



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 104640971 A

(43) 申请公布日 2015. 05. 20

(21) 申请号 201380048253. X

代理人 葛凡

(22) 申请日 2013. 03. 21

(51) Int. Cl.

(30) 优先权数据

*C12M 3/00*(2006. 01)

2012-205561 2012. 09. 19 JP

*C12M 1/34*(2006. 01)

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

*C12N 5/0793*(2006. 01)

2015. 03. 17

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/JP2013/057976 2013. 03. 21

(87) PCT国际申请的公布数据

W02014/045618 JA 2014. 03. 27

(71) 申请人 独立行政法人科学技术振兴机构

地址 日本埼玉县

(72) 发明人 宇理须恒雄 王志宏 宇野秀隆

西藤美穗 长冈靖崇

(74) 专利代理机构 中科专利商标代理有限责任

公司 11021

权利要求书3页 说明书29页 附图13页

(54) 发明名称

神经细胞网络的形成及其利用、以及神经细胞播种器件

(57) 摘要

提供一种神经细胞网络形成用培养装置和其利用手段,所述培养装置能够制约在培养基中处于存活状态的神经细胞的移动并构成神经细胞网络。一种神经细胞网络形成用培养装置,在能够填充细胞培养基的平坦基板上形成由复数个突起部包围成的细胞定着部,且(1)在多个突起部之间设定有宽的间隔,其宽度在使神经细胞的细胞体无法通过的限度内,(2)细胞定着部具有能够容纳1~数个神经细胞的细胞体的内径,(3)在作为细胞定着部的底面的基板面包覆细胞外基质形成物质、和/或具有利用基板面下部侧的抽吸装置抽吸培养基用的微细贯通孔。

1. 一种神经细胞网络形成用培养装置, 其特征在于, 所述装置在能够填充细胞培养基的平坦基板上形成由复数个突起部包围成的细胞定着部, 该细胞定着部具有下述 (1) ~ (3) 的条件,

(1) 在构成细胞定着部的复数个突起部之间设定有宽间隔, 其宽度在使神经细胞的细胞体无法通过的限度内,

(2) 由复数个突起部规定的细胞定着部的内径为能够容纳 1 ~ 数个神经细胞的细胞体的尺寸,

(3) 构成细胞定着部的底面的基板面具有以下的 (i) 及 (ii) 中的至少一个要素,

(i) 包覆有细胞外基质形成物质,

(ii) 设置有微细贯通孔, 所述微细贯通孔为利用设置在所述基板面的下部的抽吸装置抽吸培养基用的微细贯通孔, 具有使神经细胞无法通过的孔径。

2. 根据权利要求 1 所述的神经细胞网络形成用培养装置, 其特征在于, 所述培养装置相当于以下 (1) ~ (3) 中的任一者,

(1) 在所述基板上形成作为选择区域的细胞定着部, 在该细胞定着部配置 1 ~ 数个作为选择细胞的神经细胞, 并且, 其它神经细胞仅仅播种在基板上,

(2) 在所述基板上以适当的相互间隔形成复数个细胞定着部, 在这些细胞定着部配置 1 ~ 数个神经细胞, 并且, 其中的 1 个细胞定着部被用作配置有神经细胞的选择区域,

(3) 按照能够在所述基板上形成复数个或多个相当于上述 (1) 或 (2) 的神经细胞网络的单元的方式, 在适当位置分散地形成有上述细胞定着部的神经细胞网络的高通量解析用培养装置。

3. 根据权利要求 1 或根据权利要求 2 所述的神经细胞网络形成用培养装置, 其特征在于, 所述神经细胞网络形成用培养装置是以神经细胞网络为对象的平面膜片钳装置,

(1) 所述基板为电绝缘性基板, 设置有所述微细贯通孔, 所述微细贯通孔使该电绝缘性基板的构成细胞定着部的底面的基板面的两侧的表面连通, (2) 在微细贯通孔的第一表面侧、即神经细胞网络形成侧和其相反侧、即第二表面侧分别设置有用以保持作为所述细胞培养基的导电性液体的储液部、和按照能够对该储液部的导电性液体通电的方式配置的电极部, (3) 第一表面侧的储液部成为定着在所述细胞定着部的神经细胞用的储液部。

4. 根据权利要求 3 所述的神经细胞网络形成用培养装置, 其特征在于, 所述平面膜片钳装置中, 所述第一表面侧及第二表面侧的电极部具有以下 (a) ~ (c) 的要素,

(a) 电极容器, 所述电极容器的、在所述储液部导入有导电性液体时与该导电性液体接触的容器壁的至少一部分由无机多孔材料构成,

(b) 收纳在上述电极容器内的、在贵金属 Nm 的表层部形成有该贵金属的氯化物 NmCl 层的电极,

(c) 填充在上述电极容器内的、以饱和浓度溶解有所述贵金属的氯化物 NmCl 及碱金属氯化物的电极溶液。

5. 根据权利要求 1 ~ 权利要求 4 中任一项所述的神经细胞网络形成用培养装置, 其特征在于, 所述神经细胞网络形成用培养装置用于以下 (A) ~ (C) 中的任一种目的,

(A) 在神经细胞网络中的神经细胞离子通道电流的计测・解析中使用,

(B) 在至少包含 Ca 成像解析、基于作为突触前部位的标记物的突触泡蛋白或突触蛋白

的标记的成像解析、基于作为树突的标记物的 MAP2 的标记的成像解析及基于对内体、外来体进行标记的 FM1-43 或 FM1-64 的成像解析的成像解析中使用，

(C) 在神经细胞网络的高通量筛选系统中使用。

6. 根据权利要求 5 所述的神经细胞网络形成用培养装置，其特征在于，所述神经细胞网络形成用培养装置用于 (B) 所述的成像解析时，还具有下述 (D) ~ (F) 中的 1 个以上要素，

(D) 在所述基板的上部设置有接受神经细胞所发出的光的受光装置，

(E) 在所述基板的上部设置有对神经细胞或基板表面照射光的照射装置，

(F) 上述 (E) 的照射装置装备有用于仅对规定的单个神经细胞照射光的聚光系统。

7. 一种神经细胞网络形成方法，其特征在于，所述方法使用权利要求 1 ~ 权利要求 6 中任一项所述的神经细胞网络形成用培养装置，基于任意的研究目的而形成培养下的神经细胞网络，所述方法包括：

(1) 在填充有细胞培养基的所述平坦基板上播种神经细胞的工序、

(2) 利用细胞定着部的细胞外基质形成物质、和 / 或通过从细胞定着部的底面的微细贯通孔抽吸液体培养基，对每一个细胞定着部配置 · 定着 1 ~ 数个神经细胞的工序、和

(3) 利用复数个突起部制约着在细胞定着部的神经细胞的移动，并且利用复数个突起部的间隔部分使其相互地识别对方神经细胞的存在，使其形成基于轴突或树突的神经细胞间的突触联系的工序。

8. 根据权利要求 7 所述的神经细胞网络形成方法，其特征在于，在所述神经细胞网络形成方法中，在 (1) 的工序中播种神经细胞时，将神经胶质细胞一起播种在细胞定着部以外的部分。

