



**(19) 대한민국특허청(KR)**  
**(12) 등록특허공보(B1)**

(45) 공고일자 2016년11월28일  
 (11) 등록번호 10-1680154  
 (24) 등록일자 2016년11월22일

- (51) 국제특허분류(Int. Cl.)  
 G01N 27/28 (2006.01) C12M 1/34 (2006.01)  
 C12Q 1/02 (2006.01) G01N 27/416 (2006.01)
- (21) 출원번호 10-2014-7016942
- (22) 출원일자(국제) 2012년12월05일  
 심사청구일자 2014년06월20일
- (85) 번역문제출일자 2014년06월20일
- (65) 공개번호 10-2014-0098161
- (43) 공개일자 2014년08월07일
- (86) 국제출원번호 PCT/JP2012/081556
- (87) 국제공개번호 WO 2013/094418  
 국제공개일자 2013년06월27일
- (30) 우선권주장  
 JP-P-2011-278445 2011년12월20일 일본(JP)  
 JP-P-2012-181786 2012년08월20일 일본(JP)
- (56) 선행기술조사문헌  
 박운익. Ag/AgCl 기준전극의 제조와 특성 및 pH sensor 로의 응용. 한국과학기술원 석사학위논문. 2005, pp.1-75.\*  
 US20020063067 A1  
 GB2060896 A  
 US20080286750 A1  
 \*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

- (73) 특허권자  
 고쿠리츠켄큐카이하츠호진 카가쿠기쥬츠신코키코  
 일본 사이타마켄 가와구찌시 혼쵸 4쵸메 1방 8코
- (72) 발명자  
 우리스 츠네오  
 일본국 아이치켄 오카자키시 오카쵸 니시칸바사키 미나미가와 1-25  
 왕 즈홍  
 일본국 아이치켄 나고야시 쇼와쿠 츠루마이 4쵸메 15-16 코포츠틀루마이 503  
 (뒷면에 계속)
- (74) 대리인  
 하영욱

전체 청구항 수 : 총 10 항

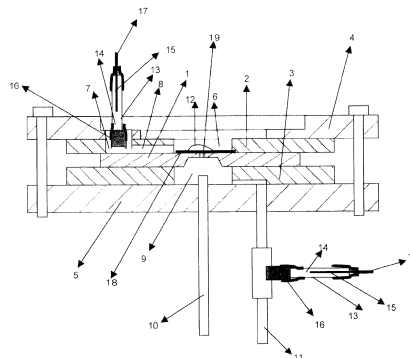
심사관 : 정승두

**(54) 발명의 명칭 플레이너 패치 클램프 장치, 그 장치용 전극부 및 세포 이온 채널 전류 계측 방법**

**(57) 요약**

플레이너 패치 클램프 장치에 있어서의 인가막 전위의 변동을 억제해서 노이즈 전류를 저감시키고, 이로써 이온 채널 전류의 정확한 계측을 가능하게 한다. 전기절연성 기판에 미세한 관통구멍을 1개 이상 형성하고, 관통 구멍의 양측의 표면에는 도전성 액체를 유지하는 액저류부와, 그 액저류부에 통전 가능한 전극부를 형성하고, 이들 전극부가 (a)용기벽의 일부가 무기 다공질 재료로 이루어지는 전극 용기와, (b) 귀금속(Nm)의 표층부에 그 염화물(NmCl)층을 형성한 전극과, (c) NmCl 및 알칼리 금속염화물이 포화 농도로 용해된 전극 용액을 구비하는 플레이너 패치 클램프 장치.

대표도 - 도1



(72) 발명자

**우노 히데타카**

일본국 아이치켄 토요타시 아오키쵸 2쵸메 57-13

**오블리리지 셴틸 쿠마르**

일본국 아이치켄 나고야시 덴파쿠쿠 우에다야마  
1-1608 아르카디아 203

**나카오카 야스타카**

일본국 아이치켄 나고야시 치쿠사쿠 후로쵸 고쿠리  
즈 다이가쿠 호우징 나고야 다이가쿠 나이

## 명세서

### 청구범위

#### 청구항 1

(1) 전기절연성 기판에 그 양측의 표면을 연통시키며, 세포를 통과시키지 않지만 액체를 통과시킬 수 있는 미세한 관통 구멍을 1개이상 형성하고, (2) 상기 관통 구멍의 제 1 표면측과 제 2 표면측에는 각각 도전성 액체를 유지하기 위한 액저류부와, 그 액저류부의 도전성 액체에 대해서 통전 가능하게 배치된 전극부를 형성하고, (3) 제 1 표면측의 액저류부가 세포 배치용 액저류부로 되고, 또한 (4) 상기 제 1 표면측 및 제 2 표면측의 전극부가 이하의 (a)~(c)의 요소를 구비하는 것을 특징으로 하는 플레이너 패치 클램프 장치.

(a) 상기 액저류부에 도전성 액체가 도입되었을 때에 그 도전성 액체에 접하게 되는 용기벽의 적어도 일부가 무기 다공질 재료로 구성되어 있는 전극 용기.

(b) 상기 전극 용기내에 수용되며, 귀금속(Nm)의 표층부에 그 귀금속의 염화물(NmCl)층을 형성한 전극.

(c) 상기 전극 용기내에 충전되며, 상기 귀금속의 염화물(NmCl) 및 알칼리 금속염화물이 포화 농도로 용해된 전극 용액.

#### 청구항 2

제 1 항에 있어서,

상기 제 1 표면측의 액저류부는 광불투과성의 재료에 의해 구성되며 세포를 배치하기 위한 제 1 액저류부와, 제 1 표면측의 전극부가 배치된 제 2 액저류부와, 이들 주액저류부 및 부액저류부를 연통시키는 좁은 통액로로 이루어지는 것을 특징으로 하는 플레이너 패치 클램프 장치.

#### 청구항 3

제 1 항 또는 제 2 항에 있어서,

상기 제 2 표면측의 액저류부가 도전성 액체를 도입 및 배출하기 위한 통액로와 연통되고, 또한 이 통액로에 제 2 표면측의 전극부가 배치되어 있는 것을 특징으로 하는 플레이너 패치 클램프 장치.

#### 청구항 4

제 1 항 또는 제 2 항에 있어서,

상기 제 1 표면측에 액저류부를 복수 형성하고, 이들 각 액저류부에 신경 세포를 배치하는 것을 특징으로 하는 플레이너 패치 클램프 장치.

#### 청구항 5

제 4 항에 있어서,

상기 복수의 액저류부 각각에 오목부, 및 오목부와 오목부를 연결하는 홈부를 형성하고, 여기에서 오목부는 신경 세포를 배치하고, 그 이동을 저지할 수 있는 크기 및 깊이를 갖고, 홈부는 신경 세포 네트워크의 형성을 가능하게 하는 것을 특징으로 하는 플레이너 패치 클램프 장치.

#### 청구항 6

제 1 항 또는 제 2 항에 있어서,

상기 플레이너 패치 클램프 장치가 이하의 (A) 및/또는 (B)의 구성을 구비하는 것을 특징으로 하는 플레이너 패치 클램프 장치.

(A) 제 2 표면측의 액저류부가 액체 흡인 디바이스에 연결되어 있고, 이 액체 흡인 디바이스에 의해 제 2 표면측의 액저류부에 음압을 부하할 수 있게 되어 있다.

(B) 기관의 관통 구멍에 있어서의 제 1 표면층의 개구부 둘레가장자리에 세포 고정력을 갖는 세포의 매트릭스 형성 물질을 부착시키고 있다.

**청구항 7**

삭제

**청구항 8**

삭제

**청구항 9**

삭제

**청구항 10**

삭제

**청구항 11**

제 1 항 또는 제 2 항에 기재된 플레이너 패치 클램프 장치의 제 2 표면층의 액저류부에 도전성 액체를 도입함과 아울러 제 1 표면층의 액저류부에는 측정 대상인 세포를 분산시킨 도전성 액체를 도입해서 제 1 표면층의 액저류부와 제 2 표면층의 액저류부를 도전적으로 연통시키고, 상기 세포를 제 1 표면층의 액저류부의 소정 위치에 배치한 상태에서 제 1 표면층 및 제 2 표면층의 전극부의 전극간에 전압을 인가하여 측정 대상인 세포의 이온 채널 전류를 측정하는 것을 특징으로 하는 세포 이온 채널 전류 측정 방법.

**청구항 12**

제 11 항에 있어서,

상기 플레이너 패치 클램프 장치의 기관의 제 1 표면층에는 복수의 액저류부를 형성하고, 측정 대상인 세포가 신경 세포이며, 도전성 액체가 상기 신경 세포의 세포 배양액인 것을 특징으로 하는 세포 이온 채널 전류 측정 방법.

**청구항 13**

제 12 항에 있어서,

상기 신경 세포에는 미리 Ca 이미징을 위한 Ca 프로브가 도입되어 있고, 그 세포 이온 채널 전류를 적어도 세포 활동 전위의 발생시 또는 활동 전위의 전파시에 발생하는 형광의 관찰인 Ca 이미징을 포함하는 수단에 의해 측정하는 것을 특징으로 하는 세포 이온 채널 전류 측정 방법.

**청구항 14**

제 13 항에 있어서,

상기 Ca 프로브가 도입된 신경 세포를 상기 플레이너 패치 클램프 장치의 제 1 표면층에 복수 내지 다수 배치함과 아울러 이들 신경 세포의 시냅스가 서로 연결된 신경 세포 네트워크로 해 두고, 이들 중 단일의 신경 세포에 전류 주입 또는 전압 인가함으로써 상기 복수 내지 다수의 신경 세포에 있어서의 상기 Ca 이미징에 의한 측정을 행하는 것을 특징으로 하는 세포 이온 채널 전류 측정 방법.

**발명의 설명**

**기술 분야**

[0001] 본 발명은 플레이너 패치 클램프 장치, 그 장치용 전극부 및 세포 이온 채널 전류 측정 방법에 관한 것이다.

[0002] 더욱 상세하게는 본 발명은 다점측정이 가능한 평면 기관형으로서, 세포배양 기능을 갖고, 이온 채널 전류 측정에 있어서의 잡음 전류의 유효한 억제와 세포의 안정적인 위치 결정이 가능한 플레이너 패치 클램프 장치와,

이 장치에 장착할 위한 플레이너 패치 클램프 장치용 전극부와, 이 플레이너 패치 클램프 장치를 사용해서 행하는 세포 이온 채널 전류 측정 방법에 관한 것이다.

**배경 기술**

[0003] 생명체를 구성하는 세포의 표면에는 여러가지 막 단백질이 배치되어 있으며, 세포표면의 특정 사이트의 화학물질(리간드 등의 신호 전달 물질)의 결합이나 전기 또는 광의 자극(게이트 트리거)에 의해 막 단백질의 개구부인 채널이 개폐되어 세포막의 외측과 내측 사이에서의 이온이나 화학물질의 수송이 제어되고 있다. 이 제어를 행하는 이온 채널은 생체계의 신호 전달에 관한 중요한 막 단백질이며, 그 기능 측정이나 기능에 관련되는 약품의 개발에 있어서는 채널 단백질의 전기적 변화, 즉 이온 채널 전류의 측정이 요구된다.

[0004] 이 요구에 대해서, 지금까지 피펫 패치 클램프나 플레이너 패치 클램프 등의 기술이 개발되어 있다. 피펫 패치 클램프는 다점측정에 의한 하이스루풋 스크리닝에 응용할 수 없다는 약점이 있다. 이것에 대해서, 플레이너 패치 클램프는 실리콘칩과 같은 고체기판 상에 복수의 패치 클램프 장치를 구성해서 다점측정을 가능하게 하고, 각 패치 클램프 장치의 세포 배치 부위에는 각각 이온 채널 전류를 측정하기 위한 미세한 관통 구멍이 형성되어 있다.

