



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 105555945 A

(43) 申请公布日 2016. 05. 04

(21) 申请号 201480048002. 6

长冈靖崇 小林启

(22) 申请日 2014. 08. 29

(74) 专利代理机构 中科专利商标代理有限责任
公司 11021

(30) 优先权数据

2013-180684 2013. 08. 30 JP

代理人 刘文海

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2016. 02. 29

(51) Int. Cl.

C12M 1/42(2006. 01)

C12Q 1/02(2006. 01)

G01N 21/78(2006. 01)

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/JP2014/072808 2014. 08. 29

(87) PCT国际申请的公布数据

W02015/030201 JA 2015. 03. 05

(71) 申请人 国立研究开发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

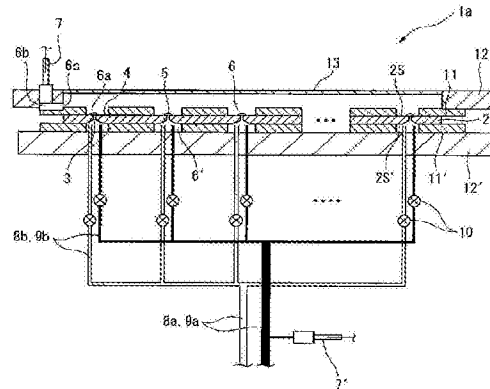
权利要求书1页 说明书18页 附图15页

(54) 发明名称

平面膜片钳装置以及平面膜片钳系统

(57) 摘要

一种平面膜片钳装置,具有:电绝缘性基板(2),其在细胞配置区域(4)内具有不使细胞通过但能够使液体通过的贯通孔(3);第一贮液部(6),其以能够与贯通孔(3)连通的方式设置在基板(2)的第一表面(2S)侧,且保持第一导电性液体;第一电极部(7),其配置为能够与第一贮液部(6)电导通;第二贮液部(6'),其以能够与贯通孔(3)连通的方式设置在基板(2)的第二表面(2S')侧,且保持第二导电性液体;第二电极部(7'),其配置为能够与第二贮液部(6')电导通;送液流路(8),其向第二贮液部(6')输送第二导电性液体;排液流路(9),其从第二贮液部(6')排出第二导电性液体;以及阀(10),其设置于送液流路(8)以及/或者排液流路(9),能够允许或者停止第二导电性液体的流通,并且能够允许或者停止第二贮液部(6')与第二电极部(7')的电导通。



1. 一种平面膜片钳装置, 具有:

电绝缘性基板, 其包括具有细胞配置区域的第一表面以及作为该第一表面的相反面的第二表面, 并且所述电绝缘性基板在细胞配置区域内具有不使细胞通过但能够使液体通过的贯通孔;

第一贮液部, 其以能够与贯通孔连通的方式设置在电绝缘性基板的第一表面侧, 且用于保持第一导电性液体;

第一电极部, 其配置为能够经由第一导电性液体而与第一贮液部电导通;

第二贮液部, 其以能够与贯通孔连通的方式设置在电绝缘性基板的第二表面侧, 且用于保持第二导电性液体;

第二电极部, 其配置为能够经由第二导电性液体而与第二贮液部电导通;

送液流路, 其与第二贮液部连结, 并向第二贮液部输送第二导电性液体;

排液流路, 其与第二贮液部连结, 并从第二贮液部排出第二导电性液体; 以及

阀, 其设置于送液流路以及/或者排液流路, 能够允许或者停止第二导电性液体的流通, 并且能够允许或者停止第二贮液部与第二电极部的电导通。

2. 根据权利要求1所述的平面膜片钳装置, 其中,

电绝缘性基板分别具有多个细胞配置区域以及与所述多个细胞配置区域对应的贯通孔, 并且所述电绝缘性基板与多个细胞配置区域对应地设置有多个第二贮液部,

送液流路具有: 送液主流路、以及从送液主流路分支且分别与多个第二贮液部连结的多个送液支流路,

排液流路具有: 分别与多个第二贮液部连结的多个排液支流路、以及多个排液支流路汇合而成的排液主流路,

第二电极部设置于送液主流路以及/或者排液主流路,

阀设置于各送液支流路以及/或者各排液支流路。

3. 根据权利要求1或2所述的平面膜片钳装置, 其中,

阀关闭时的阀前后的电阻值为1兆欧姆以上。

4. 一种平面膜片钳系统, 具备:

权利要求1至3中任一项所述的平面膜片钳装置;

控制所述平面膜片钳装置各阀的开闭的控制部; 以及

检测所述平面膜片钳装置各电极部的电信号的电检测部。

5. 根据权利要求4所述的平面膜片钳系统, 其中,

所述平面膜片钳系统具备多个所述膜片钳装置。

6. 根据权利要求4或5所述的平面膜片钳系统, 其中,

所述平面膜片钳系统还具备光检测部, 所述光检测部检测来自配置于所述平面膜片钳装置中的细胞的光信号。

7. 一种方法, 使用权利要求1至3中任一项所述的平面膜片钳装置、或者权利要求4至7中任一项所述的平面膜片钳系统, 筛选针对神经网的药剂。

平面膜片钳装置以及平面膜片钳系统

技术领域

[0001] 本发明涉及计量随着细胞膜的电活动而产生的电流等的平面膜片钳装置以及平面膜片钳系统。另外,还涉及使用平面膜片钳装置或者平面膜片钳系统的药剂的筛选方法。

