

培養神経回路における電気刺激による任意の神経細胞ペアの機能結合の操作

学生氏名 外山大夢, 指導教員 高橋宏知

キーワード 神経回路, 電気刺激, 生体信号計測, 移動エントロピー

1. 背景

当研究室では, 神経回路網の自己組織的なネットワークの形成過程や支配則を明らかにすることを旨とし, 分散培養した神経回路網の時空間的な活動パターンを調べてきた. その実験手法として, HiDens による計測・刺激手法を確立してきた. これまで利用してきた HiDens は, スイス ETH Zurich の Hierlemann 研究室から提供されていたが, 2017 年, その研究成果を元に Maxwell Biosystems が起業した.

2. 目的

本研究では, その Maxwell Biosystems が提供する MaxOne を利用した, 単一神経細胞の刺激手法の確立を試みた.

また, HiDens を用いた先行研究では, 単一神経細胞を刺激し, 刺激された神経細胞と他の神経細胞の結合強度を推定することを達成していた [1]. 本研究では, 後継となる MaxOne を用いて, 以下 2 項目の達成を目指す.

(1) MaxOne を用いて, 単一神経細胞の刺激を実現する

(2) 自発発火から, 神経細胞同士の結合強度を推定する

3. 方法

3.1 神経細胞の培養

ウィスターラット(E18)から胎児ラットの大脳皮質を摘出し, トリプシン処理をして CMOS MEA 上に播種 (3800 cells / chip)して培養した.

3.2 単一細胞の刺激方法

Fig.1 に示したように, 前細胞(Pre)に接する軸索に刺激電圧を印可すると, 前細胞の細胞体方向へ伝播する逆行性の活動電位が発生する. この活動電位は前細胞の活動を計測している電

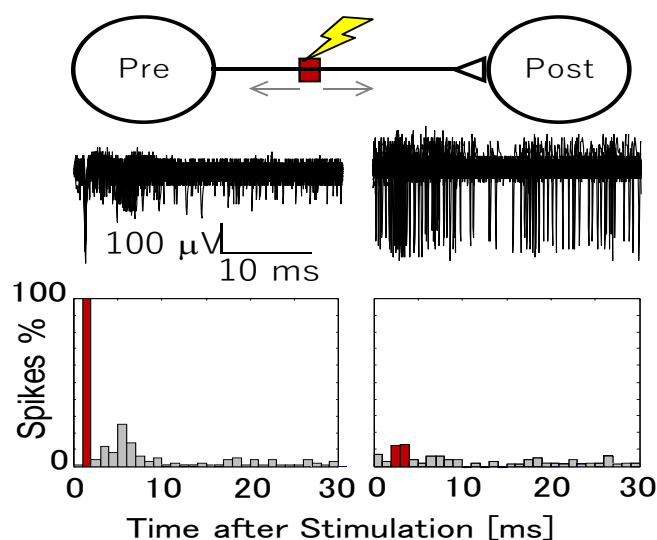


Fig.1 How to stimulate a neuron

極で観測され, ジッター1 ms 未満の高い時間精度を示す. 図左下のように発火のヒストグラムを描くと, 図中赤で示したビンのように, 刺激に対してほぼ 100%の確率で逆行性の誘発応答が見られる. また, 活動電位は後細胞(Post)へ向かって伝播する. この活動電位によってシナプスを介して, 後細胞の活動が誘発されるが, その発火タイミングは, 1 ms から数 ms 程度のジッターを持ち, なおかつ, 発火確率も低い (図右下赤ビン). 図では, 後細胞を代表的に一つ示したが, 実際の培養細胞中では複数の後細胞が存在し, 単一の前細胞に対する全ての後細胞の発火確率を知ることができる.

3.3 機能強度の推定方法

本研究では, 機能結合の推定に条件付き発火確率 [2]を用いた. 条件付き発火確率 (Conditional Firing Probability; CFP) は以下の式で定義される.

$$CFP_{i,j}(\tau) = \frac{\sum_t X_i(t)X_j(t+\tau)}{\sum_t X_i(t)} \Bigg|_{0 < \tau \leq T_w}$$

細胞 i が時刻 t で発火すれば $X_i(t)$ は 1 であり, 発火しなければ 0 である. また, 同様に, $X_j(t+\tau)$ は, t から τ 時間遅れで細胞 j が発火した場合に 1 で, 発火しなければ 0 である. ビン幅は任意

に設定する. 例として, ビン幅 10 ms, $T_w = 300$ ms とした場合の CFP をエラー! 参照元が見つかりません。に示した. 本研究では, 最初の 10ms ビン (図中赤ビン) の CFP を結合強度として用いた.

3.4 バースト発火の検出

神経回路網中の多くの細胞が同期的に数 10 ms から数 100 ms 連続して発火する現象はバーストと呼ばれる. バースト期間中は大局的なパターンに一定の規則が見られるものの, 結合推定には不利に働くことが示されている. そのため, 本研究では, バーストを除去した状態で機能強度を推定する.