[0005] 예를 들면 하기 특허문헌 1에는 복수의 패치 클램프 세포에서 패치 클램프 기록을 실시하기 위한 복수의 전극으로 이루어지는 평면적 패치 클램프 전극 배열에 대해서 기재되어 있다. 또한, 하기 특허문헌 2에는 실리콘 기판의 상하의 표면에 전극을 형성하고, 두개의 전극 사이에 전기적으로 연통시키기 위한 구멍을 관통하고, 관통 구멍의 입구에 둔 세포의 전기적 변화를 측정하는 플레이너형 패치 클램프 장치가 개시되어 있다.

**선행기술문헌**

**특허문헌**

- [0006] (특허문헌 0001) 일본 특허 공표 2003-511668호 공보
- (특허문헌 0002) 일본 특허 공표 2005-536751호 공보
- (특허문헌 0003) 일본 특허 공개 2009-204407호 공보

**비특허문헌**

- [0007] (비특허문헌 0001) Tsuneo Urisu et al, Analytical and Bioanalytical Chemistry, 391(2008) 2703-2709

**발명의 내용**

[0008] 그런데, 종래의 플레이너 패치 클램프 장치는 세포배양의 기능을 갖고 있지 않으므로 신경 세포와 같은 배양을 필요로 하는 세포에 적용할 수 없다고 하는 문제가 있었다. 즉, 측정 대상으로 하는 세포의 수명이 비배양 조건 하에서는 1시간 내지는 30분이하로 짧기 때문에 창약 스크리닝 등의 한정된 응용밖에 할 수 없으며, 피펫 패치 클램프가 활용되고 있는 세포의 기능 해석 등에의 응용이 곤란했다. 또한, 기판에 형성한 미세한 관통 구멍의 부위에 세포를 잘 운반하여 트랩하는 것이 곤란했다.

[0009] 우리스 및 우노는 상기 특허문헌 3(출원 번호:일본 특허 출원 2008-046145) 및 비특허문헌 1에 있어서 이상의 문제를 해결하는 플레이너 패치 클램프 장치를 제안하고 있다. 이 장치의 특징적인 구성은 기판에 형성한 미세한 관통 구멍에 있어서의 세포정착용 개구부의 둘레가장자리에 세포 고정력을 갖는 세포의 매트릭스 형성 물질(콜라겐, 피브로넥틴 등)을 부착시키고, 또한 기판에 있어서의 관통 구멍의 양측 표면부에는 전극에 통전 가능한 통전 가능한 액저류부를 형성하고, 이 액저류부에 도전성 액체(예를 들면 세포 배양액)를 충전한 점에 있다. 이 플레이너 패치 클램프 장치에 의하면, 세포의 매트릭스 형성 물질에 의해 세포를 미세 관통 구멍의 위치에 용이하게 트랩할 수 있고, 또한 세포의 배양 조건하에 있어서 충분한 시간을 들여서 이온 채널 활성의 측정을 행할 수 있다.

[0010] 그러나, 연구를 더 진척시킨 결과, 상기 제안에 의한 플레이너 패치 클램프 장치에서는 다음의 1), 2)와 같은 과제가 있는 것이 판명되었다.

- [0011] 1)이온 채널 전류를 계측하는 미세 관통 구멍의 둘레가장자리에 세포의 매트릭스 형성 물질을 부착시키고 있으므로 트랩된 세포의 세포막과 미세 관통 구멍 둘레가장자리의 기관표면 사이에 약간의 간극이 생겨, 소위 밀봉 저항이 저하되어 버린다. 이 간극을 흐르는 전류는 이온 채널 전류에 대해서 리크 전류로서 가해지고, 이것이 변동하면 노이즈로서 기여하게 된다. 따라서 밀봉 저항이 저하된 상태에 있어서는 약간의 인가막 전위의 변동에 대해서도 노이즈 전류가 커져 이온 채널 전류의 정확한 계측이 곤란해진다.
- [0012] 이 과제에 대해서, 단지 세포의 매트릭스 형성 물질의 이용을 단념하는 것만으로는 미세 관통 구멍의 위치에 세포를 용이하게 트랩한다는 이점도 몰각된다. 한편, 상기 노이즈 전류 대책으로서는 밀봉 저항의 증대 이외에 전극층의 인가막 전위의 변동을 억제하는 것도 유효하다. 또한, 원래 밀봉 저항이 낮지 않은 경우에도 이온 채널 전류의 보다 정확한 계측을 피함에 있어서 인가막 전위의 변동의 억제에 의거하는 노이즈 전류 대책을 실시하는 것은 유효하다.
- [0013] 2)미세 관통 구멍의 위치에 트랩된 세포가 배양 상태에 있어서 자주 미세 관통 구멍으로부터 벗어난 위치로 이동해 버린다. 이러한 세포의 이동에 의해 이온 채널 전류의 계측을 할 수 없게 된다.
- [0014] 그래서 본 발명은 플레이너 패치 클램프 장치에 있어서의 인가막 전위의 변동을 억제해서 노이즈 전류를 저감시키고, 이로써 이온 채널 전류의 정확한 계측을 가능하게 하는 것을 해결해야 할 제 1 과제로 한다.
- [0015] 또한, 본 발명은 미세 관통 구멍의 위치에 트랩된 배양 상태의 세포가 그 위치로부터 이동하지 않도록 중지해 두는 기술을 개발하는 것을 해결해야 할 제 2 과제로 한다.
- [0016] (제 1 발명의 구성)
- [0017] 상기 과제를 해결하기 위한 제 1 발명의 구성은 (1)전기절연성 기판에 그 양측의 표면을 연통시키며, 세포를 통과시키지 않지만 액체를 통과시킬 수 있는 내경의 미세한 관통 구멍을 1개이상 형성하고, (2)상기 관통 구멍의 제 1 표면측과 제 2 표면측에는 각각 도전성 액체를 유지하기 위한 액저류부와, 그 액저류부의 도전성 액체에 대해서 통전 가능하게 배치된 전극부를 형성하고, (3)제 1 표면측의 액저류부가 세포 배치용 액저류부가 되고, 또한 (4)상기 제 1 표면측 및 제 2 표면측의 전극부가 이하의 (a)~(c)의 요소를 구비하는 플레이너 패치 클램프 장치이다.
- [0018] (a)상기 액저류부에 도전성 액체가 도입되었을 때에 그 도전성 액체에 접하게 되는 용기벽의 적어도 일부가 무기 다공질 재료로 구성되어 있는 전극 용기.
- [0019] (b) 상기 전극 용기내에 수용된 귀금속(「Nm」이라고 표기한다)의 표층부에 그 귀금속의 염화물(NmCl)층을 형성한 전극.
- [0020] (c) 상기 전극 용기내에 충전된 상기 귀금속의 염화물(NmCl) 및 알칼리 금속염화물이 포화 농도로 용해된 전극 용액.
- [0021] (제 2 발명의 구성)
- [0022] 상기 과제를 해결하기 위한 제 2 발명의 구성은 상기 제 1 발명에 의한 플레이너 패치 클램프 장치에 있어서, 제 1 표면측의 액저류부는 광불투과성의 재료에 의해 구성된 세포를 배치하기 위한 주액저류부와, 제 1 표면측의 전극부가 배치된 부액저류부와, 이들 주액저류부 및 부액저류부를 연통시키는 좁은 통액로로 이루어지는 플레이너 패치 클램프 장치이다.
- [0023] (제 3 발명의 구성)
- [0024] 상기 과제를 해결하기 위한 제 3 발명의 구성은 상기 제 1 발명 또는 제 2 발명에 의한 플레이너 패치 클램프 장치에 있어서, 제 2 표면측의 액저류부가 도전성 액체를 도입 및 배출하기 위한 통액로와 연통되고, 또한 이 통액로에 제 2 표면측의 전극부가 배치되어 있는 플레이너 패치 클램프 장치이다.
- [0025] (제 4 발명의 구성)
- [0026] 상기 과제를 해결하기 위한 제 4 발명의 구성은 상기 제 1 발명~제 3 발명 중 어느 하나에 의한 플레이너 패치 클램프 장치에 있어서, 제 1 표면측에 액저류부를 복수 설치하고, 이들 액저류부에는 신경 세포의 세포체보다 큰 폭과 배양 상태의 세포체의 이동을 저지할 수 있는 깊이를 갖는 오목부를 형성하고 있는 플레이너 패치 클램프 장치이다.
- [0027] (제 5 발명의 구성)

- [0028] 상기 과제를 해결하기 위한 제 5 발명의 구성은 상기 제 1 발명~제 4 발명 중 어느 하나에 의한 플레이너 패치 클램프 장치가 이하의 (A) 및/또는 (B)의 구성을 구비하는 플레이너 패치 클램프 장치이다.
- [0029] (A)제 2 표면층의 액저류부가 액체 흡인 디바이스에 연결되어 있고, 이 액체 흡인 디바이스에 의해 제 2 표면층의 액저류부에 음압을 부하할 수 있게 되어 있다.
- [0030] (B)기관의 관통 구멍에 있어서의 제 1 표면층의 개구부 둘레가장자리에 세포 고정력을 갖는 세포의 매트릭스 형성 물질을 부착시키고 있다.
- [0031] (제 6 발명의 구성)
- [0032] 상기 과제를 해결하기 위한 제 6 발명의 구성은 이하의 (a') ~ (c')의 요소를 구비하는 플레이너 패치 클램프 장치용 전극부이다.
- [0033] (a') 용기벽의 적어도 일부가 무기 다공질 재료로 구성된 전극 용기.
- [0034] (b') 상기 전극 용기내에 수용된 귀금속(Nm)의 표층부에 그 귀금속의 염화물(NmCl)층을 형성한 전극.
- [0035] (c') 상기 전극 용기에 충전된 상기 귀금속의 염화물(NmCl) 및 알칼리 금속염화물이 포화 농도로 용해된 전극 용액.
- [0036] (제 7 발명의 구성)
- [0037] 상기 과제를 해결하기 위한 제 7 발명의 구성은 상기 제 6 발명에 의한 플레이너 패치 클램프 장치용 전극부에 있어서, 용기벽의 적어도 일부를 구성하는 무기 다공질 재료가 다공질 유리 또는 다공질 세라믹스인 플레이너 패치 클램프 장치용 전극부이다.
- [0038] (제 8 발명의 구성)
- [0039] 상기 과제를 해결하기 위한 제 8 발명의 구성은 상기 제 6 발명 또는 제 7 발명에 의한 플레이너 패치 클램프 장치용 전극부에 있어서, 귀금속(Nm)이 은(Ag) 또는 백금(Pt)이며, 알칼리 금속염화물이 염화칼륨(KCl)인 플레이너 패치 클램프 장치용 전극부이다.
- [0040] (제 9 발명의 구성)
- [0041] 상기 과제를 해결하기 위한 제 9 발명의 구성은 상기 제 6 발명~제 8 발명 중 어느 하나에 의한 플레이너 패치 클램프 장치용 전극부에 있어서, 전극이 이하 (C) 또는 (D)인 플레이너 패치 클램프 장치용 전극부이다.
- [0042] (C)전극 용기 내부로 돌출된 봉상 전극으로서, 귀금속(Nm)으로 이루어지는 심재의 표층부에 귀금속 염화물(NmCl)층을 형성하고 있다.
- [0043] (D)전극 용기의 벽부의 내주면에 형성된 통상 전극으로서, 용기벽부층의 바닥층이 귀금속(Nm)의 증착층이며, 전극 용액에 접하는 표면층이 귀금속 염화물(NmCl)의 증착층이다.
- [0044] (제 10 발명의 구성)
- [0045] 상기 과제를 해결하기 위한 제 10 발명의 구성은 상기 제 1 발명~제 5 발명 중 어느 하나에 기재된 플레이너 패치 클램프 장치의 제 2 표면층의 액저류부에 도전성 액체를 도입함과 아울러 제 1 표면층의 액저류부에는 측정 대상인 세포를 분산시킨 도전성 액체를 도입해서 제 1 표면층의 액저류부와 제 2 표면층의 액저류부를 도전적으로 연통시키고, 상기 세포를 제 1 표면층의 액저류부의 소정 위치에 배치한 상태에서 제 1 표면층 및 제 2 표면층의 전극부의 전극간에 전압을 인가하여 측정 대상인 세포의 이온 채널 전류를 측정하는 세포 이온 채널 전류 측정 방법이다.
- [0046] (제 11 발명의 구성)
- [0047] 상기 과제를 해결하기 위한 제 11 발명의 구성은 상기 제 10 발명에 의한 세포 이온 채널 전류 측정 방법에 있어서, 플레이너 패치 클램프 장치의 기관의 제 1 표면층에는 제 4 발명에 기재한 구성의 복수의 액저류부를 설치하고, 측정 대상인 세포가 신경 세포이며, 도전성 액체가 상기 신경 세포의 세포배양액인 세포 이온 채널 전류 측정 방법이다.
- [0048] (제 12 발명의 구성)
- [0049] 상기 과제를 해결하기 위한 제 12 발명의 구성은 상기 제 11 발명에 의한 세포 이온 채널 전류 측정 방법에 있