9. 一种神经细胞播种器件，所述神经细胞播种器件设置在神经细胞网络形成用培养装置或利用了该培养装置的平面膜片钳装置中的能够填充细胞培养基的平坦的装置基板上，用于将神经细胞播种到装置基板中的由复数个突起部包围成的多个细胞定着部，

能够设置在所述装置基板上的板状的器件主体在其设置状态下具有覆盖所述多个细胞定着部的广度，并且其的平坦底面能够与多个细胞定着部中的复数个突起部的顶端接触，

器件主体设有：(1) 用于从外部供给以一定密度悬浊有神经细胞的神经细胞悬浊液的悬浊液供给口；(2) 在器件主体的内部从所述悬浊液供给口呈分枝状延伸设置的多个微细的悬浊液流路；和 (3) 位于所述各悬浊液流路的末端的、开口于器件主体的底面的、用于将神经细胞悬浊液注入所述各细胞定着部的悬浊液注入口。

10. 根据权利要求 9 所述的神经细胞播种器件，其特征在于，所述神经细胞播种器件中，多个所述悬浊液流路被设定为实质上相同的长度，且设计成：在将所述神经细胞播种器件设置在神经细胞网络形成用培养装置或平面膜片钳装置的装置基板上时，各个所述悬浊液注入口的位置准确地对应于各个所述细胞定着部。

11. 根据权利要求 9 或根据权利要求 10 所述的神经细胞播种器件，其特征在于，所述板状的器件主体是使设置有所述悬浊液供给口的上部板和设置有所述悬浊液注入口的下部板以密合状态接合而成的，且上部板和下部板中的至少一个的接合面形成有构成所述悬浊液流路的槽。

12. 根据权利要求 9 ~ 权利要求 11 中任一项所述的神经细胞播种器件, 其特征在于, 所述神经细胞网络形成用培养装置为权利要求 1 所述的神经细胞网络形成用培养装置, 和 / 或所述平面膜片钳装置为权利要求 3 所述的平面膜片钳装置。

13. 根据权利要求 9 ~ 权利要求 12 中任一项所述的神经细胞播种器件, 其特征在于, 所述器件主体还具有第 2 悬浊液流路系统, 所述第 2 悬浊液流路系统用于对所述神经细胞网络形成用培养装置或所述平面膜片钳装置的装置基板中的所述细胞定着部以外的区域注入所述神经细胞悬浊液。

## 神经细胞网络的形成及其利用、以及神经细胞播种器件

### 技术领域

[0001] 本发明涉及神经细胞网络的形成及其利用、以及神经细胞播种器件。更详细而言，本发明涉及在培养下形成借助于神经细胞的轴突和其它神经细胞的树突的突触联系的神经细胞网络 (neural network) 的神经细胞网络形成用培养装置、以及使用该装置形成这类神经细胞网络的方法。进而，本发明涉及使用了这样的神经细胞网络的高通量筛选 (high throughput screening) 技术、平面膜片钳 (planar patch-clamp) 技术、神经细胞成像技术等。

[0002] 进而，本发明涉及用于在神经细胞网络形成用培养装置或利用了该培养装置的平面膜片钳装置中的、多个选择区域 (细胞定着部) 高效地播种神经细胞的神经细胞播种器件。

[0003] 本发明中，“神经细胞”首先包含中枢神经细胞、末梢神经细胞等各种神经细胞。作为神经细胞，优选处于尚未形成轴突、树突的状态的神经细胞。此外，“神经细胞”其次还包括例如 iPS 细胞、ES 细胞之类的能够分化成神经细胞的细胞，更优选包含处于由 iPS 细胞、ES 细胞向神经细胞分化的分化完成途中的、处于神经干细胞等状态的细胞。进而，“神经细胞”还包含具有细胞相互间可形成网络的性质的细胞、及具有能够分化成具有细胞相互间可形成网络的性质的细胞的细胞。

[0004] 此外，“神经细胞的细胞体”是指神经细胞中的除了轴突、树突之类的突出部分以外的细胞主体部分。

[0005] 进而，“选择区域”或“细胞定着部”是指基板上的、成为神经细胞网络形成的中心的或将会成为离子通道电流计测、各种成像中的电流 / 电压施加等的对象的神经细胞被配置的区域，“选择细胞”是指被配置在选择区域 (细胞定着部) 的神经细胞。

### 背景技术

[0006] 此前，出于研究目的或实用目的，提出了如下方案：在培养基 (特别是液体培养基) 中保持神经细胞，在神经细胞存活的状态下在体外构成神经细胞网络。

[0007] 例如，在下述的非专利文献 1 中，如图 2 所示那样，在配置有晶体管的 Si 基板上设置由复数个突起部包围成的区域，在该区域中配置螺类 (stagnalis) 的作为末梢神经细胞集合体的大型神经节 (ganglion)，检测神经细胞的电位变动。在下述的非专利文献 2 中，公开了一种神经芯片，其在基板上形成有复数个如图 3 所示的称为“笼子”的大致圆盘形的围挡 (高度约 9  $\mu\text{m}$ )，在各笼子的中央部的空间配置神经细胞，并且使神经细胞的轴突等通过笼子中设置的几条通道向着相邻的笼子中的神经细胞伸长。

[0008] 现有技术文献

[0009] 非专利文献

[0010] 非专利文献 1:G. Zeck, et al., PNAS 98(2001) 10457-10462

[0011] 非专利文献 2:J. Erickson, et al., J. Neurosci. Methods, 175(2008) 1-16

## 发明内容

[0012] 发明要解决的问题

[0013] 根据本申请发明人的研究,在例如使用哺乳动物的神经细胞形成神经细胞网络时存在以下问题。

[0014] 即,为了构成具有良好的网眼状形态的神经细胞网络,有必要预先使神经细胞定着在规定的选择区域(成为网眼的结点的区域)。但是,在液体培养基中处于存活状态的哺乳动物的神经细胞具有能动性,有随机移动之虞,因此有必要对其移动加以制约。

[0015] 然而,使用例如图1所示的、在基板上设置圆形凹部(深度 $5\mu\text{m}$ )(这些凹部通过用于引导轴突伸长的细槽而联络)并在这些凹部中配置神经细胞的结构,结果获知存在下述问题:其虽然能够制约神经细胞的移动,但凹部中所配置的神经细胞大多在 $2\sim 3$ 天后死亡,无法构成良好的神经细胞网络。

[0016] 对于该问题的产生,推测是由于神经细胞对于培养条件、细胞附近的状况敏感,在形成神经细胞网络时,必须要处于相邻的神经细胞之间能够容易地相互识别对方神经细胞存在这样的状态。在上述试制结构中,各神经细胞被收纳在凹部中,与相邻的神经细胞之间存在基板表面的 $5\mu\text{m}$ 的高度差,彼此均难以确认对方细胞。因此,妨碍了神经细胞网络的形成,产生了神经细胞的死亡率增大、突触形成得不够成熟等不良情况。