背景技术

[0002] 作为埋入于细胞膜中的膜蛋白质的离子通道是与生物系的信号传递相关的重要的蛋白质。在该离子通道的功能的计量、利用该功能的药品开发中,要求计量在离子通道中流通的电流。应对这种要求,作为计量离子通道电流的技术而开发出的方法,有膜片钳法。

[0003] 作为膜片钳法而最初开发出的是移液管膜片钳法,但仅能够在单点记录细胞的离子通道电流,存在无法应用于基于多点计量的高通量筛选(high-throughput screening)的课题。作为解决这种课题的技术,开发出了平面膜片钳法。在平面膜片钳法中,例如日本特表2003-511668号公报(专利文献1)、日本特表2005-536751号公报(专利文献2)等所公开那样,在硅芯片等固体基板上设置多个微小的贯通孔,并且将细胞配置于各贯通孔上,使用电极来计量各细胞的离子通道电流,从而能够实现离子通道电流的多点计量。具体而言,在基板上的细胞的周围配置巴斯溶液,在基板的贯通孔的下部配置移液管溶液,在巴斯溶液以及移液管溶液中分别配置被电导通的电极(上部电极以及下部电极),向电极之间外加膜电位,从而测定离子通道电流。

[0004] 本发明的发明人等在此之前对平面膜片钳法提出了各种改进。例如,在日本特开2009-204407号公报(专利文献3)以及Urisu et al.,Analytical and Bioanalytical Chemistry,(2008),391:2703-2709(非专利文献1)中公开了如下的培养型平面膜片钳装置,该培养型平面膜片钳装置通过在基板贯通孔的周边设置细胞外基质形成物质,延长配置在贯通孔的开口部的细胞的生命,能够一边培养细胞一边测定离子通道电流。在国际专利公开第2013/094418号小册子(专利文献4)中公开了如下的平面膜片钳装置,该平面膜片钳装置通过无机多孔质材料构成电极容器末端,通过使用密封有饱和电极溶液的电极部(盐桥型电极部)而防止膜电位变动,减少干扰,提高电流测定精度。在国际专利申请第PCT/JP2013/57976号(WO2014/045618:专利文献5)中记载了如下的平面膜片钳装置,该平面膜片钳装置通过在细胞培养基板的包括贯通孔在内的细胞配置区域形成用突起部围成的细胞固定位置,能够在限制神经元移动的同时构成神经网络,从而提高电流测定精度。

[0005] 在先技术文献

[0006] 专利文献

[0007] 专利文献1:日本特表2003-511668号公报

[0008] 专利文献2:日本特表2005-536751号公报

[0009] 专利文献3:日本特开2009-204407号公报

[0010] 专利文献4:国际公开第2013/094418号

[0011] 专利文献5:国际公开第2014/045618号

[0012] 非专利文献

[0013] 非专利文献1:Urisu et al.,Analytical and Bioanalytical Chemistry,(2008),391:2703-2709

[0014] 然而,在平面膜片钳装置中,在基板贯通孔下配置有保持移液管溶液等导电性液体的贮液部,并且为了进行该液体的导入、更换而在贮液部上连结有送液排液用的流路。下部电极通常设置于该流路。但是,导电性液体容易经由该送液排液流路而泄漏,并且在不进行测定时,电流也容易经由该送液排液用流路向下部电极泄漏,存在电极容易劣化的课题。

[0015] 另外,在将平面膜片钳装置应用于各种筛选的情况下,其高通量化非常重要。理论上,能够通过配置多个单一通道的膜片钳装置来实现高通量化。但是,在该结构的膜片钳装置中,存在装置整体大型化、成本提高,而且必须在每个装置上配置电极,需要进行装置的维护、更换的操作的课题。

[0016] 特别是,在培养型平面膜片钳法中,如上述日本特开2009-204407号公报(专利文献3)所记载那样,使用在贯通孔的周边附着有细胞外基质形成物质的基板。因此,如上述国际公开第2013/094418号小册子(专利文献4)所公开那样,在被捕获的细胞的细胞膜与基板表面之间产生微小的间隙,由此密封电阻降低,在此基础上又因为在该间隙中流通的漏电流,存在干扰电流相对于外加膜电位的变动变大的课题。因此,为了减少外加膜电位的变动,使用精密且纤细的电极部(盐桥型电极部),该电极部通过将银线表面进行氯化后的AgCl/Ag线收容于容器中,利用分别以饱和状态溶解有KCl以及AgCl的饱和电解液填充容器,在此基础上利用无机多孔质材料构成电极容器末端,封闭饱和电极溶液而得到。电极部在每次短期(例如1天等)使用时都需要进行电极部的拆解、清洗、饱和电解液的更换、以及电极部本身的更换等操作。在进行盐桥型电极部内的饱和电解液的更换时,需要细心注意以便不使气泡进入,其结果是,维护所需的操作、时间增多。在多通道的情况下,维护更加繁琐。