어서, 신경 세포에는 미리 Ca 이미징을 위한 Ca 프로브가 도입되어 있고, 그 세포 이온 채널 전류를 적어도 세포 활동 전위의 발생시 또는 활동 전위의 전파시에 발생하는 형광의 관찰인 Ca 이미징을 포함하는 수단에 의해 측정하는 세포 이온 채널 전류 측정 방법이다.

[0050] (제 13 발명의 구성)

[0051] 상기 과제를 해결하기 위한 제 13 발명의 구성은 상기 제 12 발명에 의한 세포 이온 채널 전류 측정 방법에 있어서, Ca 프로브가 도입된 신경 세포를 상기 플래이너 패치 클램프 장치의 제 1 표면층에 복수 내지 다수 배치함과 아울러 이들 신경 세포의 시냅스가 서로 연결된 신경 세포 네트워크로 해 두고, 이들 중 단일의 신경 세포에 전류 주입 또는 전압 인가함으로써 상기 복수 내지 다수의 신경 세포에 있어서의 상기 Ca 이미징에 의한 측정을 행하는 세포 이온 채널 전류 측정 방법이다.

[0052] (발명의 효과)

[0053] 제 1 발명에 의하면, 플래이너 패치 클램프 장치에 있어서 일반적인 다점측정에 의한 하이스루풋 스크리닝이 가능한 점에 추가해서 플래이너 패치 클램프 장치에 있어서의 인가막 전위의 변동을 억제해서 노이즈 전류를 저감시키고, 이로써 이온 채널 전류의 정확한 측정을 가능하게 할 수 있다.

[0054] 세포의 이온 채널 전류의 정확한 측정을 피함에 있어서 플래이너 패치 클램프 장치의 밀봉 저항이 낮은 경우는 물론, 밀봉 저항이 낮지 않은 경우라도 노이즈 전류 대책을 실시해 두는 것은 유효하고 또한 중요하다. 노이즈 전류 대책으로서의 밀봉 저항의 증대 이외에 전극층의 인가막 전위의 변동을 억제하는 것도 효과적이다.

[0055] 플래이너 패치 클램프 장치의 전극으로서 귀금속(Nm)(예를 들면 은(Ag))의 표층부에 그 귀금속의 염화물(NmCl)층(예를 들면 AgCl층)을 형성한 전극을 사용하는 경우, 상기과 같은 인가막 전위의 변동은 주로 AgCl/Ag 전극의 표면과 그것을 둘러싸는 용액 사이의 계면 전위의 변동이나, 액-액 계면 전위의 변동에 의한 것이다.

[0056] 그래서 제 1 발명과 같이, 전극부의 전극 용기내에 있어서 AgCl/Ag 전극을 AgCl 및 알칼리 금속염화물(예를 들면 KCl)의 포화 용액인 전극 용액에 담그고, 이들을 무기 다공질 재료로 구성된 용기벽을 통해 세포 배양액과 같은 도전성 액체(KCl 농도는 수mmol정도이다)에 접촉시켜 두면, 전극 용기의 내부와 외부가 전기적으로 도통된 상태가 된다. 그러나, 액체 자체는 무기 다공질 재료의 세공을 그다지 통과할 수 없으므로 전극 용기 내부의 전극 용액과 전극 용기 외부의 도전성 액체의 혼합은 무시할 수 있을 정도로 작다. 그 결과, 전극 용기의 내부와 외부에 있어서의 KCl의 큰 농도차가 일정하게 유지되고, AgCl/Ag 전극의 계면 전위나, 액-액 계면 전위가 일정하게 되어 인가막 전위의 변동이 일어나지 않는 것이다.

[0057] 제 2 발명에 의하면, 광으로 채널이 열리는 이온 채널을 발현한 세포를 사용해서 광에 의해 채널 전류를 제어하는 경우에, 제 1 표면층의 액저류부에 있어서의 세포를 배치하기 위한 주액저류부에 광을 조사해도 주액저류부에 대해서 좁은 통액로를 통해 연통되어 있는 부액저류부에는 실질적으로 조사광이 도달하지 않으므로, 조사광이 제 1 표면층의 전극부를 조사하는 것에 의한 문제가 방지된다. 이 점에 추가해서, 전극부의 전극 용기로부터 약간 누출되는 전극 용액은 좁은 통액로가 배리어로 되어 주액저류부에 배치한 세포의 주위에는 거의 도달하지 않는다. 따라서, 제 1 발명에 관해서 상기한 인가막 전위의 변동이 더욱 철저하게 방지된다. 이 점을 감안하면, 주액저류부와 부액저류부를 연통시키는 통액로는 예를 들면 1mm이하의 내경인 것이 특히 바람직하다.

[0058] 제 3 발명에 의하면, 제 2 표면층의 액저류부에 대한 도전성 액체의 도입 및 배출을 용이하고 또한 확실하게 행할 수 있을 뿐만 아니라, 광으로 채널이 열리는 이온 채널을 발현시킨 세포를 사용해서 광에 의해 채널 전류를 제어할 경우에 있어서 제 1 표면층의 주액저류부에 광을 조사해도 제 2 표면층의 전극부는 제 2 표면층의 액저류부로부터 이격된 통액로에 배치되어 있으므로, 조사광이 제 2 표면층의 전극부를 조사하는 것에 의한 문제가 방지된다.

[0059] 제 4 발명에 의하면, 신경 세포의 세포체보다 큰 폭과 배양 상태의 세포체의 이동을 저지할 수 있는 깊이를 갖는 오목부가 세포체 설치 영역으로서 형성하고 있으므로, 일단 이 오목부에 신경 세포가 배치되면 배양 상태에 있어서도 그 위치로부터 이동할 수 없다.

[0060] 또한, 제 4 발명에 있어서, 복수의 오목부를 세포체보다 작은 폭의 홈으로 서로 더 연결하는 것도 가능하다. 그 경우, 배양 상태의 복수의 신경 세포가 작은 폭의 홈을 따라서 서로 2차원적 네트워크를 형성할 수 있다. 그 결과, 2차원적 네트워크를 형성한 각 신경 세포의 이온 채널 전류를 높은 시간·공간 분해능으로 측정할 수 있다. 더욱 바람직하게는 그 측정을 동시 다점적으로 행할 수 있다.

[0061] 제 5 발명의 (A)의 구성을 구비하는 플래이너 패치 클램프 장치에 있어서는 액체 흡인 디바이스를 사용해서 제



2 표면층의 액저류부에 음압을 부하함으로써, 기관의 미세한 관통 구멍을 통해서 제 1 표면층의 액저류부로부터 도전성 액체를 흡인할 수 있다. 따라서, 그 도전성 액체 중에 분산시킨 세포를 관통 구멍의 개구부에 정착시킬 수 있는 점에 추가해서 세포막과 세포외 매트릭스(18) 도포 표면의 밀착성이 향상되어 밀봉 저항이 향상된다. 또한, 제 5 발명의 (B)의 구성을 구비하는 플레이너 패치 클램프 장치에 있어서는 세포외 매트릭스 형성 물질에 의해 제 1 표면층의 도전성 액체 중에 분산시킨 세포를 관통 구멍의 개구부에 정착시킬 수 있다. 이 경우, 세포를 플레이너 패치 클램프 장치의 소정 위치에 트랩하는 공정에서 세포의 이온 채널 활성화에 영향을 줄 수 있는 스트레스가 부가되지 않는다.

[0062] 제 5 발명의 플레이너 패치 클램프 장치에 있어서는 (A)의 구성을 구비할 수도 있고, 또는 (B)의 구성을 구비할 수도 있지만, (A)의 구성과 (B)의 구성을 동시에 구비할 수도 있다.

[0063] 제 6 발명에 의하면, 제 1 발명~제 5 발명에 의한 플레이너 패치 클램프 장치에 장착하기 위한 신규이며 유용한 플레이너 패치 클램프 장치용 전극부가 제공된다. 그 효과는 제 1 발명에 관해서 서술한 바와 같다.

[0064] 제 7 발명에 의하면, 플레이너 패치 클램프 장치용 전극부의 전극 용기벽의 적어도 일부를 구성하는 무기 다공질 재료의 바람직한 실시형태가 제공된다.

[0065] 제 8 발명에 의하면, 플레이너 패치 클램프 장치용 전극부의 전극에 사용하는 귀금속에 대해서 바람직한 실시형태가 제공된다.

[0066] 제 9 발명에 의하면, 플레이너 패치 클램프 장치용 전극부의 전극의 형상 및 구조에 관해서 바람직한 실시형태가 제공된다.

[0067] 제 10 발명에 의하면, 제 1 발명~제 5 발명 중 어느 하나에 기재된 플레이너 패치 클램프 장치를 사용한 신규인 세포 이온 채널 전류 측정 방법이 제공된다. 이 방법의 효과는 제 1 발명~제 5 발명에 관해서 서술한 바와 같지만, 요컨대, 플레이너 패치 클램프 장치에 있어서의 인가막 전위의 변동을 억제하고, 노이즈 전류를 저감시키고, 이로써 이온 채널 전류의 정확한 측정을 가능하게 한 점에 최대의 효과가 있다.

[0068] 제 11 발명에 의하면, 제 10 발명에 의한 세포 이온 채널 전류 측정 방법에 있어서, 신경 세포를 사용한 경우의 우수한 이온 채널 전류 측정 방법이 제공되고, 특히, 2차원적 네트워크를 형성한 각 신경 세포의 이온 채널 전류를 높은 시간·공간 분해능으로 측정할 수 있고, 또한 그 측정을 동시 다점적으로 행할 수 있다.

[0069] 제 12 발명에 의하면, 제 10 발명, 제 11 발명과 같은 이온 채널 전류의 정확한 측정에 추가해서 플레이너 패치 클램프 장치의 기관 상방의 스페이스를 이용해서 신경 세포나 그 네트워크의 기능 해석에 중요한 Ca 이미징을 행할 수 있다는 큰 이점이 얻어진다.