[0017] 非专利文献1中,虽然在复数个突起部所包围成的区域中配置了神经组织,但对象为不具有能动的移动性的螺类的巨大神经节。并且复数个突起部的相互间隔优选超过 $50\mu\text{m}$ ,无法完全制约通常的神经细胞的移动。并且,是在富有高度超过 $5\mu\text{m}$ 的凹凸的晶体管基板上构成的。

[0018] 其次,非专利文献2中,各笼子中的神经细胞被包围在相互之间的高度为约 $9\mu\text{m}$ 的称为笼子的凹凸结构中。并且,笼子中虽然设有宽度为 $10\mu\text{m}$ 、高度为 $1\mu\text{m}$ 的轴突伸长用的通道,但笼子中的神经细胞通过这样狭窄的通道彼此识别对方神经细胞还是很困难。因此,非专利文献1、2都没有解决上述问题,也没有教导该问题的解决手段。

[0019] 进而,作为形成以用于高通量筛选为前提的神经细胞网络的方法,如何进行神经细胞的播种也是重要的技术。例如,在形成测定点为100个、测定点的周围具有25个细胞定着部的网络时,必须在短时间内(通常为1小时以内)将规定数量的神经细胞的细胞体播种到总计2500个细胞定着部。

[0020] 但是,非专利文献1、2中,并没有公开用于在多个细胞定着部高效地播种神经细胞的神经细胞播种系统。此外,就使用通常的移液管、有计量功能的移液管、或微量注射器等器具通过手工操作将神经细胞播种到各个细胞定着部的方法而言,首先准确地播种到极微小的细胞定着部是困难的,其次播种效率极低,因此不实用。

[0021] 因此,需要一种能够在短时间内、且几乎同时地将细胞无损伤地播种到多个细胞定着部的神经细胞播种用器件。该器件必须按照不妨碍神经细胞网络向着装置基板上的平面方向形成的方式来构成。

[0022] 因此,本发明想要解决的第一个课题是提供一种能够解决上述问题的神经细胞网络形成用培养装置和神经细胞网络形成方法。进而,想要解决的第二个课题是提供利用这样的神经细胞网络的平面膜片钳装置、高通量筛选技术、神经细胞成像技术等。

[0023] 进而,想要解决的第三个课题是提供一种神经细胞播种器件,其用于高效地将神

经细胞播种到神经细胞网络形成用培养装置或利用了该培养装置的平面膜片钳装置中的多个细胞定着部。

[0024] 用于解决课题的手段

[0025] (第1发明的方案)

[0026] 用于解决上述课题的第1发明的方案为一种神经细胞网络形成用培养装置,所述装置在能够填充细胞培养基的平坦基板上形成由复数个突起部包围成的细胞定着部,该细胞定着部具有下述(1)~(3)的条件。

[0027] (1)在构成细胞定着部的复数个突起部之间设定有宽的间隔,其宽度在使神经细胞的细胞体无法通过的限度内。

[0028] (2)由复数个突起部规定的细胞定着部的内径为能够容纳1~数个神经细胞的细胞体的尺寸。“数个”是指2~10个、更优选为2~6个、进而优选为3~5个。

[0029] (3)构成细胞定着部的底面的基板面具有以下的(i)及(ii)中的至少一个要素。

[0030] (i)包覆有细胞外基质形成物质。

[0031] (ii)设置有微细贯通孔,所述微细贯通孔为利用设置在前述基板面的下部的抽吸装置抽吸培养基用的微细贯通孔,具有使神经细胞无法通过的孔径。

[0032] 需要说明的是,上述第1发明中,“1~数个神经细胞的细胞体”是指1个以上且10个以下、更优选为1个以上且5个以下的神经细胞的细胞体。

[0033] (第2发明的方案)

[0034] 用于解决上述课题的第2发明的方案为一种神经细胞网络形成用培养装置,其中,前述第1发明的培养装置相当于以下(1)~(3)中的任一者。

[0035] (1)在前述基板上形成作为选择区域的细胞定着部,在该细胞定着部配置1~数个作为选择细胞的神经细胞,并且,其它神经细胞仅仅播种在基板上。

[0036] (2)在前述基板上以适当的相互间隔形成复数个细胞定着部,在这些细胞定着部配置1~数个神经细胞,并且,其中的1个细胞定着部被用作配置神经细胞的选择区域。

[0037] (3)按照能够在前述基板上形成复数个或多个相当于上述(1)或(2)的神经细胞网络的单元的方式,在适当位置分散地形成有上述细胞定着部的神经细胞网络的高通量解析用培养装置。

[0038] 对于上述第2发明,基于作为其示意图的图4的(a)及图4的(b)进行说明。图4的(a)示出第2发明的(1)的培养装置中的基板上的要部的平面图,图中央所示的神经细胞11(实际上为1~数个神经细胞)被配置在由复数根(6根)圆柱状的突起部12包围成的细胞定着部13、即选择区域中,其周围的神经细胞11仅仅播种在基板上。并且,由这些神经细胞11形成网络。

[0039] 另一方面,图4的(b)示出第2发明的(2)的培养装置中的基板上的要部的平面图,在基板上以适当的相互间隔形成复数个细胞定着部13,这些细胞定着部13中分别配置有神经细胞11(实际上为1~数个神经细胞),并且,其中的1个细胞定着部13被用作选择区域。并且,由这些神经细胞11形成网络。

[0040] 需要说明的是,在第2发明的(3)的培养装置中,按照成为相互独立的网络的单元的方式,在基板上的适当位置分散地形成复数个或多个如图4的(a)或图4的(b)所示的神经细胞网络的单元。

[0041] (第3发明的方案)

[0042] 用于解决上述课题的第3发明的方案为一种神经网络形成用培养装置,其中,在前述第1发明或第2发明中,神经网络形成用培养装置是以神经网络为对象的平面膜片钳装置,

[0043] (1) 前述基板为电绝缘性基板,设置有前述微细贯通孔,所述微细贯通孔使该电绝缘性基板的构成细胞定着部的底面的基板面的两侧的表面连通,(2) 在微细贯通孔的第一表面侧、即神经网络形成侧和其相反侧、即第二表面侧分别设置有用于保持作为前述细胞培养基的导电性液体的储液部、和按照能够对该储液部的导电性液体通电的方式配置的电极部,(3) 第一表面侧的储液部成为定着在前述细胞定着部的神经网络用的储液部。

[0044] (第4发明的方案)

[0045] 用于解决上述课题的第4发明的方案为一种神经网络形成用培养装置,其中,在前述第3发明的平面膜片钳装置中,前述第一表面侧及第二表面侧的电极部具有以下(a)~(c)的要素。

[0046] (a) 电极容器,所述电极容器的、在前述储液部导入有导电性液体时与该导电性液体接触的容器壁的至少一部分由无机多孔材料构成。

[0047] (b) 收纳在上述电极容器内的、在贵金属Nm的表层部形成有该贵金属的氯化物NmCl层的电极。

[0048] (c) 填充在上述电极容器内的、以饱和浓度溶解有前述贵金属的氯化物NmCl及碱金属氯化物的电极溶液。

[0049] (第5发明的方案)