发明内容

[0017] 发明要解决的课题

[0018] 本发明的发明人等鉴于这种课题而进行了深入研究,其结果是,提出了如下结构的平面膜片钳装置,由此解决了上述课题,该平面膜片钳装置在与基板的细胞配置面相反侧的贮液部和电极部之间的送液排液流路上配置阀(优选为微型阀),通过该阀来控制电解液的流通以及电导通的允许/停止。

[0019] 用于解决课题的方法

[0020] 即,本发明的主旨如下。

[0021] [1]一种平面膜片钳装置,具有:

[0022] 电绝缘性基板,其包括具有细胞配置区域的第一表面以及作为该第一表面的相反面的第二表面,并且所述电绝缘性基板在细胞配置区域内具有不使细胞通过但能够使液体通过的贯通孔;

[0023] 第一贮液部,其以能够与贯通孔连通的方式设置在电绝缘性基板的第一表面侧,且用于保持第一导电性液体;

[0024] 第一电极部,其配置为能够经由第一导电性液体而与第一贮液部电导通;

[0025] 第二贮液部,其以能够与贯通孔连通的方式设置在电绝缘性基板的第二表面侧,

且用于保持第二导电性液体；

[0026] 第二电极部,其配置为能够经由第二导电性液体而与第二贮液部电导通；

[0027] 送液流路,其与第二贮液部连结,并向第二贮液部输送第二导电性液体；

[0028] 排液流路,其与第二贮液部连结,并从第二贮液部排出第二导电性液体；以及

[0029] 阀,其设置于送液流路以及/或者排液流路,能够允许或者停止第二导电性液体的流通,并且能够允许或者停止第二贮液部与第二电极部的电导通。

[0030] [2]在[1]所述的平面膜片钳装置的基础上,电绝缘性基板分别具有多个细胞配置区域以及与所述多个细胞配置区域对应的贯通孔,并且所述电绝缘性基板与多个细胞配置区域对应地设置有多多个第二贮液部,

[0031] 送液流路具有:送液主流路、以及从送液主流路分支且分别与多个第二贮液部连结的多个送液支流路,

[0032] 排液流路具有:分别与多个第二贮液部连结的多个排液支流路、以及多个排液支流路汇合而成的排液主流路,

[0033] 第二电极部设置于送液主流路以及/或者排液主流路,

[0034] 阀设置于各送液支流路以及/或者各排液支流路。

[0035] [3]在[1]或[2]所述的平面膜片钳装置的基础上,阀关闭时的阀前后的电阻值为1兆欧姆以上。

[0036] [4]一种平面膜片钳系统,具备:[1]至[3]中任一项所述的平面膜片钳装置；

[0037] 控制所述平面膜片钳装置的各阀的开闭的控制部；以及

[0038] 检测所述平面膜片钳装置各电极部的电信号的电检测部。

[0039] [5]在[4]所述的平面膜片钳系统的基础上,所述平面膜片钳系统具有多个所述平面膜片钳装置。

[0040] [6]在[4]或[5]所述的平面膜片钳系统的基础上,所述平面膜片钳系统还具备光检测部,所述光检测部检测来自配置于所述平面膜片钳装置中的细胞的光信号。

[0041] [7]一种方法,使用[1]至[3]中任一项所述的平面膜片钳装置、或者[4]至[7]中任一项所述的平面膜片钳系统,筛选对神经网络造成影响的药剂。

[0042] 发明效果

[0043] 根据本发明的平面膜片钳装置,由于能够通过阀来控制与基板(2)下部的贮液部连结的送液排液流路中的液体(电解液等)的流通以及电导通,因此能够可靠地防止经由送液排液流路产生的漏液、漏电。由此,能够防止因不进行测定时的漏电而导致的电极的劣化。另外,基板下部的贮液部的液体的更换也变得更加容易。

[0044] 另外,在配置有多多个平面膜片钳装置的多通道型膜片钳中,也能够使电极部共用化,能够简化/缩短电极部的维护操作。特别是,在电极部的维护操作繁琐的培养型平面膜片钳装置中,该电极部的维护操作的简化/缩短的优点显著增大,有助于装置的高通量化。此外,通过电极部的共用化,还能够实现装置的小型化。

[0045] 此外,根据设置有多多个本发明的平面膜片钳装置的复合型的平面膜片钳系统,在膜片钳装置之间也能够使电极部共用化。由此,实现了进一步的高通量化。

附图说明

[0046] 图1是示出单一通道型平面膜片钳装置(1)的结构的一例的简图。

[0047] 图2是示出盐桥型电极部(7、7')的结构的一例的简图。

[0048] 图3(a)~(c)是示出微型阀(31)的结构的一例的简图。图3(a)是微型阀(31)的立体图,图3(b)是图3(a)的微型阀(31)的俯视图,图3(c)示出图3(a)的微型阀(31)的a-a'以及b-b'剖视图。在图3(a)~(c)中,左侧的图示出关闭状态的微型阀(31),右侧的图示出打开状态的微型阀(31)。