[0070] 제 13 발명에 의하면, 플레이너 패치 클램프 장치의 기관의 미세한 관통 구멍 위에 있는 단일의 신경 세포(제 1 신경 세포)를 전류 주입 또는 전압 인가에 의해 자극해서 활동 전위를 발생시킬 수 있고, 동시에 그 활동 전위가 신경 세포 네트워크를 통해서 인접하는 주위의 신경 세포(제 2 신경 세포)에 전파되고, 또한 제 2 신경 세포로부터 이것에 인접하는 제 3 신경 세포를 전파하는 모양을 Ca 이미징에 의해 측정할 수 있다. 종래의 기술로서, 예를 들면 전극 자극법이 있지만, 이 방법의 경우, 단일의 신경 세포를 선택적으로 자극하는 것이 곤란하며, 해석이 복잡하게 된다. 또한, 다른 종래 기술인 마이크로 피펫 전극에 의한 자극에서는 단일의 신경 세포를 선택적으로 자극할 수 있지만, 하이스루풋 스크리닝에 필요한 다 채널화가 곤란하지만, 제 13 발명에 의하면, 측정부를 매우 소형화할 수 있으므로 다채널화가 용이하다.

**도면의 간단한 설명**

[0071] 도 1은 제 1 실시예에 의한 플레이너 패치 클램프 장치의 단면도를 나타낸다.

도 2는 잠음 전류와 이온 채널 전류를 밀봉 저항과 막전위의 변동 전압  $\Delta V_m$ 의 함수로서 나타낸다.

도 3은 제 1 실시예에 의한 전극부의 상세한 구조를 단면도로 나타낸다.

도 4는 제 1 실시예에서 실제로 제작한 전극부의 사진을 나타낸다.

도 5는 종래의 AgCl/Ag 전극(「Normal AgCl/Ag electrode」라고 표기)을 사용한 경우와 본 발명의 전극부(「Stable AgCl/Ag electrode」라고 표기)를 사용했을 경우의 인가 전압 0mV에서의 전류변동의 측정 결과를 나타낸다.

도 6(a)는 제 2 실시예에 의한 플레이너 패치 클램프 장치의 요부 단면도를 나타내고, 도 6(b)는 복수의 원형의

오목부(24)와, 이들을 서로 연결하는 가는 홈의 평면도를 나타낸다.

도 7은 제 3 실시예에 있어서의 이온 채널 전류의 측정 결과를 나타낸다.

도 8은 신경 세포 네트워크의 Ca 이미징에 관한 제 4 실시예를 도시한다.

**발명을 실시하기 위한 구체적인 내용**

- [0072] 이어서 본 발명의 실시형태를 그 최량의 형태를 포함해서 설명한다. 본 발명의 기술적 범위는 이들 실시형태에 의해 한정되지 않는다.
- [0073] [플레이너 패치 클램프 장치]
- [0074] 본 발명에 의한 플레이너 패치 클램프 장치에 있어서는 그 전기절연성의 기관에 있어서의 양측의 표면인 제 1 표면측(세포를 배치하는 표면측)과 제 2 표면측을 연통시키는 미세한 관통 구멍을 형성하고 있다. 또한, 실시예에 있어서는 기관을 수평 방향으로 배향시킨 가로형의 플레이너 패치 클램프 장치를 나타내지만, 기관을 그 밖의 방향으로 배향시킨 것, 예를 들면 기관을 수직 방향으로 설치한 세로형의 플레이너 패치 클램프 장치도 본 발명에 포함된다.
- [0075] 전기절연성의 기관으로서 유리제, 세라믹제, 플라스틱제 등의 기관을 바람직하게 사용할 수 있다. 일례로서 실리콘 기관을 사용할 경우, 제 1 표면측의 실리콘층과, 중간층의 산화 실리콘층과, 제 2 표면측의 실리콘층이 순차 적층된 구조를 갖는 실리콘 기관(SOI기관)이 바람직하다. 이러한 적층구조의 실리콘 기관에 있어서는 매우 절연성이 높은 중간층이 두개의 실리콘층간에 존재하므로, 측정 대상 세포의 이온 채널 폐쇄시에 고저항 상태를 확립할 수 있고, 백그라운드 노이즈를 저감시킬 수 있다.
- [0076] 기관에 형성하는 관통 구멍의 개수는 한정되지 않고, 1개이어도 좋지만, 복수개~다수개인 것(예를 들면, 2개~수십개, 또는 그 이상)이 특히 바람직하다. 미세한 관통 구멍의 내경은 액체를 통과시키지만 세포를 통과시키지 않는 정도의 내경(예를 들면 1~3 $\mu$ m정도)인 것이 바람직하지만, 이들의 내경에 한정되지 않는다.
- [0077] 또한, 본 발명에 의한 플레이너 패치 클램프 장치에 있어서는 상기 관통 구멍의 제 1 표면측과 제 2 표면측에 각각 도전성 액체를 유지하기 위한 액저류부와, 상기 액저류부의 도전성 액체에 대해서 통전 가능하게 배치된 전극부를 형성하고 있다.
- [0078] 액저류부의 구성은 「도전성 액체를 유지하고, 또한 도전성 액체에 대해서 전극부를 통전 가능하게 배치할 수 있다」라고 하는 요구를 충족시키는 한에 있어서 구성이 한정되지 않지만, 예를 들면, 실시예에 나타난 바와 같이, 기관의 제 1 표면측과 제 2 표면측에 각각 스페이서 부재나 플레이트 부재를 겹치고, 스페이서 부재에는 기관의 관통 구멍에 대응하는 위치에 노치부를 형성함으로써 형성할 수 있다.
- [0079] 반드시 한정되지 않지만, 제 1 표면측의 스페이서 부재 및 플레이트 부재는 광불투과성의 재료로 이루어지는 것이 바람직하고, 제 2 표면측의 스페이서 부재 및 플레이트 부재는 광투과성의 재료로 이루어지는 것이 바람직하다.
- [0080] 액저류부는 그 자체가 액밀하게 구성됨과 아울러 도전성 액체(또는 세포를 분산시킨 도전성 액체)를 도입하거나 배출하기 위한 통액로 또는 개폐 가능한 개구부를 구비한다. 플레이너 패치 클램프 장치가 기관을 수평 방향으로 배향시키는 가로형인 경우에는 기관의 제 1 표면측의 액저류부는 그 액저류부의 상부를 커버 글라스와 같은 덮개용 부재로 막고, 필요에 따라 덮개용 부재를 분리해서 액저류부를 개구시킬 수도 있다.
- [0081] 본 발명에 의한 플레이너 패치 클램프 장치에 있어서는 제 1 표면측 및 제 2 표면측에 신규인 구성의 전극부를 구비하지만, 이 점은 「플레이너 패치 클램프 장치용 전극부」의 항에 있어서 후술한다.
- [0082] 또한, 본 발명에 의한 플레이너 패치 클램프 장치에 있어서는 상기 제 1 표면측의 액저류부는 광불투과성의 재료에 의해 구성된 세포를 배치하기 위한 주액저류부와, 제 1 표면측의 전극부가 배치된 부액저류부와, 이들 액저류부를 연통시키는 좁은 통액로로 이루어지는 구성으로 하는 것도 바람직하다. 또한, 상기 제 2 표면측의 액저류부가 도전성 액체를 도입 및 배출하기 위한 통액로와 연통되고, 또한 이 통액로에 제 2 표면측의 전극부가 배치되어 있는 구성으로 하는 것도 바람직하다. 특히 바람직하게는 상기 제 1 표면측에 액저류부를 복수 형성하고, 이들의 액저류부에는 신경 세포의 세포체보다 큰 폭과 배양 상태의 세포체의 이동을 저지할 수 있는 깊이를 갖는 오목부를 형성할 수 있다. 또한, 이들 복수의 오목부를 세포체보다 작은 폭의 홈으로 서로 연결하는 것도 가능하다. 또한, 플레이너 패치 클램프 장치를 이하의 (A) 및/또는 (B)의 구성을 구비하는 것으로 하는

것도 바람직하다.

- [0083] (A)제 2 표면층의 액저류부가 액체 흡인 디바이스에 연결되어 있고, 이 액체 흡인 디바이스에 의해 제 2 표면층의 액저류부에 음압을 부하할 수 있게 되어 있다.
- [0084] (B)기관의 관통 구멍에 있어서의 제 1 표면층의 개구부 둘레가장자리에 세포 고정력을 갖는 세포의 매트릭스 형성 물질을 부착시키고 있다.
- [0085] 상기 세포의 매트릭스 형성 물질의 구성 재료로서는 폴리로신, 콜라겐(I형, II형, IV형), 프로테오글리칸, 피브로넥틴, 라미닌, 콜라겐, 프로테오글리칸(바시칸, 데코린 등), 프로테오글리칸(아글리칸), 링크 단백질, 엔탁틴, 테네이신, 프로테오글리칸 [콘드로이틴 황산 프로테오글리칸, 헤파란 황산 프로테오글리칸(팔칸 등), 케라탄 황산 프로테오글리칸, 텔마탄 황산 프로테오글리칸], 히알루론산(글리코사미노글리칸의 일종), 엘라스틴, 피브린 등이 예시된다.
- [0086] [플레이너 패치 클램프 장치용 전극부]
- [0087] 또한, 본 발명에 의한 플레이너 패치 클램프 장치용 전극부는 이하 (a') ~ (c') 의 요소를 구비하고, 제 1 표면층 및 제 2 표면층에 형성된다.
- [0088] (a') 용기벽의 적어도 일부가 무기 다공질 재료로 구성된 전극 용기.
- [0089] (b') 상기 전극 용기내에 수용된 귀금속(Nm)의 표층부에 그 귀금속의 염화물(NmCl)층을 형성한 전극.
- [0090] (c') 상기 전극 용기에 충전된 상기 귀금속의 염화물(NmCl) 및 알칼리 금속염화물이 포화 농도로 용해된 전극 용액.
- [0091] 상기에 있어서의 귀금속(Nm)의 종류는 한정되지 않지만, 은(Ag) 및 백금(Pt)이 바람직하고, 특히 은(Ag)이 바람직하다. 따라서, 귀금속의 염화물(NmCl)로서도 은의 염화물(AgCl) 및 백금의 염화물(AgCl)이 바람직하고, 특히 은의 염화물(AgCl)이 바람직하다. 또한, 알칼리 금속염화물로서는 한정되지 않지만, 염화칼륨(KCl)인 것이 바람직하다. 용기벽의 적어도 일부를 구성하는 무기 다공질 재료는 바람직하게는 다공질 유리 또는 다공질 세라믹스이다.
- [0092] 또한, 상기 전극부에 있어서의 전극이 이하 (C) 또는 (D)인 것도 바람직하다.
- [0093] (C)전극 용기 내부로 돌출한 봉상 전극으로서, 귀금속(Nm)으로 이루어지는 심재의 표층부에 귀금속 염화물(NmCl)층을 형성하고 있다.
- [0094] (D)전극 용기의 벽부의 내주면에 형성한 통상 전극으로서, 용기벽부층의 바닥층이 귀금속(Nm)의 증착층이며, 전극 용액에 접하는 표면층이 귀금속 염화물(NmCl)의 증착층이다.
- [0095] [세포 이온 채널 전류 계측 방법]
- [0096] 본 발명에 의한 세포 이온 채널 전류 계측 방법은 상기에 기재된 여러가지 형태에 의한 플레이너 패치 클램프 장치를 사용하고, 그 제 2 표면층의 액저류부에 도전성 액체를 도입함과 아울러 제 1 표면층의 액저류부에는 측정 대상인 세포를 분산시킨 도전성 액체를 도입해서 제 1 표면층의 액저류부와 제 2 표면층의 액저류부를 도전적으로 연통시키고, 상기 세포를 제 1 표면층의 액저류부의 소정 위치에 배치한 상태에서 제 1 표면층 및 제 2 표면층의 전극부의 전극간에 전압을 인가해서 측정 대상인 세포의 이온 채널 전류를 계측하는 방법이다.
- [0097] 그 경우에 있어서, 플레이너 패치 클램프 장치의 기관의 제 1 표면층에는 복수의 액저류부를 형성하고, 측정 대상인 세포가 신경 세포이며, 도전성 액체가 상기 신경 세포의 세포 배양액인 경우가 특히 특징적인 실시형태이다.
- [0098] (Ca 이미징)
- [0099] 세포의 이온 채널 전류를 계측하는 수단이나 시스템은 특별히 한정되지 않고, 예를 들면 통상의 전류 계측을 행할 수 있지만, 더욱 바람직한 수단으로서 Ca 이미징(칼슘 이미징)을 들 수 있다. Ca 이미징은 특히 복수 내지 다수의 신경 세포 네트워크의 해석에 있어서 유효하다.
- [0100] Ca 이미징이란 주지와 같이, Ca 이온과 결합해서 형광을 발하는 색소(「Ca 형광 지시약」 이거나 「Ca 프로브」라고 불린다)를 세포내에 도입해 두고, 신경 세포에 활동 전위가 발생했을 때에 세포체에 Ca 이온이 유입되는 현상을 형광으로서 포착하는 방법이다.