[0050] 用于解决上述课题的第5发明的方案为一种神经网络形成用培养装置,其中,在前述第1发明~第4发明中的任一项中,神经网络形成用培养装置用于以下(A)~(C)中的任一种目的。

[0051] (A) 在神经网络中的神经细胞离子通道电流的计测·解析中使用。

[0052] (B) 在至少包含Ca成像解析、基于作为突触前部位的标记物的突触泡蛋白或突触蛋白的标记的成像解析、基于作为树突的标记物的MAP2的标记的成像解析及基于对内体、外来体进行标记的FM1-43或FM4-64的成像解析的成像解析中使用。

[0053] (C) 在神经网络的高通量筛选系统中使用。

[0054] (第6发明的方案)

[0055] 用于解决上述课题的第6发明的方案为一种神经网络形成用培养装置,其中,在前述第5发明中,神经网络形成用培养装置为用于(B)所述的成像解析的神经网络形成用培养装置时,还具有下述(D)~(F)中的1个以上要素。

[0056] (D) 在前述基板的上部设置有接受神经细胞所发出的光的受光装置。

[0057] (E) 在前述基板的上部设置有对神经细胞或基板表面照射光的照射装置。

[0058] (F) 上述(E)的照射装置装备有用于仅对规定的单个神经细胞照射光的聚光系统。

[0059] (第7发明的方案)

[0060] 用于解决上述课题的第7发明的方案为一种神经网络形成方法,所述方法使用第1发明~第6发明中任一项所述的神经网络形成用培养装置,基于任意的研究目



的而形成培养下的神经细胞网络,所述方法包括:

[0061] (1) 在填充有细胞培养基的前述平坦基板上播种神经细胞的工序、

[0062] (2) 利用细胞定着部的细胞外基质形成物质、和 / 或通过从细胞定着部的底面的微细贯通孔抽吸液体培养基,对每一个细胞定着部配置·定着 1 ~ 数个神经细胞的工序、和

[0063] (3) 利用复数个突起部制约定着在细胞定着部的神经细胞的移动,并且利用复数个突起部的间隔部分使其相互地识别对方神经细胞的存在,使其形成基于轴突或树突的神经细胞间的突触联系的工序。

[0064] (第 8 发明的方案)

[0065] 用于解决上述课题的第 8 发明的方案为一种神经细胞网络形成方法,其中,在前述第 7 发明的神经细胞网络形成方法中,在 (1) 的工序中播种神经细胞时,将神经胶质细胞一起播种在细胞定着部以外的部分。

[0066] (第 9 发明的方案)

[0067] 用于解决上述课题的第 9 发明的方案为一种神经细胞播种器件,所述神经细胞播种器件设置在神经细胞网络形成用培养装置或利用了该培养装置的平面膜片钳装置中的能够填充细胞培养基的平坦的装置基板上,用于将神经细胞播种到装置基板中的由复数个突起部包围成的多个细胞定着部,

[0068] 能够设置在前述装置基板上的板状的器件主体在其设置状态下具有覆盖前述多个细胞定着部的宽度,并且其的平坦底面能够与多个细胞定着部中的复数个突起部的顶端接触,

[0069] 器件主体设有:(1) 用于从外部供给以一定密度悬浊有神经细胞的神经细胞悬浊液的悬浊液供给口;(2) 在器件主体的内部从前述悬浊液供给口呈分枝状延伸设置的多个微细的悬浊液流路;和 (3) 位于前述各悬浊液流路的末端的、开口于器件主体的底面的、用于将神经细胞悬浊液注入前述各细胞定着部的悬浊液注入口。

[0070] (第 10 发明的方案)

[0071] 用于解决上述课题的第 10 发明的方案为一种神经细胞播种器件,其中,在前述第 9 发明的神经细胞播种器件中,多个前述悬浊液流路被设定为实质上相同的长度,且设计成:在将前述神经细胞播种器件设置在神经细胞网络形成用培养装置或平面膜片钳装置的装置基板上时,各个前述悬浊液注入口的位置准确地对应于各个前述细胞定着部。

[0072] (第 11 发明的方案)

[0073] 用于解决上述课题的第 11 发明的方案为一种神经细胞播种器件,其中,前述第 9 发明或第 10 发明的神经细胞播种器件中的板状的器件主体是使设置有前述悬浊液供给口的上部板和设置有前述悬浊液注入口的下部板以密合状态接合而成的,且上部板和下部板中的至少一个的接合面形成有构成前述悬浊液流路的槽。

[0074] (第 12 发明的方案)

[0075] 用于解决上述课题的第 12 发明的方案为一种神经细胞播种器件,其中,前述第 9 发明~第 11 发明中的任一项的神经细胞播种器件中的神经细胞网络形成用培养装置为第 1 发明所述的神经细胞网络形成用培养装置,和 / 或前述第 9 发明~第 11 发明中的任一项的平面膜片钳装置为第 3 发明所述的平面膜片钳装置。

[0076] (第 13 发明的方案)

[0077] 用于解决上述课题的第 13 发明的方案为一种神经细胞播种器件,其中,前述第 9 发明~第 12 发明中的任一项的神经细胞播种器件中的器件主体还具有第 2 悬浊液流路,所述第 2 悬浊液流路用于对前述神经细胞网络形成用培养装置或前述平面膜片钳装置的装置基板中的前述细胞定着部以外的区域注入前述神经细胞悬浊液。

[0078] 发明的效果

[0079] (第 1 发明的效果)

[0080] 第 1 发明的神经细胞网络形成用培养装置中具有形成在平坦基板上的、由复数个突起部包围成的细胞定着部,因此被配置在其中的神经细胞的随机移动受到多个突起部的制约。因此,神经细胞的随机移动被制约。

[0081] 其中,细胞定着部的内侧和外侧处于同一平坦基板面上,它们之间没有高度差(凹凸)。并且,在细胞定着部中的复数个突起部之间设定有宽的间隔,其宽度在使神经细胞的细胞体无法通过的限度内,该间隔部分为上方开放的空间,而不是如前述非专利文献 2 公开那样的狭窄通道空间。因此,配置在细胞定着部的神经细胞可以容易地相互识别将会形成网络的对方神经细胞,可以构成基于利用了突起部间的间隔而形成轴突和树突的突触联系的良好神经细胞网络。

[0082] 进而,由复数个突起部规定的细胞定着部的内径为能够容纳 1~数个神经细胞的细胞体的尺寸,因此在细胞定着部配置、定着 1~数个神经细胞的细胞体。通常,神经细胞(特别是 iPS 细胞等)在为数个细胞左右的集合体(团簇)的状态时能够长期、稳定地生存。相反地,在细胞定着部配置有单个神经细胞时,神经细胞间的信号传递变得简单,网络功能的解析变得容易。第 1 发明中,由于在细胞定着部配置、定着 1~数个神经细胞的细胞体,因此能够以良好的平衡性满足上述两种要求。