[0049] 图4A以及B是示出多通道型平面膜片钳装置(1a)的结构的一例的简图。

[0050] 图4A以及B是示出多通道型平面膜片钳装置(1a)的结构的一例的简图。

[0051] 图4C是示出设置有两个电极部的情况的多通道型平面膜片钳装置的结构的一例的简图。

[0052] 图5(a)是示出设置有多个多通道型平面膜片钳装置(1a)的复合多通道型平面膜片钳装置(1b)的结构的一例的简图。图5(b)是用于对图5(a)的复合多通道型平面膜片钳装置(1b)所具有的流路系统的结构的一例进行说明的概念图。图5(c)是示出图5(a)的复合多通道型平面膜片钳装置(1b)中的配置四个多通道型平面膜片钳基板的基板配置区域的简图。

[0053] 图6是示出多通道(5通道)型平面膜片钳基板的一例的简图。

[0054] 图7是示出多通道型平面膜片钳装置的阀(10)的控制系统的结构的一例的概念图。

[0055] 图8(a)示出利用图5所示的复合多通道型平面膜片钳装置(1b)的20个通道内的1个通道进行的 Ca^{2+} 成像的图像。图8(b)是示出在对图8(a)所示的细胞1进行两次电流注入时,将在图8(a)所示的细胞1~4中观察到的动作电位 Ca^{2+} 成像化而得到的荧光强度的时间变化的图表。

[0056] 图9是示出使用了图5所示的复合多通道型平面膜片钳装置(1b)得到的通道视紫质发现细胞中的通道电流的时间变化的图表。

[0057] 图10是通过光学显微镜观测在细胞固定位置配置神经元而形成神经网络的情况的照片。

[0058] 图11A示出在配置于贯通孔的神经元开设小孔而形成全细胞(whole-cell)模式的情况下,根据外加膜电位相应地产生的通道电流。NoNT-n30表示在不添加烟酸且未成为全细胞模式的情况下的通道电流,且表示在该情况下几乎不产生电流变化的情况。

[0059] 图11B示出添加了谷氨酸的情况下的根据外加膜电位相应地产生的通道电流。

[0060] 图11C示出在添加谷氨酸后添加AMPA受体拮抗物以及NMDA受体拮抗物的情况下的通道电流。

[0061] 图12是着眼于图11的外加膜电位-20mV的通道电流,计算所观测到的一个一个的脉冲状波形的面积并图表化而成的图(图12(a)~(c))。横轴是各脉冲的面积,纵轴是规定的面积的脉冲的数量。在图12(d)中示出通道电流脉冲的总和。

[0062] 图13是示出所形成的神经网络中的 Ca^{2+} 成像的结果的照片。图13(a)是在未添加状态下进行 Ca^{2+} 成像计量的结果,图13(b)是在之后添加了加入10 μM 浓度的谷氨酸的缓冲溶液(500 μL)的状态下进行 Ca^{2+} 成像的结果,图13(c)是在添加谷氨酸之后添加了2.5mM的D-AP5以及2.5mM的CNQX的状态下进行 Ca^{2+} 成像的结果。

具体实施方式

[0063] [概要]

[0064] 本发明的平面膜片钳装置具有如下结构:在与基板的细胞配置面相反的一侧的贮液部和电极部之间的流路上配置有阀(优选为微型阀),通过该阀来控制电解液的流通以及电导通的允许/停止。在平面膜片钳装置中,在每个单一通道装置设置有由送液流路以及排液流路构成的一对流路。

[0065] 本发明的发明人等发现:通过在送液流路以及/或者排液流路上设置阀,优选为微型阀,能够在不大幅改变整体的动作时间的情况下使电极部共用化,实现装置的小型化以及维护操作的简化/缩短。

[0066] 即,微型阀开闭微型流路所需的时间通常为几秒以下。另外,在记录来自电极的通道电流时,从某一通道向其他通道切换时的电路的响应速度通常为微秒级别,非常快。本发明人等着眼于这些方面而提出了如下结构:将与多个(例如n个)单一通道装置连接的多个(例如n个)送液支流路以及排液流路分别与一个送液主流路以及排液主流路连结,并且以与送液主流路以及/或者排液主流路内的溶液导通的方式设置单一的电极,通过微型阀仅使成为测定对象的单一通道装置的送液支流路以及/或者排液支流路微型阀处于打开状态进行测定。

[0067] 通过这种结构,能够在不大幅改变整体的动作时间的情况下减少电极的数量(例如减至1/n)。另外,由于微型阀比电极小很多,因此装置整体的尺寸也能够大幅小型化。

[0068] [单一通道型膜片钳装置]

[0069] 首先,对单一通道型的平面膜片钳装置(酌情简称为“单一通道装置”。)进行说明。单一通道装置是具有能够通过平面膜片钳法进行测定的单一的构造单位(这里将其称作“通道”)的装置。

[0070] 在图1中示出本发明的一实施方式的单一通道型平面膜片钳装置(单一通道装置)(1)的示意剖视图。但是,本发明的平面膜片钳装置不限于图1的单一通道装置(1)。