- [0101] 세포, 특히 신경 세포의 이온 채널 전류의 측정에 있어서 Ca 이미징이 유효한 이유에 대해서는 상기 「발명의 효과」의 항에서 제 12 발명 및 제 13 발명에 관해서 서술한 바와 같다.
- [0102] 실시예
- [0103] 이어서 본 발명의 실시예를 설명한다. 본 발명의 기술적 범위는 이하의 실시예에 의해 한정되지 않는다.
- [0104] [제 1 실시예]
- [0105] 본 실시예에 의한 플레이너 패치 클램프 장치를 도 1에 나타낸다. 이 장치는 이온 채널 바이오센서로서 기능하는 배양형의 플레이너 패치 클램프 장치이다.
- [0106] 플레이너 패치 클램프 장치에 있어서의 전기절연성의 기관(1)으로서 실리콘 기관을 사용하고 있다(비특허문헌 1). 도 1에서는 기관(1)에 단일의 플레이너 패치 클램프 장치를 구성하고 있지만, 보다 대면적의 기관(1)을 사용해서 다수의 플레이너 패치 클램프 장치를 구성할 수도 있다.
- [0107] 기관(1)에는 그 제 1 표면측(도면의 상측)과 제 2 표면측(도면의 하측)을 연통시키는 지름 1~3 $\mu$ m의 미세한 관통 구멍(19)이 형성되어 있다. 도 1에서는 관통 구멍(19)은 기관(1)의 중앙에 1개 형성되어 있지만, 보다 큰 기관을 사용해서 다수의 관통 구멍(19)을 형성하고, 이들 각 관통 구멍(19)에 대해서 각각 이하와 같이 구성해도 좋다. 관통 구멍(19)의 제 1 표면측의 개구부 상에는 세포(12)가 배치되어 있다.
- [0108] 기관(1)은 그 제 1 표면측과 제 2 표면측이 1쌍의 스페이서(2,3)로 협착되어 있다. 스페이서(2,3)의 구성 재료는 한정되지 않는다. 그러나, 제 1 표면측의 스페이서(2)에 대해서는 바람직하게는 탄력성이 있는 광투과성의 재료, 예를 들면 실리콘 고무나 PDMS(polydimethylsiloxane) 등을 사용할 수 있다. 한편, 제 2 표면측의 스페이서(3)에 대해서는 바람직하게는 광투과성의 재료를 사용할 수 있다.
- [0109] 스페이서(2)에 있어서의 상기 세포(12)의 배치 부분에는 예를 들면 원형의 노치부가 형성되고, 이 노치부에 세포(12)가 배치된다. 스페이서(3)에 있어서도 스페이서(2)와 대응하는 부분에 예를 들면 원형의 노치부가 형성되고, 관통 구멍(19)에 있어서의 제 2 표면측의 개구부가 이 노치부에 개구하고 있다.
- [0110] 그리고, 상기 기관(1) 및 1쌍의 스페이서(2,3) 전체가 1쌍의 튼튼한 플레이트(4,5)로 체결된 구조로 되어 있다. 플레이트(4,5)의 재료로서는 120℃정도에서의 오토클레이브 멸균을 견디어낼 수 있는 재료이면 특별히 한정되지 않는다. 그러나, 제 1 표면측의 플레이트(4)에 대해서는 바람직하게는 광투과성의 재료를 사용할 수 있다. 한편, 제 2 표면측의 플레이트(5)에 대해서는 바람직하게는 광투과성의 재료를 사용할 수 있다.
- [0111] 이상의 구성에 있어서, 제 1 표면측의 플레이트(4)의 중앙부에는 제 1 표면측의 스페이서(2)의 상기한 노치부에 대응해서 동일 위치에 동일 크기의 예를 들면 원형의 노치부가 형성된다. 플레이트(4)의 중앙부에 형성한 노치부의 둘레가장자리에는 플레이트의 두께가 얇은 오목부상의 단차부를 형성하고, 이 단차부에 커버 유리나 같은 덮개용 부재(도시생략)를 설치함으로써 상기 스페이서(2)에 있어서의 노치부의 개구를 개폐 가능하게 구성해도 좋다. 이렇게 해서, 제 1 표면측에 주액저류부(6)가 구성된다.
- [0112] 한편, 제 2 표면측의 스페이서(3)에 있어서의 노치부의 개구를 플레이트(5)에 의해 막음으로써 제 2 표면측의 액저류부(9)가 형성되어 있다. 제 1 표면측에 형성한 주액저류부(6)와 제 2 표면측의 액저류부(9)는 관통 구멍(19)을 통해 연통되어 있다.
- [0113] 주액저류부(6)는 제 1 표면측의 액저류부의 제 1 영역을 구성하는 것으로서, 이 주액저류부(6)에 대해서 스페이서(2)에 설치한 좁은 통액로(8)를 통해 연통된 스페이스를 제 1 표면측의 액저류부의 제 2 영역을 구성하는 부액저류부(7)로 하고 있다. 부액저류부(7)는 스페이서(2) 및 플레이트(4)에 공통으로 형성한 구멍에 의해 형성되어 있다. 부액저류부(7)에는 후술하는 제 1 표면측의 전극부가 배치된다.
- [0114] 주액저류부(6), 통액로(8) 및 부액저류부(7)에 의해 구성되는 제 1 표면측의 액저류부에는 도전성 액체가 도입·유지된다. 이 도전성 액체에는 측정 대상인 세포를 분산시켜 둘 수 있다. 도입되는 도전성 액체로서는 140mM NaCl, 3mM KCl, 10mM 4-(2-히드록시에틸)-1-피페라진에탄술폰산(HEPES), 2.5mM CaCl<sub>2</sub>, 1.25mM MgCl<sub>2</sub> 및 10mM glucose at pH 7.4(with HCl) 등의 완충액, 또는 10% (v/v)FBS, 1% (v/v)GlutamaxTM(Gibco)을 첨가한 Dulbecco's modified Eagle's medium(DMEM: Sigma)의 세포배양의 배지 등이 사용된다. 이들 도전성 액체의 조성은 세포의 종류에 따라 적당히 변경된다.
- [0115] 제 2 표면측의 액저류부(9)에는 40mM CsCl, 80mM CsCH<sub>3</sub>SO<sub>4</sub>, 1mM MgCl<sub>2</sub>, 10mM HEPES, 2.5mM MgATP, 0.2mM Na<sub>2</sub>



EGTA, (pH 7.4) 등의 피펫 용액이라고 불리는 완충액, 또는 세포배양의 배지 등을 도입한다. 액저류부(9)에 대한 도전성 액체의 도입은 튜브상의 도입용 통액로(10)에 의해 행하고, 그 배출은 배출용 통액로(11)에 의해 행한다. 본 실시예에서는 도입용 통액로(10) 및 배출용 통액로(11)로서 외경 1mm, 내경 0.5mm의 PEEK제의 튜브를 사용했지만, 이들 통액로의 구성 재료에 대해서도 120℃정도에서의 오토클레이브 멸균을 견디어낼 수 있는 재료이면 다른 재료를 사용해도 좋다.