[0083] 在使用第 1 发明的神经细胞网络形成用培养装置时,能够在 4 周以上的较长时间使神经细胞生存、维持活性的神经细胞网络。

[0084] 进而,第 1 发明中,在构成细胞定着部的底面的基板面包覆对神经细胞显示出黏附力的细胞外基质、和/或设置微细贯通孔(所述微细贯通孔为利用设置在基板的下部的抽吸装置抽吸细胞培养基用的微细贯通孔,具有使神经细胞无法通过的孔径)。因此,在播种神经细胞时,1~数个神经细胞的细胞体被可靠地配置且定着在网眼状的神经细胞网络中的成为网眼的结点的细胞定着部。从以上的观点出发,第 1 发明可以解决前述本发明的课题。

[0085] (第 2 发明的效果)

[0086] 根据第 2 发明,提供一种神经细胞网络形成用培养装置,所述神经细胞网络形成用培养装置用于形成如图 4 的 (a) 所示的神经细胞网络、和如图 4 的 (b) 所示的神经细胞网络,进而,还可以在基板上形成复数个或多个上述的神经细胞网络的单元。因此,还提供一种神经细胞网络的高通量解析用培养装置。

[0087] (第 3 发明的效果)

[0088] 平面膜片钳装置为如下装置,即在硅芯片之类的电绝缘性的固体基板上构成复数个膜片钳装置从而能够进行多点计测,在各膜片钳装置的细胞配置部位分别设置用于计测离子通道电流的微细的贯通孔。在第 3 发明的平面膜片钳装置中,前述第 1 发明中的 (3) 的 (ii) 所规定的“利用设置在基板的下部的抽吸装置抽吸培养基用的微细贯通孔”被用作

离子通道电流计测用的微细的贯通孔。

[0089] 此外,当在第二表面侧的细胞培养基中混合具有引诱神经细胞效果的腺苷 5 -  $\beta$  硫代二磷酸、尿苷 5 - 三磷酸三钠盐合物、EGF 等物质、从而将神经细胞引诱至第二表面侧的细胞培养基时,由于神经细胞被诱导至微细贯通孔,因此可以使神经细胞在培养期内更可靠地停留在微细贯通孔上。

[0090] 此前的平面膜片钳装置不具有细胞培养功能,因此存在无法用于神经细胞之类的有培养必要的细胞的问题。即,作为测定对象的细胞的寿命在非培养条件下短至 1 小时或 30 分钟以下,因此仅能够用于创新药物筛选等有限的用途,但是难以用于利用移液管膜片钳的细胞功能解析等用途中。进而,顺利地将细胞运输、捕捉到设置在基板中的微细的贯通孔部位也是困难的。

[0091] 但是,根据第 3 发明可以提供一种平面膜片钳装置,通过将第 1 发明或第 2 发明的神经细胞网络形成用培养装置用作以神经细胞网络为对象的平面膜片钳装置,从而以有培养必要的神经细胞的神经细胞网络为对象、且显著延长了作为测定对象的神经细胞的寿命。并且,若利用第 2 发明的 (3) 所规定的神经细胞网络形成用培养装置,还可以对神经细胞网络进行高通量的筛选。

[0092] (第 4 发明的效果)

[0093] 然而,关于上述第 3 发明这样的平面膜片钳装置,还存在下述课题。

[0094] 即,在如前述第 1 发明中的 (3) 的 (i) 那样、在对离子通道电流进行计测的微细贯通孔的周缘(细胞定着部)附着有细胞外基质形成物质时,在神经细胞的细胞膜和微细贯通孔周缘的基板表面之间形成少许间隙,导致所谓的薄膜电阻(シール抵抗)下降。流过该间隙的电流以漏电流的形式叠加于离子通道电流,产生这样的变动时会助长噪声。因此在薄膜电阻下降的状态下,相对于少许的施加膜电位的变动,噪声电流也变大,从而难以准确地计测离子通道电流。

[0095] 为了谋求细胞的离子通道电流的准确计测,在上述的平面膜片钳装置的薄膜电阻低时实施噪声电流对策当然是有效且重要的,即使是薄膜电阻不低时,实施噪声电流对策也是有效且重要的。作为噪声电流对策,除了增大薄膜电阻以外,抑制电极侧的施加膜电位的变动也是有效的。

[0096] 并且,使用在贵金属 Nm(例如银 Ag)的表层部形成有该贵金属的氯化物 NmCl 层(例如 AgCl 层)的电极作为平面膜片钳装置的电极时,上述那样的施加膜电位的变动主要产生自 AgCl/Ag 电极的表面与包围该电极的溶液之间的界面电位的变动、液-液界面电位的变动。

[0097] 因此,如第 4 发明那样,在电极部的电极容器内,将 AgCl/Ag 电极浸渍在作为 AgCl 及碱金属氯化物(例如 KCl)的饱和溶液的电极溶液(KCl 浓度为几百几十毫摩尔左右)中,若预先介由无机多孔材料构成的容器壁使它们与细胞培养液之类的导电性液体(KCl 浓度为数毫摩尔左右)接触,则电极容器的内部和外部为电导通的状态。但是,由于液体本身无法过多地通过无机多孔材料的细孔,因此电极容器内部的电极溶液和电极容器外部的导电性液体的混合少,为可以无视的程度。其结果是,电极容器的内部和外部中的 KCl 的较大浓度差保持恒定,AgCl/Ag 电极的界面电位、液-液界面电位恒定,不会引起施加膜电位的变动。

[0098] (第5发明的效果)

[0099] 根据第5发明,可以将第1发明~第4发明的神经网络形成用培养装置用于(A)神经网络中的神经细胞离子通道电流的计测·解析、(B)至少包含Ca成像解析、基于作为突触前部位的标记物的突触泡蛋白或突触蛋白的标记的成像解析、基于作为树突的标记物的MAP2的标记的成像解析及基于对内体、外来体进行标记的FM1-43或FM4-64的成像解析的成像解析、(C)神经网络的高通量筛选系统中的任一用途中。

[0100] (第6发明的效果)

[0101] 根据第6发明,在前述第5发明的神经网络形成用培养装置用于(C)所述的成像解析中时还具有上述(D)的受光装置、(E)的照射装置、(F)的聚光系统中的1个以上要素,因此获得如下效果:首先由于大多情况下能够非接触且非破坏地进行计测,因此能够不妨碍神经网络功能地进行解析;其次由于为光计测,因此能够高速地进行解析;第3,即使在细胞定着部配置有复数个神经细胞(细胞团簇),也可以利用(F)的聚光系统准确地激发单个神经细胞并精密地进行解析。

[0102] (第7发明的效果)

[0103] 根据第7发明的神经网络形成方法,使用第1发明~第6发明中任一项所述的神经网络形成用培养装置,进行前述(1)~(3)的工序。

[0104] 因此,在将神经细胞播种到填充有细胞培养基的平坦基板上时,利用各细胞定着部的细胞外基质形成物质或通过从细胞定着部的底面的微细贯通孔抽吸细胞培养基,可以在该细胞定着部可靠地配置、定着1~数个神经细胞的细胞体。更具体而言,可以将细胞体配置、定着到细胞定着部的微细贯通孔上。

