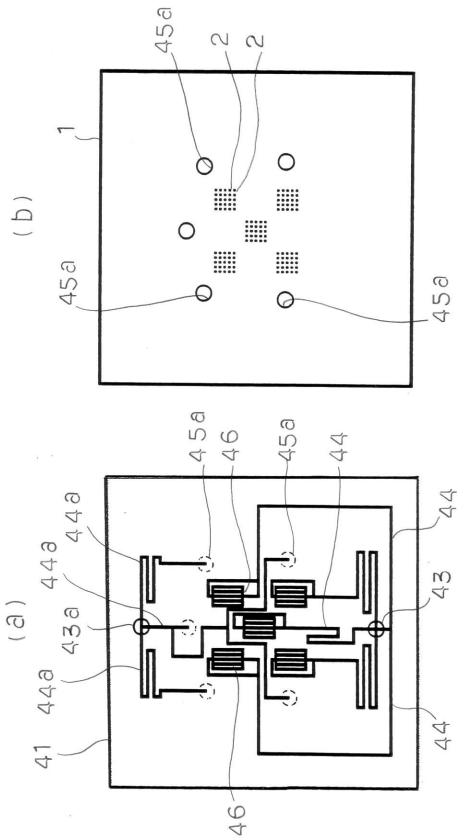
【図１０】



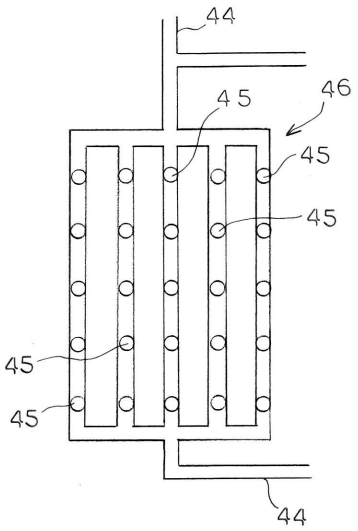
【図１１】



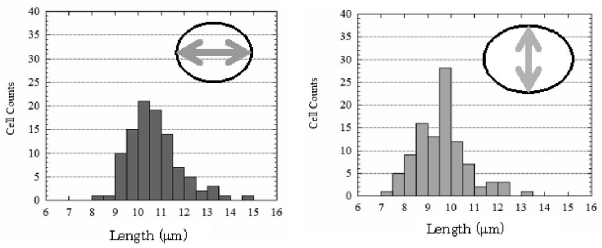
【図１２】



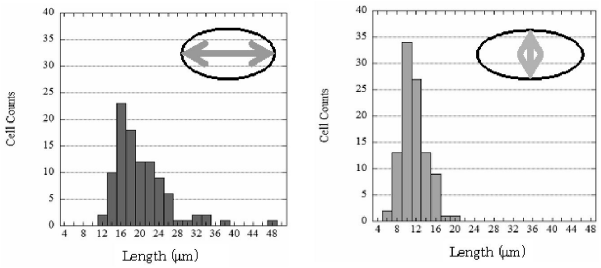
【図１３】



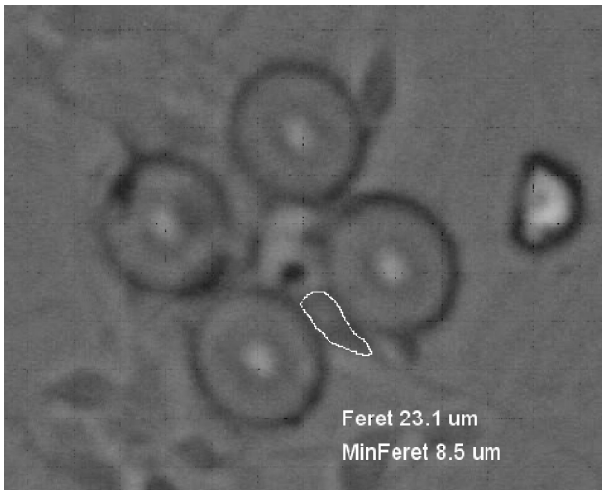
【図１４】



【図１５】


Cell Counts
Length (μm)
Cell Counts
Length (μm)

【図１６】


Feret 23.1 um
MinFeret 8.5 um

フロントページの続き

(51)Int.Cl.　　FI

G01N 37/00	*(2006.01)*	G01N	27/416	300M	
G01N 21/64	*(2006.01)*	G01N	37/00	103	
G01N 27/28	*(2006.01)*	G01N	21/64		F
		G01N	27/28		P

(74)代理人　100166165
弁理士　津田　英直
(72)発明者　宇理須　恒雄
愛知県岡崎市岡町西神馬崎南側１－２５
(72)発明者　ワン　ツーホン
愛知県名古屋市昭和区鶴舞四丁目１５－１６　コーポ鶴舞５０３
(72)発明者　宇野　秀隆
愛知県豊田市青木町二丁目５７－１３
(72)発明者　西藤　美穂
愛知県名古屋市昭和区神村町二丁目４０－１　ノースメゾンラコリン３Ｌ号
(72)発明者　長岡　靖崇
愛知県岡崎市明大寺町川端３４－１－４１１

審査官　高山　敏充

(56)参考文献　国際公開第２００５／００１０１８（WO，Ａ１）
特開２００４－１６６６９２（ＪＰ，Ａ）
国際公開第２００５／１１６２４２（WO，Ａ１）
特開２００９－２０４４０７（ＪＰ，Ａ）
国際公開第２００７／１１６９７８（WO，Ａ１）
特開２００９－１５６５７２（ＪＰ，Ａ）
特表２０１１－５００１１９（ＪＰ，Ａ）
特許第４５６７９３６（ＪＰ，Ｂ２）
特開平０７－０７５５４７（ＪＰ，Ａ）
特開２０１０－２２７０１２（ＪＰ，Ａ）
特開２０１０－２２７０８７（ＪＰ，Ａ）
特開２０１１－１９３７５８（ＪＰ，Ａ）
PNAS，２００１年，Vol. 98，No. 18，pp.10457-10462

(58)調査した分野(Int.Cl.，ＤＢ名)
Ｃ１２Ｍ　　１／００－３／１０
ＪＳＴＰｌｕｓ／ＪＭＥＤＰｌｕｓ／ＪＳＴ７５８０（ＪＤｒｅａｍＩＩＩ）
ＣＡｐｌｕｓ／ＭＥＤＬＩＮＥ／ＷＰＩＤＳ／ＢＩＯＳＩＳ（ＳＴＮ）