- [0116] 배출용 통액로(11)에도 제 1 표면층의 전극부와 동일하게 구성된 제 2 표면층의 전극부가 형성되어 있다. 통상, 제 1 표면층의 전극부의 전극은 접지되고 제 2 표면층의 전극부의 전극에 막전압이 인가된다.
- [0117] 세포(12)를 분산시킨 도전성 액체를 주액저류부(6)에 도입한 경우에 있어서 세포(12)를 도 1에 나타내는 관통 구멍(19)의 개구 위치에 배치시키기 위해서는 예를 들면 제 2 실시예에서 후술하는 바와 같이, 제 2 표면층의 액저류부(9)에 연결시킨 액체 흡인 디바이스에 의해 액저류부(9)의 도전성 액체를 흡인하면 관통 구멍(19)을 통해서 주액저류부(6)의 도전성 액체도 흡인되므로 세포(12)가 상기 위치에 배치된다. 또한 이 경우, 흡인압에 의해 관통 구멍(19)에 접하는 부분의 세포(12)의 세포막에 미세한 구멍을 형성할 수 있다. 이러한 구멍을 세포막에 형성하기 위해서는 그 밖에도, 니스타틴 이나 암포테리진B 등의 세포막 천공성의 항생 물질을 녹인 용액을 도입용 통액로(10)로부터 제 2 표면층의 액저류부(9)에 도입한다는 방법도 있다. 이러한 구멍을 세포막에 형성하면 세포내와 제 2 표면층의 액저류부(9)가 전기적으로 도통된 상태가 된다(비특허문헌 1).
- [0118] 한편, 배양형의 플레이너 패치 클램프 장치의 경우에는 세포(12)를 도 1에 나타내는 관통 구멍(19)의 개구 위치에 배치시키는 수단으로서 기관(1)의 관통 구멍(19)에 있어서의 제 1 표면층의 개구부 둘레가장자리에 세포 고정력을 갖는 세포의 매트릭스 형성 물질(18)을 부착시켜 둘 수도 있다.
- [0119] 이상의 구성에 있어서, 세포(12)에는 소정의 이온 채널이 발현되어 있고, 그 이온 채널을 여는 자극 물질이 제 1 표면층의 액저류부에 가해지면 이온 채널이 열리고, 제 1 표면층의 전극부와 제 2 표면층의 전극부 사이에 인가 전압에 따른 채널 전류가 흐른다. 이 때, 세포(12)의 세포막과 기관(1) 사이에 간극이 있으면 밀봉 저항이 저하되어 채널 전류에 리크 전류가 중첩된다.
- [0120] 막전위는 전극간에 실제로 인가되는 전압에 공간에 존재하는 전자파에 의한 유도 전압이나, 전극 금속 표면과 그것을 둘러싸는 완충액 사이의 계면전위나, 액/액계면전위가 중첩되므로, 유도 잡음이나 계면전위의 변동에 의해 리크 전류가 그것에 대응해서 변동한다. 그 때문에, 이온 채널 전류에 대해서는 베이스라인의 변동이라는 잡음으로서 나타난다. 이들, 베이스라인 변동 잡음 전류, 및 이온 채널 전류를 밀봉 저항과 막전위의 변동 전압  $DV_m$ 의 함수로서 도 2에 나타냈다.
- [0121] 도 2로부터 명백한 바와 같이, 밀봉 저항이 기가옴이상이 용이하게 얻어지는 피펫 패치 클램프에 있어서는 막전위의 변동  $DV_m$ 이 비교적 커도 베이스라인 변동 잡음의 영향은 무시할 수 없을 정도로 작지만, 밀봉 저항이 비교적 작은( $\sim 10M\Omega$ ) 배양형 플레이너 패치 클램프에 있어서는 이 막전위의 변동  $DV_m$ 을 작게 할 필요가 있다. 본 발명은 막전위의 변동이 작고 안정된 전극을 개발해서  $DV_m$ 을 대폭 작게 하고, 밀봉 저항이 작아도 잡음 전류가 작게 억제되어 측정이 가능한 플레이너 패치 클램프 기술을 제공한다.
- [0122] 제 1 표면층 및 제 2 표면층의 전극부의 상세한 구조를 도 3에 나타낸다. 내경 1mm의 파이렉스(등록상표) 유리로 이루어지는 통상의 전극 용기(13)의 내부는 KCl과 AgCl이 포화 농도로 용해된 전극 용액(14)으로 채워져 있다. KCl 농도는 3.3M/L, AgCl은 약 1.1mM/L를 첨가하고 있다. 또한, KCl의 경우, 포화 농도는 상온에서 약 3.3M/L이다. 전극 용기(13)내에 수용된 AgCl/Ag 전극(15)에 있어서 은선의 표면에는 AgCl이 코팅되어 있다. 이러한 AgCl/Ag 전극(15)은 은선의 표면에 AgCl 분말을 도포해서 형성하거나, 또는 차아염소산 나트륨을 포함하는 표백제 등에 은선을 침지해서도 제작할 수 있다. 또한, KCl 용액내에서의 전기 도금에 의해서도 제작할 수 있다.
- [0123] 전극 용기(13)의 선단부는 다공질 유리나 다공질 세라믹스 등의 무기 다공질 재료(16)로 막고 있다. 무기 다공질 재료(16)로서 실제로는 바이콜유리(코닝사)를 사용했다. 이렇게 전극 용기(13)의 용기벽의 일부를 구성하고 있는 무기 다공질 재료(16)는 그 선단이 도전성 액체(세포 배양액이나 완충액)에 침지된다. 도전성 액체 중의 KCl농도는 수mmol이지만, 이 무기 다공질 재료(16)의 효과에 의해 전극 용기(13)의 용기내와 용기외가 전기적으로는 도통된 상태이면서, 전극 용액(14)과 용기외의 도전성 액체의 혼합은 무시할 수 있을 정도로 작기 때문에 용기내와 용기외에서의 큰 KCl농도차가 일정하게 유지되고, 이것에 의해 AgCl/Ag 전극(15)의 계면전위나 액/액 계면전위가 일정하게 유지된다. 전극 용기(13)의 기단부는 밀봉재료(20)로 밀봉되고, 그것으로부터 전극핀(17)이 돌출되어 있다.

- [0124] 실제로 제작한 전극부의 사진을 도 4에 나타낸다. 도 4의 상측 사진은 제 2 표면층의 전극부이며, 도 1에 나타내는 배출용 통액로(11)와의 접속용 관이음매를 맞붙인 상태인 것으로서, 무기 다공질 재료(16)가 관이음매의 관로내에 노출되어 있다. 도 4의 하측 사진은 제 1 표면층의 전극부이며, 도 1에 나타낸 바와 같이 부액저류부(7)에 설치된다.
- [0125] 광으로 채널이 열리는 이온 채널을 발현한 세포를 사용해서 채널 전류를 제어하는 경우에 있어서, 제 1 표면층 및 제 2 표면층의 전극부를 이상과 같이 배치하면, 제 1 표면층의 액저류부가 광불투과성의 스페이서(2)나 플레이트(4)에 의해 형성되므로, 주액저류부(6)에 조사되는 조사광이 제 1 표면층 및 제 2 표면층의 전극부의 AgCl/Ag전극을 조사하는 일이 없다. 또한, 주액저류부(6)에는 세포가 설치되어 있고, 세포 외부의 도전성 액체의 칼륨 이온 농도는 수mM정도로 작으므로, 미량이라고는 해도 전극부로부터 누출되는 KCl의 영향을 억제하는 것이 바람직하다, 그 때문에, 제 1 표면층의 액저류부에 대해서는 주액저류부(6)에 추가해서 부액저류부(7)를 만들고, 이들 주액저류부(6) 및 부액저류부(7)를 폭 1mm이하의 좁은 통액로(8)로 연결하고 있다.
- [0126] 본 발명에 의한 플레이너 패치 클램프 장치용 전극부의 효과를 조사할 목적으로, 종래의 통상의 AgCl/Ag전극을 사용한 경우와, 본 발명의 전극부를 사용한 경우에 있어서의 인가 전압 0mV에서의 전류변동을 비교한 결과를 도 5에 나타낸다. 관통 구멍(19)의 지름이 약 2 $\mu$ m인 실리콘 기판을 도 1의 플레이너 패치 클램프 장치에 세트하고, 세포(12)를 설치하지 않은 상태에서 인가 전압 0mV로 전류변동을 계속했다. 관통 구멍(19)의 저항은 약 2M $\Omega$ 이므로, 종래의 AgCl/Ag전극에서는 약 0.5mV의 느린 계면 전위 변동이 있고, 이것이 크게 베이스라인을 변동시키고 있는 것에 대해, 본 발명의 전극부에서는 계면 전위 변동은 무시할 수 있을 정도로 작다. 측정은 Axopatch200B(Molecular Devices사)로 행했다. 도 5의 괄호내에는 계속했을 때의 Axopatch200B의 로우패스필터의 주파수를 나타낸다. 도면에 나타낸 바와 같이 본 발명의 전극의 안정화의 효과는 매우 크다.
- [0127] [제 2 실시예]
- [0128] 제 2 실시예에 의한 플레이너 패치 클램프 장치의 요부를 도 6(a)에 나타낸다. 장치의 구성은 기본적으로 도 1과 같지만, 기관(1)의 미세한 관통 구멍(19)의 부근만이 구조가 다르다. 즉, 기관(1)의 관통 구멍(19)에 있어서의 제 1 표면층의 개구부에는 세포체보다 큰 폭과 배양 상태의 세포체의 이동을 저지할 수 있는 깊이를 갖는 오목부(24)가 세포체 배치 영역으로서 형성되어 있다.
- [0129] 배양형의 플레이너형 패치 클램프 장치에 있어서는 세포를 관통 구멍 위에 설치했다고 해도 배양중에 세포가 이동해 버리는 일이 자주 일어나서 밀봉 저항이 변동되거나, 세포가 구멍으로부터 벗어나서 센서 동작 자체가 작용하지 않아 버리는 일이 있다. 본 실시예에서는 세포의 사이즈보다 다소 큰 오목부(24)를 관통 구멍(19)의 개구부에 형성하고, 이 오목부(24)에 세포가 설치되면 배양중에 세포를 이동할 수 없는 구조로 되어 있다. 통상의 세포의 크기는 장경이 10~30 $\mu$ m정도이기 때문에 오목부(24)의 사이즈로서는 세포의 종류에 따라 다르지만, 세포의 장경보다 지름으로 10~30 $\mu$ m정도로 큰 원형이나 직사각형의 평면형상이면 좋다. 오목부의 깊이도 세포의 크기에 의하지만, 통상은 5~12 $\mu$ m정도이면 충분히 목적을 달성할 수 있다. 오목부(24)의 저부에는 세포 고정력을 갖는 세포의 매트릭스 형성 물질(18)을 도포하는 것도 바람직하다.
- [0130] 세포의 매트릭스 형성 물질(18)로서는 신경 세포나 PC12 세포에는 폴리L-리신 또는 폴리D-리신, 라미닌 등이 적합하고, 또한, HEK293 세포에는 콜라겐IV나 피브로넥틴이 적합하다.
- [0131] 상기와 같은 오목부(24)의 패턴 형성에는 기관(1)이 Si나 유리, 세라믹스인 경우는 오목부(24)의 깊이에 상당하는 두께의 포토레지스트를 스피너로 코팅하고, 소정의 포토마스크를 사용해서 노광 현상함으로써 용이하게 형성할 수 있다. 또한, 기관(1)이 플라스틱인 경우는 핫엠보싱 가공이나 사출 성형에 의해 용이하게 형성할 수 있다.
- [0132] 측정 대상인 세포(12)가 신경 세포인 경우에는 원형 또는 직사각형의 오목부(24)에 추가해서 액손이나 수상돌기를 신장할 수 있는 가는 홈을 오목부(24)로부터 연장되는 상태로 형성하는(예를 들면 오목부(24)를 중심으로 해서 방사상으로 복수개의 가는 홈을 연이어 형성하는) 것이 특히 바람직하다. 또한, 신경 세포를 측정 대상으로 하는 경우, 기관(1)에 복수의 오목부(24)를 형성함과 아울러 이들 복수의 오목부(24) 사이를 상기 가는 홈으로서 연결함으로써, 배양중에 신경 세포의 네트워크가 형성되도록 하는 것이 특히 바람직한 경우도 있다.
- [0133] 본 실시예에 있어서는 세포를 오목부(24)에 설치할 때 제 2 표면층의 액저류부(9)에 연통시킨 흡인 튜브(21)를 통해 흡인 펌프(23)에 의해 흡인하고, 제 2 표면층의 액저류부(9)에 음압을 부하할 수 있는 구조를 갖는다. 흡인 튜브(21)의 소정 부분에는 이 음압을 측정하기 위한 음압 측정 압력계(22)가 설치되어 있다. 이 흡인 튜브(21)는 제 1 실시예에서 서술한 배출용 통액로(11)를 겸할 수도 있다. 이러한 흡인 장치를 설치하는 것은 불가



결하지 않지만, 흡인 장치를 설치할 경우에는 흡인에 적합한 음압은 세포의 종류를 고려해서 통상, 0.01기압~0.5기압정도로 한다.

[0134] 상기 가는 흡도 포함해서 오목부(24)를 형성한 예를 도 6(b)에 나타낸다. 이 경우에는 가는 흡의 교점에 지름 30~50 $\mu$ m의 원형의 패턴을 갖는 격자상의 패턴의 니켈 몰드를 이용해서 핫엠보싱에 의해 오목부(24)와 가는 흡을 형성했다.

[0135] 실제로, HEK293 세포를 관통 구멍(19)의 부위에 오도록 흡인 펌프(23)로 흡인하고, 제 2 표면층의 액저류부(9)에 -0.2기압~-0.5기압의 음압을 부하하면서 세포를 파종했다. 이 때, 오목부(24) 이외의 부위에도 세포가 파종되어 있었지만, 이러한 것은 세포배양의 관점에서는 오히려 바람직하다. 이렇게, 오목부(24)를 형성한 본 실시예에 의하면 매우 안정된 이온 채널 전류를 계측할 수 있다. 또한, 오목부(24)는 세포의 이동을 방지하는 것이 목적이므로, 그 형상으로서도 도 6(a)에 나타내는 바와 같은 저면과 측벽부가 직각을 이루는 직사각형의 단면형상으로 한정되지 않고, 단면이 반원형 또는 반타원형인(예를 들면 공기와 같은) 단면형상이어도 좋다.