[0105] 此外,此时,各细胞定着部的内径与能够容纳1~数个神经细胞的细胞体的尺寸大致对应,因此在各细胞定着部可靠地配置1~数个神经细胞。并且,由于构成细胞定着部的复数个突起部,这些神经细胞的随机移动受到制约。并且,细胞定着部的内侧和外侧处于同一平坦基板面上,它们之间没有高度差(凹凸),因此配置在细胞定着部的神经细胞通过构成细胞定着部的复数个突起部的间隔而可以容易地相互识别将会形成网络的对方神经细胞。因此,神经细胞可以维持有活性的生存状态,并构成基于利用了突起部间的间隔而形成轴突和树突的突触联系的良好神经网络。

[0106] 从以上观点出发,根据第7发明,可以在配置·定着于各细胞定着部的1个神经细胞或数个神经细胞团簇的相互间良好地形成神经网络。在利用该方法时,神经细胞可以以大致100%的概率形成稳定的网络,并持续培养4周以上的长时间。因此,对于神经网络的高通量筛选元件的制作而言是极为有用的技术。

[0107] (第8发明的效果)

[0108] 根据第8发明,在上述第7发明的(1)的工序中播种神经细胞时,将神经细胞播种在选择区域内和选择区域外,并且将神经胶质细胞播种在选择区域外。由此如根据“F. W. Pfrieger et al., Science 277(1997)1684-1687”等文献所知那样,由于神经胶质细胞存在于突触的附近并且与神经细胞接触,因此神经网络成熟度提高,可以构成时间空间上功能更均匀的神经网络。

[0109] (第9发明的效果)

[0110] 根据第9发明,提供一种神经细胞播种器件,所述神经细胞播种器件用于高效地

将神经细胞播种到神经细胞网络形成用培养装置或利用了该培养装置的平面膜片钳装置中的多个细胞定着部。由此,提供了下述重要课题的解决手段,所述课题为:在形成以用于高通量筛选为前提的神经细胞网络时,如何播种神经细胞。

[0111] 该器件的板状的器件主体设有:(1)用于从外部供给神经细胞悬浊液的悬浊液供给口;(2)从该悬浊液供给口呈分枝状延伸设置的多个微细的悬浊液流路;和(3)位于各悬浊液流路的末端的、开口于器件主体的底面的悬浊液注入口。因此,即使装置基板上所设置的细胞定着部极多(例如数百个),也能够将神经细胞悬浊液在短时间内供给至全部的这些细胞定着部。

[0112] 需要说明的是,神经细胞悬浊液向悬浊液供给口的供给方法没有特别限定,若考虑到多个微细的悬浊液流路中的流体摩擦阻力,则优选利用可以将液体压入悬浊液供给口的器具、装置(例如,注射器、微量注射器、或小的泵式压入装置等)在加压状态下供给神经细胞悬浊液。此时,液体压入用的器具、装置的注口的尺寸通常大于悬浊液供给口的内径,这种情况下,可以将前端侧进行了减径的连接用管线安装到液体压入器具/装置的注口,将其进行了减径的前端侧插入悬浊液供给口。作为连接用管线的前端侧的进行了减径的部分,例如,可以安装不锈钢制的小喷嘴状的管体。

[0113] 被注入细胞定着部的神经细胞从细胞定着部的流出受到细胞定着部的复数个突起部的阻止,而停留在细胞定着部内。另一方面,悬浊介质液从细胞定着部的多复数个突起部之间流出。因此获得了神经细胞以应激小、无损伤的状态被播种至细胞定着部的结果。并且,这样的神经细胞的播种是一起进行的,因此对于装置基板上的多个细胞定着部播种神经细胞是几乎同时、且在非常短的时间内(数十秒左右)完成的。

[0114] 进而,重要的是,该神经细胞播种器件设置在神经细胞网络形成用培养装置或平面膜片钳装置中的、能够填充细胞培养基的平坦的装置基板上。因此,是从细胞定着部的上方注入神经细胞悬浊液的结构。由此,不会妨碍沿着装置基板上的平面方向的神经细胞网络的形成。

[0115] 需要说明的是,虽然也能够将神经细胞播种器件固定设置在神经细胞网络形成用培养装置或平面膜片钳装置的装置基板上,但将神经细胞播种器件按照可拆卸的方式设置时,若在神经细胞播种后将其拆下,则在播种后的神经细胞的培养中不会妨碍氧、二氧化碳的供给,并且也不妨碍从上部观测网络、以及药液的施予。

[0116] (第10发明的效果)

[0117] 根据第10发明,多个前述悬浊液流路被设定为实质上相同的长度,因此能够准确且同时地完成神经细胞在装置基板上的多个细胞定着部中的播种。换言之,这种效果为:若在调节神经细胞悬浊液中的神经细胞的分散密度的基础上,对由悬浊液供给口供给的神经细胞悬浊液的液量进行控制,则可以大致准确地控制神经细胞悬浊液向各个细胞定着部的注入量(甚至播种的神经细胞的个数),并且,还意味着可以将播种在多个细胞定着部的神经细胞的个数控制得大致均匀。这些效果在形成以高通量筛选用途为前提的神经细胞网络时可以称之为重要的效果。

[0118] 此外,设计成在将前述神经细胞播种器件设置在神经细胞网络形成用培养装置或平面膜片钳装置的装置基板上时,各个悬浊液注入口的位置准确地对应于各个细胞定着部,因此能够准确地进行神经细胞在多个细胞定着部中的播种。需要说明的是,关于该点,

在将神经细胞播种器件设置在神经细胞网络形成用培养装置或平面膜片钳装置的装置基板上时的、使两者的位置对齐用的标识记号,可以设置在装置基板和器件主体中的至少一者,在器件主体由透明度高的材料形成时,由于可以透视这样的标识记号而特别有效。

[0119] (第 11 发明的效果)

[0120] 根据第 11 发明,板状的器件主体是使设置有悬浊液供给口的上部板和设置有悬浊液注入口的下部板接合而成的,两板中的至少一个的接合面形成有构成悬浊液流路的槽,因此,在器件主体的内部加工出微细且屈曲形态的多个构成悬浊液流路的操作更为容易。但是,用于构成悬浊液流路的槽的加工方法并非仅限于此。

[0121] (第 12 发明的效果)

[0122] 根据第 12 发明,提供神经细胞网络形成用培养装置为第 1 发明所述装置、和 / 或平面膜片钳装置为第 3 发明所述神经细胞播种器件这样的具体且优选的实施方式。

[0123] (第 13 发明的效果)

[0124] 在将神经细胞仅播种在神经细胞网络形成用培养装置、平面膜片钳装置的装置基板中的细胞定着部的情况下,装置基板中的神经细胞的总体的固体数不足,因此大多不能良好地形成神经细胞网络。为了解决该问题,根据第 13 发明,器件主体还具有第 2 悬浊液流路,所述第 2 悬浊液流路用于对装置基板中的前述细胞定着部以外的区域注入神经细胞悬浊液。因此,可以对装置基板中的细胞定着部以外的区域也适当注入神经细胞悬浊液、播种神经细胞,因此可以特别良好地形成神经细胞网络。