[0071] 图1的单一通道装置(1)具有包括第一表面(2S)以及第二表面(2S')的电绝缘性基板(2)。在电绝缘性基板(2)的第一表面(2S)配置有细胞配置区域(4),在细胞配置区域(4)内设置有将第一表面(2S)与第二表面(2S')连通的贯通孔(3)。该贯通孔(3)的大小设定为不使配置于细胞配置区域(4)的细胞(5)通过但液体能够通过的大小。因此,贯通孔(3)的内径只需根据所使用的细胞(5)的大小适当地选择即可。例如,从使用神经元的观点出发,优选贯通孔(3)的内径为1~3 μm 左右,但不限于此。

[0072] 电绝缘性基板(2)的材料也不受限制。作为一例,能够任意地选择玻璃制、陶瓷制、塑料制等的基板。但是,从进行来自下表面的激光的照射、基于显微镜的观察的观点出发,优选为透明基板。另外,电绝缘性基板(2)可以由单一材料形成,也可以通过混合或者层叠多个材料而形成。作为一例,在使用硅基板的情况下,优选为具有依次层叠第一表面(2S)侧的硅层、中间的氧化硅层、第二表面(2S')侧的硅层的结构的硅基板(SOI(Silicon on Insulator)基板)。在这样的层叠结构的硅基板中,由于在两个硅层之间存在绝缘性非常高的中间层,因此能够在测定对象细胞(5)的离子通道关闭时确保高电阻状态,能够减少背景的干扰。

[0073] 在使用SOI基板的情况下,从减少寄生电容和绝缘电阻增大的观点出发,优选中间层的厚度较厚。另外,若中间层的厚度不足,则有时电容变大,电阻变低,导致干扰增大。因此,中间层的厚度例如优选为5nm以上,其中更优选为10nm以上,进一步优选为100nm以上。另一方面,若中间层过厚,则有时不容易进行钻孔加工。从这些观点出发,中间层的厚度优选为10 μ m以下,更优选为1 μ m以下,进一步优选为500nm以下。

[0074] 另外,优选为,在基板(2)表面的贯通孔(3)周边部涂覆细胞(5)在固体表面生存所需的细胞外基质形成物质,并在该细胞外基质形成物质之上配置细胞(5)。由此,能够一边培养细胞(5)一边持续/长期地测定该细胞的通道离子电流。对于使用该细胞外基质形成物质的培养型平面膜片钳法的详细情况,参照本发明的发明人等的日本特开2009-204407号公报(专利文献3)以及Urisu et al., Analytical and Bioanalytical Chemistry, (2008), 391: 2703-2709(非专利文献1)。作为所使用的细胞外基质形成物质,例示了聚赖氨酸、胶原(I型、II型、IV型)、纤维连接蛋白、层粘连蛋白,蛋白多糖(聚糖、核心蛋白聚糖等)、蛋白多糖(聚集蛋白聚糖)、连接蛋白、巢蛋白、肌腱蛋白、蛋白多糖[硫酸软骨素蛋白多糖、硫酸乙酰肝素蛋白多糖(珍珠糖等)、硫酸角质素蛋白多糖、硫酸皮肤素蛋白多糖]、透明质酸(糖胺聚糖的一种)、弹性蛋白、纤维蛋白等,但不限于它们。

[0075] 另外,优选为,在基板(2)表面的贯通孔(3)周边部,形成由突起部(参照在后述的[复合多通道型平面膜片钳装置]中说明的图6的附图标记(25))围成的细胞固定位置。由此,特别是在以神经元为测定对象的情况下,能够在限制神经元的移动的同时构成神经网络。对于使用由该突起部(25)围成的细胞固定位置的平面膜片钳法的详细情况,参照本发明人等的国际专利申请第PCT/JP2013/57976号(WO2014/045618)。具体而言,能够在基板表面上的贯通孔(3)的周围设置多个、例如3、4、5、6、或者以上的突起部(25)来阻碍细胞(5)的移动。在上述突起部(25)之间,在不使神经元的细胞体通过的限度内设置有较宽的间隔,并且,通过多个突起部(25)限定的细胞固定位置的内径为能够收容1~9个、优选为1~5个神经元的细胞体的尺寸。也可以代替突起部(25)而形成具有比细胞(5)大的宽度和深度的凹部,设为细胞固定位置。此外,通过利用具有比细胞体小的宽度的槽将上述多个凹部相互连接,能够在限制神经元的移动的同时构成神经网络。

[0076] 在电绝缘性基板(2)的第一表面(2S)侧,以能够与贯通孔(3)连通的方式设置有第一贮液部(6)。在第一贮液部(6)中,保持有填充至配置于细胞配置区域(4)的细胞(5)的周围的第一导电性液体(例如被称作巴斯溶液的缓冲液、培养液等)。第一贮液部(6)例如具有主贮液部(6a)与副贮液部(6b)经由导入用通液路(6c)而电连通的结构。在第一贮液部(6)中,可以具有用于导入或排出导电性液体的通液路,或也可以具有能够通过盖构件(13)进行开闭的开口部。