[0136] 또한, 흡인 펌프(23) 설치의 효과는 세포파종시 이외에도 있다. 즉, 채널 전류 계측시에 흡인하고, 제 2 표면층의 액저류부(9)에 음압을 인가함으로써 세포가 미세한 관통 구멍(19)을 통해서 액저류부(9)쪽으로 인장되는 결과로서 세포막과 세포의 매트릭스(18) 도포 표면의 밀착성이 향상되어 밀봉 저항이 향상된다. 즉, 이온 채널 전류의 계측에 있어서의 잡음을 저감시킬 수 있는 효과가 있다. 이 효과의 향상의 정도는 세포의 크기나 관통 구멍(19)의 위치와 세포의 위치의 상대적 관계에 의해 여러가지로 다르지만, 대략의 음압의 적절한 값은 0.01~0.5기압으로, 이것에 의해 2배~10배의 밀봉 저항의 향상을 달성할 수 있었다.

[0137] [제 3 실시예]

[0138] 상기한 바와 같이 오목부(24)를 구비한 기관(1)을 사용하고, 기관(1)의 제 2 표면층의 액저류부(9)에는 이것에 연통된 액체 음압 인가용의 흡인 기구를 구비하고, 그 밖의 점은 도 1에 나타내는 구성으로 한 배양형 플레이트 패치 클램프 장치를 사용해서 세포의 이온 채널 전류를 계측했다. 기관(1)으로서 도 5에 나타내는 계측에 사용한 것과 같은 실리콘 기관을 사용했다. 세포로서는 (a)채널로드푸신2(Chr2)를 발현한 C2C12 세포와, (b)채널로드푸신 와이드레시바(ChR-WR)를 발현한 HEK293 세포를 사용했다. 이들 이온 채널은 청색의 광에 의해 채널이 열리는 것이 알려져 있다(Chr2:Philipp Schoenenberger et al, Brain Cell Biology 36(2008)119, ChR-WR : Hongxia Wang, et al, J. Biol. Chem., 284(2009) 5685).

[0139] 자극용의 광원으로서 파장 473nm의 레이저를 사용했다. 인가막 전위는 (a), (b) 모두 밑에서부터 -60, -30, -20, -10, 20, 30, 50 및 70mV였다. 조사 레이저 파워는 약 2mW, 레이저광은 지름 약 50 $\mu$ m에 집광했다. 계측의 결과를 도 7에 나타낸 바와 같이, (a), (b) 어느 경우나 본 발명에 의한 전극부의 효과에 의해 밀봉 저항이 10M $\Omega$ 으로 낮음에도 불구하고, 양호한 S/N비로 채널 전류의 계측에 성공하고 있다.

[0140] [제 4 실시예]

[0141] 본 발명의 제 4 실시예를 도 8에 의거해서 설명한다. 도 8(a)는 플레이트 패치 클램프 장치의 정면 단면도이며, 도면의 중앙에 단면을 나타내는 기관 상에는 좌측의 제 1 신경 세포(12a)와 우측의 제 2 신경 세포(12b)가 도시되어 있다. 이들의 신경 세포(12a,12b)는 실제로는 상기 오목부(24) 중에 배치되고, 오목부(24) 사이는 가는 흡을 통해서 연결되어 있지만, 도시의 편의상, 오목부(24)나 가는 흡의 도시를 생략하고 있다. 그리고, 도시생략의 가는 흡을 통해서 제 1 신경 세포(12a)와 제 2 신경 세포(12b)가 축색과 시냅스에 의해 연결되어 있다.

[0142] 본 발명의 AgCl/Ag 안정 전극인 하부 전극(제 2 표면층의 전극)으로부터 전압을 인가하고, 미세한 관통 구멍 상에 설치된 제 1 신경 세포(12a)에 전류를 주입하고, 이것에 의해 신경 세포(12a)에 활동 전위를 발생시킨다. 이 활동 전위는 축색을 전파하고, 시냅스에서의 신경 전달 물질의 방출, 또한 시냅스후 막표면의 수용체 단백질에 의한 신경 전달 물질의 수용에 의한 이온의 유입과, 이것에 의한 인접의 제 2 신경 세포(12b)에서의 활동 전위 발생을 유기한다. 이것에 의해, 인접의 제 2 신경 세포(12b)에의 Ca 이온 유입과, 미리 신경 세포에 도입된 Ca 프 로브의 형광의 펄스상의 발광이라는 일련의 경과가 관찰된다.

[0143] 즉, 본 발명의 장치를 사용해서 제 1 신경 세포(12a)에서 활동 전위를 발생하고, 축색과 시냅스를 경유하고, 인접하는 제 2 신경 세포(12b)에서 이 활동 전위의 전파를 수신한다는 시스템 구성의 응용의 실시예이다.

[0144] 플레이트 패치 클램프 장치의 기관으로서 표면에 지름 2 $\mu$ m의 미세한 관통 구멍을 갖는 폴리메타크릴레이트(PMMA) 기관을 사용했다. 기관 표면을 세포의 매트릭스인 폴리L리신으로 코팅해 두고, 이 표면에 래트 대뇌피질로부터 채취한 신경 세포를 3 $\times 10^2$ 로부터 6 $\times 10^3$ /mm<sup>2</sup>의 밀도로 파종하고, 신경 세포 네트워크를 형성했다. 네

트위크가 형성될 때까지는 기관의 상부 및 하부의 액저류부는 신경 세포의 배지에서 채워두고, Ca 프로브를 신경 세포에 도입하고, 미세한 관통 구멍으로부터 전류주입을 행하는 시점에서 상부 하부 각각 세포의 액, 세포내액의 완충액으로 바꿔 넣었다.

[0145] 본 실시예에 있어서는 도 8(a)에 나타낸 바와 같이 어느 하나의 신경 세포(12a)가 미세한 관통 구멍 상에 배치되어 있는 것이 필요하다. 다른, 예를 들면 도시하는 신경 세포(12b) 등은 미세한 관통 구멍 상에 배치되어 있는 것은 필요하지 않지만, 전류 주입이나 전압 인가를 행하지 않는 한에 있어서 미세한 관통 구멍 상에 배치되어 있어도 상관없다. 본 발명의 기본구성으로부터 용이하게 유추되는 것으로서 신경 세포(12b)도 미세한 관통 구멍 상에 배치되어 있는 구성에 있어서는 여기에 본 발명의 안정 전극을 신경 세포(12a) 측의 액저류부와는 전기적으로 절연한 형태로 신경 세포(12b) 부근의 기관의 상부(제 1 표면측)와 하부(제 2 표면측)에 배치해 두면 신경 세포(12b)에 도달한 활동 전위의 영향으로 이것에 이온 채널 전류가 발생하므로, 이 전류를 Ca 이미징에서 뿐만 아니라, 동시에 신경 세포(12b)의 이온 채널 전류로서 계측하는 것도 용이하게 달성된다.

[0146] 이 신경 세포 네트워크는 형광현미경으로 관측할 수 있게 설정되어 있고, 또한 현미경에 의해 관찰되는 상을 CCD 카메라로 관측할 수 있도록 설정되어 있다. 이 설정에 있어서, 하부측의 전극에 펄스폭이 짧은 전류 펄스 또는 전압 펄스를 인가한다.

[0147] 본 실시예에서는 펄스폭 1mm초과, 700pA의 전류를 하부 전극으로부터 미세한 관통 구멍 상의 신경 세포(12a)에 주입하면 이 신경 세포(12a)에 활동 전위가 발생했다. 신경 세포(12a 및 12b)에는 미리 Ca 이미징용의 Ca 프로브가 도입되어 있다. 본 실시예에서는 오레곤그린 Bapta-1이라는 Ca 프로브용 색소 용액을 소정의 순서로 세포 내에 도입했다. Ca 이미징용의 색소이면 다른 것이라도 같은 효과가 얻어졌다.

[0148] 미세한 관통 구멍 상의 신경 세포(12a)에 활동 전위가 발생하고, 이 세포체에 Ca 이온이 유입되므로 도 8(b)의 상단의 「세포 1」이라고 부기하는 그래프에 나타내는 펄스상의 신호 출력이 CCD 출력으로서 얻어졌다. 또한, 이 활동 전위는 신경 세포(12a)의 축색을 전파하고, 시냅스를 경유해서 인접하는 신경 세포(12b)에 전파하고, 이 세포에 Ca 이온의 유입을 유기했다. 그 결과, 이 신경 세포(12b)의 Ca 프로브의 형광강도가 순간 증대하고, 「세포 1」이라고 부기하는 상단의 그래프의 신호에 동기한 신경 세포(12b)의 신호(「세포 2」이라고 부기하는 하단의 그래프)가 얻어졌다.

[0149] 본 실시예는 본 발명의 신경 세포 네트워크의 하이스루풋 스크리닝 장치에 응용할 수 있는 것을 나타낸다. 축색을 경유하는 신경 세포간의 신호 전파는 신경 세포 네트워크의 기본 특성이므로, 이 기본 특성의 열화 또는 회복 등에 관여하는 약제의 성능 평가를 본 실시예의 시스템에서 달성할 수 있다. 또한 본 발명의 장치자체가 피펫 패치 클램프와 비교해서 매우 소형인 점에서 하이스루풋 장치 구성에 필수적인 다채널화가 용이하다.

[0150] (산업상의 이용 가능성)

[0151] 본 발명에 의해, 인가막 전위의 변동을 억제해서 노이즈 전류를 저감시키고, 세포 이온 채널 전류의 정확한 계측이 가능한 플레이너 패치 클램프 장치가 제공된다.

[0152] 보다 구체적으로는 배양형 플레이너 패치 클램프 장치는 배양을 필요로 하는 신경 세포의 하이스루풋 스크리닝에 적합하다. 최근, 신경 세포 네트워크의 기능 해석이나 하이스루풋 스크리닝의 필요성, 특히 채널 전류 계측에 의한 장치의 필요성이 국제적으로도 높아지고 있지만, 성공예는 보고되어 있지 않다(Jonathan Erickson et al., Journal of Neuroscience Methods, 175,(2008) 1-16 등). 본 발명의 전극부는 신경 세포 네트워크의 기능 해석용 플레이너 패치 클램프 장치나 신경 세포를 사용한 이온 채널 전류를 계측하는 방식의 하이스루풋 스크리닝 장치의 전류 계측용 전극에 사용하면 지금까지 실현이 곤란했던 이들 장치를 실현할 수 있다.