## 附图说明

[0125] 图 1 示出本申请发明人所试制的位于基板上的凹部结构(比较例)。

[0126] 图 2 示出非专利文献 1 公开的 Si 基板上的结构。

[0127] 图 3 示出非专利文献 2 公开的笼子的结构。

[0128] 图 4 示出第 2 发明的(1)、(2)的神经细胞网络形成用培养装置的要部的示意性平面图。

[0129] 图 5 示出第 1 实施例的剖面图。

[0130] 图 6 示出第 2 实施例的概要。

[0131] 图 7 示出第 3 实施例的概要。

[0132] 图 8 示出第 4 实施例的概要。

[0133] 图 9 示出第 5 实施例的概要。

[0134] 图 10 示出第 6 实施例的概要。

[0135] 图 11 示出第 7 实施例中的神经细胞播种器件主体的概要。

[0136] 图 12 示出第 7 实施例中的第 1、第 2 悬浊液流路系统的概要。

[0137] 图 13 示出第 7 实施例中的第 1 悬浊液流路系统的要部细节。

[0138] 图 14 示出大鼠海马神经细胞的播种时的尺寸。

[0139] 图 15 示出大鼠海马神经细胞的培养时的尺寸。

[0140] 图 16 为表示用大鼠海马神经细胞进行的其它实验的光学显微镜照片。

[0141] 符号说明

[0142] 1 基板

[0143]	2	细胞定着部
[0144]	3	神经细胞
[0145]	4	微细贯通孔
[0146]	5	电流增幅器
[0147]	6	微量移液管
[0148]	7	上部电极
[0149]	8	下部电极
[0150]	9	细胞外基质形成物质
[0151]	11	神经细胞
[0152]	12	突起部
[0153]	13	细胞定着部
[0154]	14	基板
[0155]	15	微细贯通孔
[0156]	16	间隔件
[0157]	17	间隔件
[0158]	18	培养空间
[0159]	19	缺口部
[0160]	20	平板
[0161]	21	平板
[0162]	22	主储液
[0163]	23	储液部
[0164]	24	液体通路
[0165]	25	副储液
[0166]	26	导入用液体通路
[0167]	27	排出用液体通路
[0168]	28	电极部
[0169]	29	电极部
[0170]	30	细胞外基质形成物质
[0171]	31	电极容器
[0172]	32	电极溶液
[0173]	33	AgCl/Ag 电极
[0174]	34	无机多孔材料
[0175]	35	电极销
[0176]	36	外侧细胞定着部
[0177]	40	器件主体
[0178]	41	上部板
[0179]	42	下部板
[0180]	43	悬浊液供给口
[0181]	43a	第 2 悬浊液供给口

[0182]	44	悬浊液流路
[0183]	44a	第 2 悬浊液流路
[0184]	45	悬浊液注入口
[0185]	45a	第 2 悬浊液注入口
[0186]	46	注入口设定部

## 具体实施方式

[0187] 以下对包括最优选方式在内的本发明的实施方式进行说明。本发明的技术范围不受这些实施方式限定。

[0188] (本发明的技术领域)

[0189] 本发明的技术领域涉及在使神经细胞稳定的状态下对其进行培养并使其形成神经细胞网络的技术领域。此外,属于对细胞表面的离子通道电流进行计测的技术领域。进而,涉及对细胞进行电流注入或电压施加而对其给予刺激的领域。进而,还属于对离子通道电流进行计测、或者对细胞注入电流或施加电压从而对其给予刺激的类型的高通量筛选技术领域。进而,还属于以神经细胞或神经细胞网络为对象的 Ca 成像等各种成像技术领域。

[0190] (神经细胞、神经细胞网络)

[0191] 神经细胞包含作为细胞主体的细胞体和由该细胞体伸出的轴突及树突。对神经细胞的种类没有限定,首先可以例示出中枢神经细胞、末梢神经细胞等各种神经细胞,特别优选处于尚未形成轴突、树突的状态的神经细胞。此外,其次可以例示出例如 iPS 细胞、ES 细胞之类的能够分化成神经细胞的细胞,更优选处于由 iPS 细胞、ES 细胞向神经细胞分化的分化完成途中的处于神经干细胞等状态的细胞。进而,还可以例示出具有细胞相互间可形成网络的性质的细胞、及具有能够分化成具有细胞相互间可形成网络的性质的细胞的细胞。作为神经细胞,优选动物的神经细胞、特别优选包括人在内的哺乳动物的神经细胞。这些神经细胞中的细胞体的尺寸通常小于 20  $\mu\text{m}$ ,更具体而言为 3 ~ 18  $\mu\text{m}$  左右。

[0192] 神经细胞网络中,发送信号的触发细胞和接受信号的跟随细胞(フォロー一細胞)这一对神经细胞为结构上的基本单位。本申请发明人发现,在触发细胞和跟随细胞所处平面的高度方面存在有细胞大小程度的高度差时,细胞的死亡概率增大。

[0193] (神经细胞网络形成用培养装置)

[0194] 本发明的神经细胞网络形成用培养装置,在能够填充细胞培养基(特别优选为液体培养基)的平坦基板上形成有由复数个突起部包围成的细胞定着部。

[0195] “能够填充细胞培养基的平坦基板”为例如对后述平面膜片钳装置进行说明时那样的构成。细胞定着部根据前述第 2 发明的(1)~(3)的构成在基板上设定复数个或多个。但是,由于在神经细胞网络中触发细胞和跟随细胞这一对神经细胞为基本单位,因此在为以神经细胞的自然点火为触发、通过跟随细胞接受离子通道电流的构成时,作为选择区域的细胞定着部即使为一处也能够作为功能解析元件进行动作。作为选择区域的细胞定着部的相互间隔根据神经细胞网络的种类而不同,不能一概而论,例如,可以设为 50 ~ 500  $\mu\text{m}$  左右。

[0196] 构成细胞定着部的复数个突起部的形状没有限定,优选为例如栅状或桩状(日语:杭状)的突起。突起部的高度也没有限定,通常,优选为可以有效制约神经细胞的随机



移动的  $10\ \mu\text{m}$  左右的高度,例如在小鼠大脑皮质、海马神经细胞的情况下优选为  $5\sim 10\ \mu\text{m}$  左右的高度。

[0197] 其次,上述细胞定着部具有下述的(1)~(3)的条件。

[0198] (1) 在构成细胞定着部的复数个突起部之间设定有宽的间隔,其宽度在使神经细胞的细胞体无法通过的限度内。突起部的间隔根据哺乳动物神经细胞的细胞体的大小(所述细胞体的大小具有  $3\sim 18\ \mu\text{m}$  左右的偏差)来决定,难以一概地限定为绝对的值。作为基准之一,在将细胞体的大小设为  $X\ \mu\text{m}$  时,间隔的上限值优选为  $0.9X\ \mu\text{m}$  以下、特别优选为  $0.7X\ \mu\text{m}$  以下,间隔的下限值优选为  $0.3X\ \mu\text{m}$  以上、特别优选为  $0.5X\ \mu\text{m}$  以上。在复数个突起部的上端部相互连结时,实质上形成了通道结构,固不优选。此外,在通道结构中,即使在通道内能够形成突触,也不能进行利用该突触的成像观察。