[0077] 第一导电性液体是能够进行配置于细胞配置区域(4)的细胞(5)的培养、基于膜片钳法的电信号的检测的液体。例如,作为第一导电性液体,能够使用细胞培养液,在培养细胞后,替换为用于进行基于膜片钳的电信号的检测的巴斯溶液而使用。另外,也可以不替换为巴斯溶液,而在细胞培养液的情况下直接进行膜片钳。细胞培养液能够根据细胞种类、分化阶段而适当地选择任意的细胞培养液、分化诱导培养液。作为细胞培养液的例子,能够使用在依格尔(Eagle)培养基、杜氏改良依格尔(Dulbecco's modified Eagle's)培养基(DMEM)、Ham F10、F12培养基等基础培养基中,加入盐类、血清、抗生素、生长因子、微量营养

素等添加剂而得到的培养基。也可以在细胞配置区域(4)播种干细胞,例如iPS细胞、ES细胞、神经干细胞、以及分化过程中的细胞进行培养,向所希望的细胞、例如神经元分化,在本发明的平面膜片钳装置中也可以进行电信号的检测。在该情况下,干细胞培养液、分化诱导培养液、神经元培养液可以是分别不同的培养液,能够依次替换而使用。作为运动神经元、胶质细胞的培养液,可以在上述的细胞培养液中添加维甲酸、音猬因子(Sonic hedgehog)、cAMP等。作为微量营养素,也可以添加胰岛素、转铁蛋白、类胰岛素生长因子(IGF)、脑源性神经营养因子(BDNF)、培养胶质细胞源神经营养因子(GDNF)作为生长因子。对于巴斯溶液而言,只要是膜片钳法中使用的巴斯溶液,则可以为任意的溶液。为了对细胞施加刺激,或者为了能够实现细胞的成像,有时在第一导电性液体中添加各种试剂。

[0078] 另外,以经由第一导电性液体与第一贮液部(6)电导通的方式配置第一电极部(7)。该第一电极部(7)配置为插入到第一贮液部(6)(例如第一贮液部(6)的副贮液部(6b))内的第一导电性液体的状态。另外,对第一电极部(7)施加接地电位,由此第一贮液部(6)内的第一导电性液体能够维持为基准电位。

[0079] 另一方面,在电绝缘性基板(2)的第二表面(2S')侧,以能够与贯通孔(3)连通的方式设置有第二贮液部(6')。在第二贮液部(6')中保持有第二导电性液体。第二导电性液体是能够进行细胞(5)的培养、基于膜片钳法的电信号的检测的液体。例如,作为第二导电性液体,能够使用细胞培养液,也能够培养细胞(5)之后,替换为用于基于膜片钳进行的电信号的检测的移液管溶液等缓冲液。另外,由于贯通孔(3)是非常微小的孔,因此也可以不使用细胞培养液,从开始起使用移液管溶液来培养细胞(5)。细胞培养液可以与第一导电性液体中使用的细胞培养液相同,也可以是具有不同组成的培养液。对于移液管溶液而言,只要是膜片钳法中使用的移液管溶液则可以是任意的溶液。也可以在第二导电性溶液中溶解与离子通道的开闭相关的化学物质、用于其他实验的试剂而使用。在其他方式中,能够以在细胞膜上开设微小的孔为目的,将添加了细胞膜穿孔性的抗生素的第二导电性液体导入第二贮液部(6')。作为细胞膜穿孔性的抗生素,能够列举多烯系的抗生素,例如两性霉素B、制霉菌素、纳他霉素等。

[0080] 对于第一贮液部(6)以及第二贮液部(6')(有时将他们统称作“贮液部”。)而言,只要满足配置为保持导电性液体并且能够使电极部(7、7')对导电性液体通电的要求,则能够采取任意的结构。例如,贮液部(6、6')也可以是孔(we11)。另外,也可以通过在基板(2)的第一表面(2S)侧以及/或者第二表面(2S')侧层叠绝缘性的隔离构件(11、11'),在隔离构件(11、11')的与贮液部(6、6')对应的位置设置切口部,从而形成贮液部(6、6')。将存在于第一表面的隔离构件作为第一隔离构件(11),将存在于第二表面的隔离构件作为第二隔离构件(11')。此外,也可以通过在第一隔离构件(11)的基板相反侧的最外周配置第一板构件(12),在板构件上配置盖构件(13),从而将第一贮液部(6)构成为封闭空间或者液密。也可以在第二隔离构件(11')的基板相反侧进一步配置第二板构件(12'),液密性地构成第二贮液部(6')。在第二板构件(12')上贯通有与第二贮液部(6')连结的送液流路(8)以及排液流路(9)。

[0081] 不一定限定于此,隔离构件(11、11')只要是绝缘性的构件则可以是任意的构件,可以是与绝缘性基板(2)相同的材料,也可以是与绝缘性基板(2)不同的材料。从抑制因激光激励而产生的散射光的观点出发,优选第一表面(2S)侧的第一隔离构件(11)由光不透过