4. 結果

4.1 刺激発火と自発発火による CFP の比較

培養神経回路上での自発活動による CFP とシナプス前細胞の発火誘発刺激による CFP にどのような差が生じるかを示した. Fig. 2 はある電極近傍の細胞体を標的として, 自発活動により標的細胞が発火した直後の 10 ms 間で他電極間の CFP を計算したデータと, 同じ標的細胞を電気刺激し, 誘発発火させた際の発火直後の 10 ms 内での他電極との CFP を計算した時の対応関係を表している. R はスピアマンの順位相関における相関係数を示しており, P は有意確率を表している. 縦軸が自発活動による標的電極と他電極間の CFP の値, 横軸が標的電極の誘発刺激による CFP の計算結果を示している. 図から二つの推定値間で有意な相関がみられなかった. また, 自発活動による CFP の値が誘発刺激による CFP の値より約 10 倍大きいことも確認できる.

4.2 刺激発火とバースト区間を除いた CFP の比較

自発活動のデータからバースト現象が発生する区間を取り除いた状態で, 誘発刺激実験で得られる CFP と比べた. その結果, 自発活動で, バーストを取り除かなかった CFP に比べ, バーストを取り除いた CFP は, 誘発刺激による CFP の値と相関が高くなることが分かった. また, バーストを取り除いたデータによる CFP の算出値はバーストを取り除かないデータの CFP とは相関関係を持たなかった. CFP で結合強度を推定する際, 自発活動では, バースト現象が CFP の計算に大きく影響を及ぼすことが分かった.

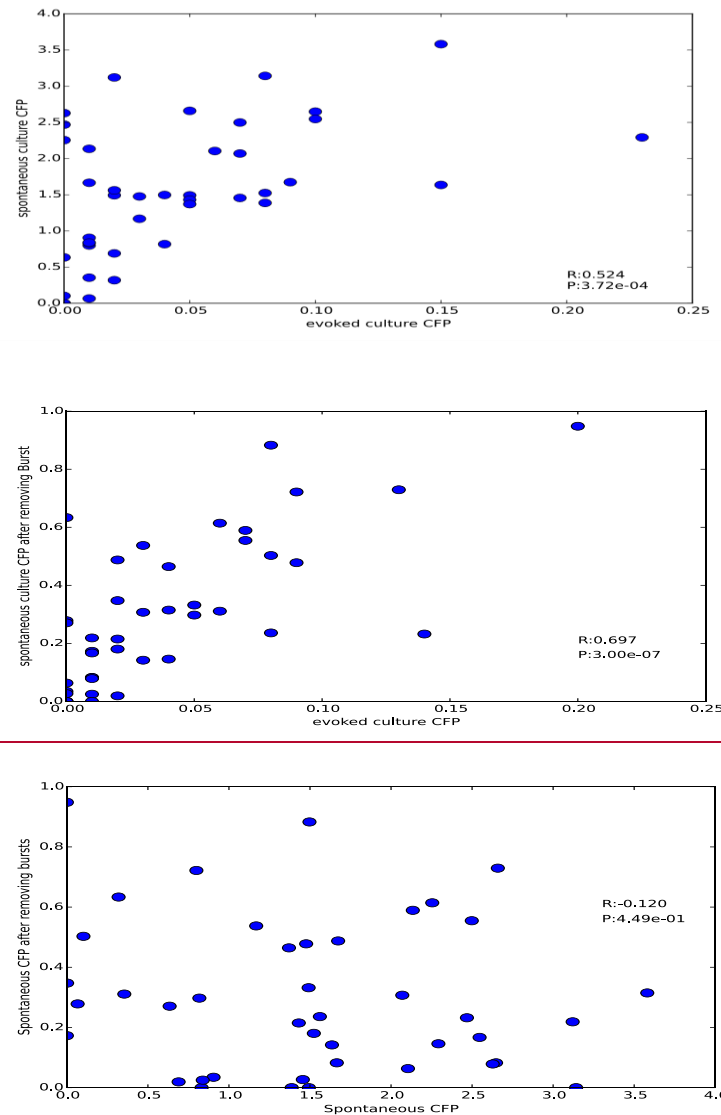


Fig. 2 Estimated connection strength

4.3 結論

本研究では, MaxOne を用いて単一神経細胞の刺激を実現した. さらに, [自発発火から神経細胞間の結合強度](#) を調べた. その結果, バーストを除いた自発活動の CFP と誘発刺激の CFP が相関を持つことが分かった. また, バースト区間と非バースト区間の CFP の相関が高いことが分かった.

参考文献

- [1] T. Mita, D. J. Bakkum, U. Frey, A. Hierlemann, R. Kanzaki, H. Takahashi, "Functional Connectivity Estimate from Spontaneous and Stimulus Evoked Activities in Dissociated Cultured Neurons on a High-Density CMOS Microelectrode Array," Proceedings of MEA Meeting 2014, 2014.
- [2] J. L. Feber, W. L. C. Rutten, J. Stegenga, P. Wolters, G. Ramakers, J. van Pelt, "Conditional firing probabilities in cultured neuronal networks: a stable underlying structure in widely varying spontaneous activity patterns.," Journal of neural engineering,

2007.