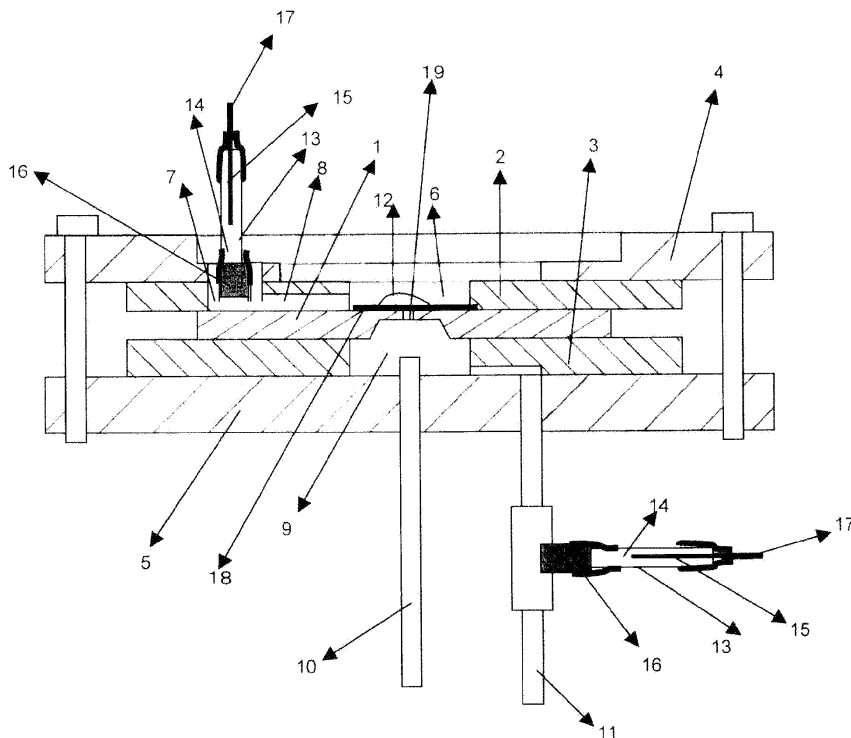
**부호의 설명**

- [0153] 1: 기관
- 2, 3: 스페이서
- 4, 5: 플레이트
- 6: 주액저류부
- 7: 부액저류부
- 8: 통액로

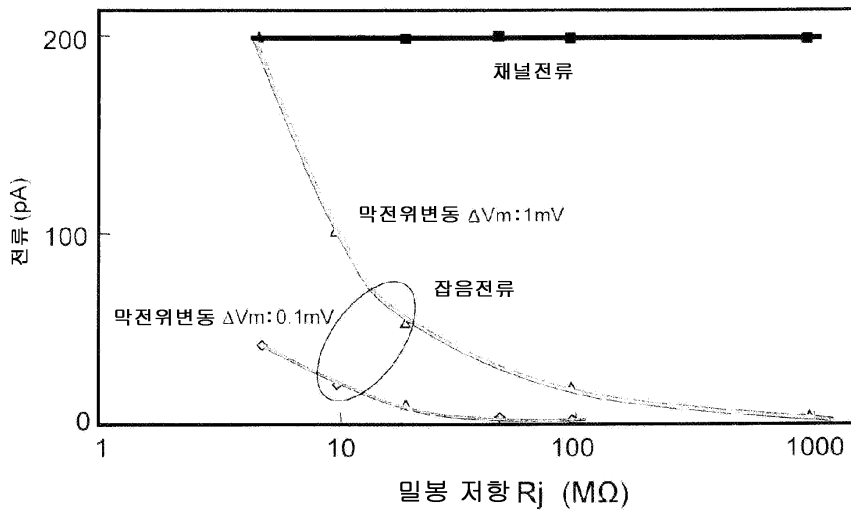
- 9: 액저류부
- 10: 도입용 통액로
- 11: 배출용 통액로
- 12: 세포
- 12a: 제 1 신경 세포
- 12b: 제 2 신경 세포
- 13: 전극 용기
- 14: 전극 용액
- 15: AgCl/Ag 전극
- 16: 무기 다공질 재료
- 17: 전극핀
- 18: 세포외 매트릭스 형성 물질
- 19: 관통 구멍
- 20: 밀봉재료
- 21: 흡인 튜브
- 22: 음압 측정 압력계
- 23: 흡인 펌프
- 24: 오목부

**도면**

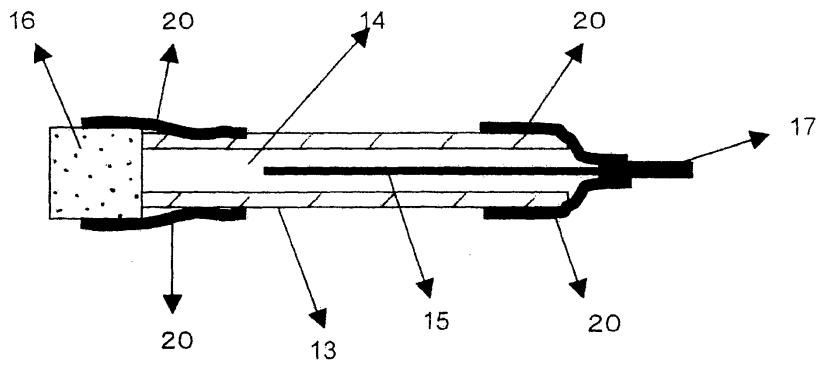
**도면1**



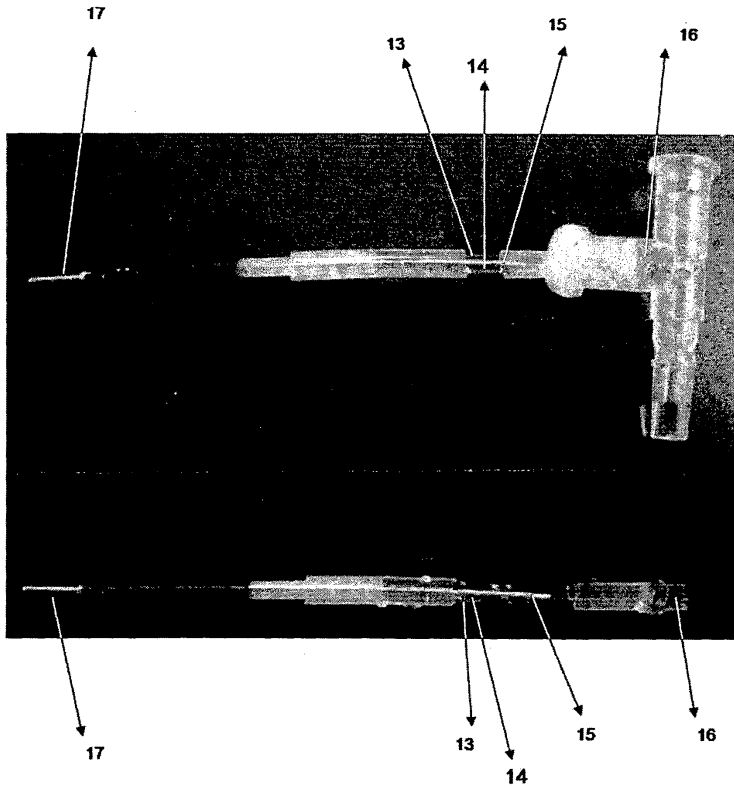
도면2



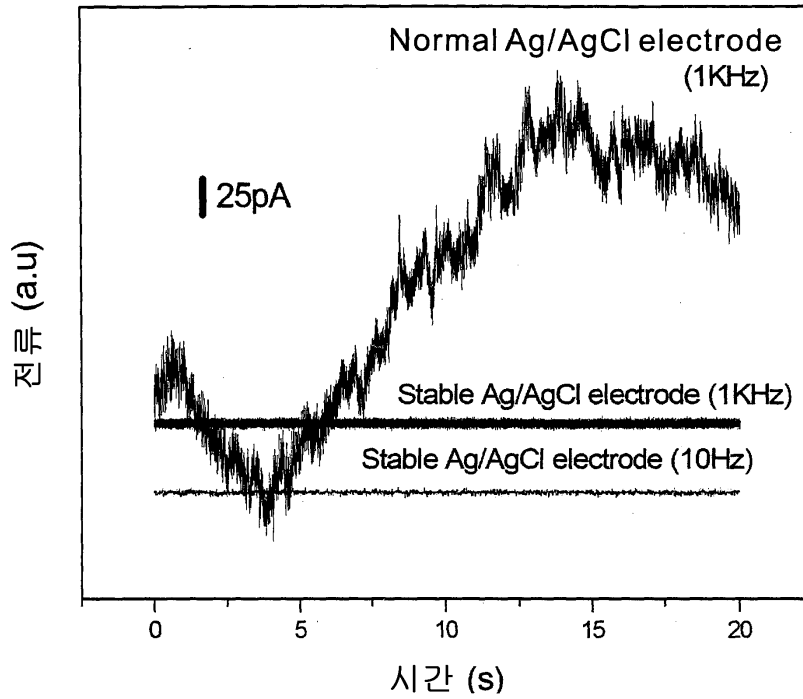
도면3



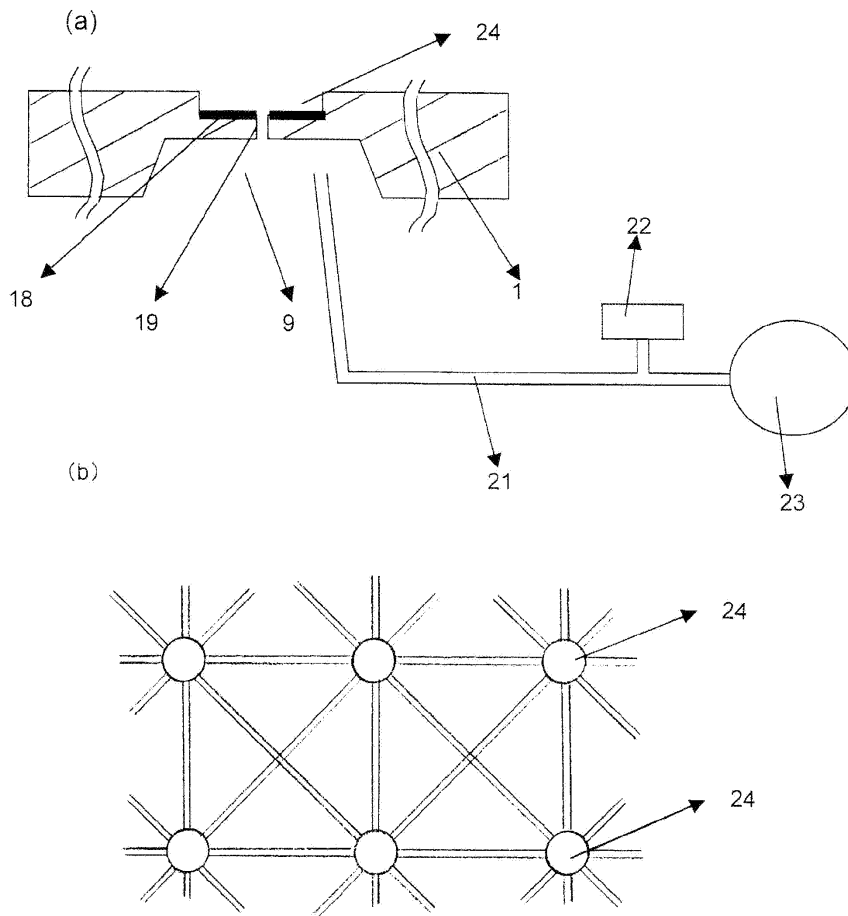
도면4



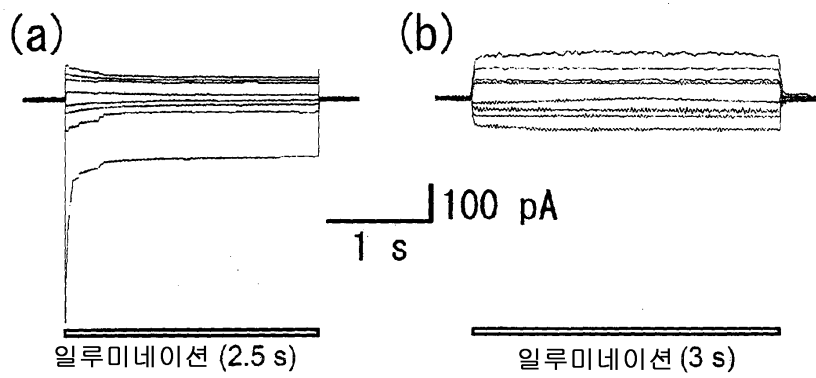
도면5



도면6



도면7





도면8