[0199] (2) 由复数个突起部形成的细胞定着部的内径为可以容纳 1~数个神经细胞的细胞体的尺寸。细胞定着部的内径根据神经细胞的细胞体的大小、及细胞定着部中的细胞体的个数而适当设定。例如,在细胞定着部中的细胞体为哺乳动物神经细胞的细胞体、其个数为 1 个时,细胞定着部的内径优选为  $10\sim 25\ \mu\text{m}$  左右。当细胞定着部的内径与细胞体的尺寸相比过大时,有在一个选择区域中配置太多细胞体之虞,当细胞定着部的内径与细胞体的大小相比小 50% 以上时,有细胞体无法稳定地配置在细胞定着部之虞。

[0200] (3) 构成细胞定着部的底面的基板面具有以下的(i)及(ii)中的至少一个要素。

[0201] (i) 包覆有细胞外基质形成物质。

[0202] (ii) 设置有微细贯通孔,所述微细贯通孔为利用设置在前述基板面的下部的抽吸装置抽吸培养基用的微细贯通孔,具有使神经细胞无法通过的孔径。

[0203] 这样的(3)的条件中,(i)的细胞外基质形成物质为通过对神经细胞显示黏附力而将神经细胞定着到细胞定着部的底面的物质,作为其构成材料,可以例示出聚赖氨酸、胶原(I型、II型、IV型)、纤连蛋白、层粘连蛋白、蛋白聚糖(多功能蛋白聚糖(versican)、核心蛋白聚糖等)、蛋白聚糖(聚集蛋白聚糖)、连接蛋白、巢蛋白、腱生蛋白、蛋白聚糖(硫酸软骨素蛋白聚糖、硫酸乙酰肝素蛋白聚糖(基底膜聚糖等)、硫酸角质素蛋白聚糖、硫酸皮肤素蛋白聚糖)、透明质酸(糖胺聚糖的一种)、弹性蛋白、血纤蛋白、明胶、基质胶(matrigel)等。

[0204] (ii)的抽吸细胞培养基用的微细贯通孔,用于通过基板下部侧的抽吸装置抽吸细胞培养基从而使配置在细胞定着部的 1~数个神经细胞定着在细胞定着部的底面,其孔径可以设为使神经细胞无法通过的程度,例如  $1\sim 3\ \mu\text{m}$  左右。

[0205] (平面膜片钳装置)

[0206] 神经细胞网络形成用培养装置的有效利用例之一是以神经细胞网络为对象的平面膜片钳装置。

[0207] (一般的平面膜片钳装置)

[0208] 构成生命体的细胞的表面存在有各种膜蛋白,在细胞表面的特定位置点上发生化学物质(配体等信号传递物质)的结合、电或光的刺激(栅极触发)时,膜蛋白的作为开口部的通道开或关,控制细胞膜的外侧和内侧之间的离子、化学物质的输送。进行该控制的离子通道为对生物系统的信号传递而言重要的膜蛋白,在其功能的计测、功能相关药品的开发中,需要对通道蛋白的电气变化、即离子通道电流进行计测。

[0209] 对于该需求,迄今为止开发出移液管膜片钳、平面膜片钳等技术。移液管膜片钳具有无法用于基于多点计测的高通量筛选的弱点。与此相对,平面膜片钳为在硅芯片之类的固体基板上构成复数个膜片钳装置、能够对细胞离子通道电流进行多点计测的平面基板型的膜片钳装置,在各膜片钳装置的细胞配置部位分别设置有用对离子通道电流进行计测的微细的贯通孔。

[0210] 但是,此前的一般的平面膜片钳装置不具有细胞培养功能,因此存在无法用于神经细胞之类的有培养必要的细胞的问题。即,作为测定对象的细胞的寿命在非培养条件下短至 1 小时或 30 分钟以下,因此仅能够用于创新药物筛选等有限的用途,但是难以用于利用移液管膜片钳的细胞功能解析等用途中。进而,顺利地将细胞运输、捕捉至设置在基板中的微细的贯通孔部位也是困难的。

[0211] (本发明的平面膜片钳装置)

[0212] 与此相对,本发明的平面膜片钳装置与上述的一般构成的平面膜片钳装置相比,还具有神经细胞培养功能,是能够有效抑制离子通道电流计测时的噪音电流和稳定进行细胞的位置确定的装置。即,该装置的特征性构成在于,在基板所设置的微细的贯通孔中的神经细胞定着用开口部赋予细胞固定力、且在基板中的贯通孔的两侧的表面部设置能够对电极通电的储液部,在该储液部能够填充导电性液体(例如细胞培养液)。根据该平面膜片钳装置,可以容易地将神经细胞捕捉至微细贯通孔的位置,并且,可以在细胞培养条件下在充分的时间内实施离子通道活性的测定。

[0213] 具体而言,本发明的平面膜片钳装置中,前述神经细胞网络形成用培养装置按照以下的(1)~(3)的方式来构成。

[0214] (1) 前述基板为电绝缘性基板,设置有前述微细贯通孔,所述微细贯通孔使该电绝缘性基板的两侧的表面连通。

[0215] (2) 在微细贯通孔的第一表面侧、即神经细胞网络形成侧和其相反侧、即第二表面侧分别设置有用保持导电性液体的储液部、和按照能够对该储液部的导电性液体通电的方式配置的电极部。

[0216] (3) 第一表面侧的储液部成为定着在前述细胞定着部的神经细胞用的储液部。

[0217] (本发明的平面膜片钳装置中的主要构成)

[0218] 因此,本发明的平面膜片钳装置中设置有微细的贯通孔,所述微细的贯通孔使该电绝缘性基板两侧的表面、即第一表面侧(配置细胞的表面侧)和第二表面侧连通。

[0219] 作为电绝缘性基板,可以优选使用玻璃制、陶瓷制、塑料制等的基板。作为一例,在使用硅基板时,优选为具有由第一表面侧的硅层、中间的氧化硅层和第二表面侧的硅层依次层叠而成的结构的硅基板(SOI 基板)。在这样的层叠结构的硅基板中,绝缘性极高的中间层存在于二个硅层之间,因此在测定对象细胞的离子通道关闭时可以建立高阻抗状态,可以减少背景噪声。

[0220] 基板中的贯通孔的个数没有限定,优选为复数个~多个,例如设为 2 个~数十个、或更多。微细的贯通孔的内径优选为可以使液体通过但使神经细胞无法通过的程度的内径(例如 1~3  $\mu\text{m}$  左右),但并非限于这些内径。

[0221] 此外,在平面膜片钳装置中,前述贯通孔的第一表面侧和第二表面侧分别设有用于保持导电性液体的储液部和按照能够对该储液部的导电性液体通电的方式配置的电极