性的材料构成。另一方面,从进行显微镜观察的观点出发,优选第二表面(2S')侧的第二隔离构件(11')由透光性的材料构成。

[0082] 另外,在第二贮液部(6')上连接有向第二贮液部(6')输送第二导电性液体的送液流路(8)、以及从第二贮液部(6')排出第二导电性液体的排液流路(9)。送液流路(8)以及排液流路(9)的材料是任意的,可以由Teflon(注册商标)、氯乙烯等的管构成,但从设置后述的阀(10)的观点出发,优选使用通过在硅基板的表面上通过光刻而形成有抗蚀剂图案的模具等,向PDMS(聚二甲基硅氧烷)、RTV(room temperature vulcanizing:室温固化型)橡胶等硅酮橡胶进行转印而形成的微型流路等。通过使用这种微型流路,平面膜片钳装置的组装变得非常容易,能够避免流路偏移等不良情况。送液流路(8)以及排液流路(9)的尺寸也是任意的,例如宽度为100 μm ,高度约为50 μm 。送液流路(8)与贮存第二导电性液体的贮液槽连结,通过配置在流路的任意位置的泵向流路内送液。所输送的第二导电性液体通过排液流路(9)而排出。泵可以是压力施加驱动式,也可以是吸引驱动式。优选为,泵是配置在排液流路(9)中的液体吸引设备,能够向第二贮液部(6')施加负压。通过施加负压,能够使因存在于贯通孔(3)中的细胞(5)而得到的贯通孔(3)的密封更加牢固。由此,能够提高细胞(5)与电绝缘性基板(2)之间的密封电阻。另一方面,在其他方式中,还能够以对细胞膜进行穿孔为目的而施加更强的负压,也能够实现全细胞模式。

[0083] 另外,以经由第二导电性液体与第二贮液部(6')电导通的方式配置第二电极部(7')。该第二电极部(7')通常设置于送液流路(8)或者排液流路(9),配置为在向该流路内导入第二导电性液体的情况下与第二导电性液体接触。由此,能够借助第二电极部(7')测定第二贮液部(6')以及各流路内的第二导电性液体的电位。另外,能够经由第二电极部(7')向第二贮液部(6')以及各流路内的第二导电性液体施加任意的电压。

[0084] 需要说明的是,作为第一电极部(7)以及第二电极部(7')(有时将它们统一称作“电极部”),能够使用以往的平面膜片钳装置中使用的公知的各种电极部。但是,已知在上述的培养型的平面膜片钳装置中,与移液管膜片钳装置、非培养型的平面膜片钳装置相比,密封电阻非常低,容易产生因电极的界面电位变动而造成的噪声电流。因此,从极力防止电极的界面电位变动而减少噪声电流的观点出发,在本发明中,作为电极部,优选使用本发明的发明人等在国际专利公开第2013/094418号小册子(专利文献4)等中公开的盐桥型电极部。在图2中示意性地示出这种盐桥型电极部的结构的一例。图2的盐桥型电极部(7、7')具有如下结构:将对银线表面进行氯化而得到的Ag/AgCl电极(16)收纳于被KCl饱和溶液即电极溶液(15)充满的电极容器(14)内,利用无机多孔质材料(17)对与移液管溶液接触的电极容器(14)前端进行密封。Ag/AgCl电极(16)经由电极管脚(18)而与导线相连。通过这种结构,即使移液管溶液的氯浓度变动,Ag/AgCl电极(16)和与之接触的电极溶液(15)之间的界面电位也基本不发生电位变动,因此能够将噪声电流确保为非常低。

[0085] 此外,在图1的单一通道装置(1)中,在送液流路(8)以及/或者排液流路(9)中设置有阀(10)。该阀(10)构成为,能够允许或者停止第二导电性液体的流通,并且能够允许或者停止第二贮液部(6')与第二电极部(7')的电导通。即,在阀(10)打开的情况下,允许第二导电性液体的流通,并且使第二导电性液体通过而允许电导通,另一方面,在阀(10)关闭的情况下,通过阀(10)使第二导电性液体分离,并且通过阀(10)前后的电阻值来切断电导通。在此,也可以在送液流路(8)以及排液流路(9)的双方配置阀(10)。在这种情况下,这些阀(10)

可以统一地控制开闭,也可以独立地控制开闭。另一方面,也可以仅在送液流路(8)或者排液流路(9)的任一者配置阀(10)。在这种情况下,只要在配置有阀(10)的流路设置第二电极部(7')即可。

[0086] 因此,阀(10)是非导电性或者绝缘性阀。具体而言,关闭时的电阻值例如优选为1兆 Ω 以上,更优选为3兆 Ω 以上,进一步优选为5兆 Ω 以上,更进一步优选为10兆 Ω 以上。对于电阻值的上限值并不特别限制。

[0087] 阀(10)的种类并不限制,作为例子,可列举出能够对微型流路进行开闭的微型阀。微型阀是允许/停止微型流路内的液体的流通的阀,通常具有由挠性材料形成的微型流路、与微型流路邻接地配置的可动阀、以及能够驱动可动阀的驱动系统。在微型阀打开时,可动阀位于实质上不压迫微型流路的位置,允许流路内的液体的流通。在微型阀关闭时,通过驱动系统使可动阀位移至压迫微型流路的位置,使微型流路变形而关闭流路内孔,停止流路内的液体的流通。作为驱动系统,能够列举使用压缩空气(compressed air)、液体等流体压力作为驱动源的压力驱动系统、基于压电元件等的机械驱动系统等。已知各种各样的这种微型阀,在本发明中能够任意使用,作为一例,能够列举Stephen Quake等公开的液压控制微型阀(Journal of Applied Physics, vol195, (2004)393-398)等。

[0088] 在此,参照图3(a)~(c)对本发明的平面膜片钳装置中的微型阀的结构的一例进行说明。但是,能够在本发明中使用的微型阀决不限于于此。图3(a)是微型阀(31)的立体图,图3(b)是图3(a)的微型阀(31)的俯视图,图3(c)示出图3(a)的微型阀(31)的A-A'以及B-B'剖视图。图3(a)~(c)所示的微型阀(31)是压缩空气驱动型的微型阀(31),具有由挠性材料构成的微型流路(32)(相当于送液流路(8)或者排液流路(9))、配置在微型流路(32)下方的能够膨胀/收缩的压缩空气垫(33)(可动阀)、以及与压缩空气垫(33)连结的压缩空气线(21)。通过压缩空气线(21)将压缩空气导入到压缩空气垫(33)内、或者将压缩空气从压缩空气垫(33)排出,从而构成借助压缩空气的压力使压缩空气垫(33)膨胀/收缩的压缩空气驱动系统。在这种微型阀(31)中构成为,微型流路(32)与压缩空气垫(33)相互固定,并且当压缩空气垫(33)膨胀时,与微型流路(32)下表面邻接的压缩空气垫(33)上表面向上方位移而压迫微型流路(32)下表面,使微型流路(32)的内孔变形,形成变形部(34)进行封闭。由此,在微型阀(31)的打开状态(图6(a)~(c)的左侧的图)下,压缩空气垫(33)处于收缩状态,微型流路(32)的内孔开放,因此处于允许内部的液体的流通的状态。另一方面,在微型阀(31)的关闭状态(图6(a)~(c)的右侧的图)下,从压缩空气线(21)(压缩空气驱动系统)向压缩空气垫(33)导入压缩空气而使其膨胀,使微型流路(32)变形而对其进行封闭,处于停止内部的液体的流通的状态。然后,当再次使微型阀(31)成为打开状态时(图6(a)~(c)的左侧的图),通过压缩空气线(21)(压缩空气驱动系统)从压缩空气垫(33)排出压缩空气而使压缩空气垫(33)收缩,使微型流路(32)的变形恢复,再次开始进行内部的液体的流通。这样,能够通过微型阀(31)来控制微型流路(32)(送液流路(8)或者排液流路(9))内的液体(第二导电性液体)的流通。

[0089] 需要说明的是,在本发明中使用的微型阀(31)构成为,不仅能够允许/停止送液流路(8)或者排液流路(9)内的第二导电性液体的流通,还能够允许/停止经由第二导电性液体进行的第二贮液部(6')与第二电极部(7')的电导通。为了实现这种微型阀(31),优选利用具有电绝缘性且挠性优异的材料形成至少微型阀(31)部分的微型流路(32)(送液流路

(8)或者排液流路(9))。由此,在通过可动阀将微型流路(32)压迫/变形时,微型流路(32)内孔充分变形,其内孔的空隙通过绝缘性材料而被完全封闭,能够将电导通切断。作为这种具有电绝缘性且挠性优异的材料,例如能够列举PDMS(聚二甲基硅氧烷)、RTV(room temperature vulcanizing:室温固化型)橡胶等硅酮橡胶。

[0090] 此外,为了通过微型阀(31)切断微型流路(32)的电导通,与停止液体的流通的情况相比,需要通过可动阀更加强烈地压迫微型流路(32),从而更加可靠地封闭微型流路(32)的内孔。为此所需的可动阀的位移量、压力等根据微型阀(31)的结构而有所不同,因此不能统一地规定,但本领域技术人员能够考虑微型阀(31)的结构而容易地确定,以便达到足够的电阻值(例如,优选为1兆 Ω 以上,更优选为3兆 Ω 以上,进一步优选为5兆 Ω 以上,更进一步优选为10兆 Ω 以上)。

[0091] 按照以下的顺序使用具有上述结构的图1的单一通道装置(1)进行细胞的离子通道电流的测定。

[0092] 首先,在电绝缘性基板(2)的第一表面(2S)的细胞配置区域(4)中,以覆盖贯通孔(3)的方式配置测定对象的细胞(5)。另外,形成在第一贮液部(6)填充有第一导电性液体(例如巴斯溶液等),在第二贮液部(6')填充有第二导电性液体(例如移液管溶液等)的状态。

[0093] 接着,在与贯通孔(3)接触的细胞膜的表面开设微小的孔,形成使细胞(5)内部与第二贮液部(6')的第二导电性液体(移液管溶液等)电导通的状态(通常称作“全细胞”状态)。将细胞(5)形成全细胞状态的方法不限制,作为例子,能够列举如下方法:调制将特定的抗生素(例如制霉菌素或者两性霉素等)溶解于第二导电性液体而成的溶液,在即将进行电流测定之前将该抗生素溶液导入第二贮液部(6')而与细胞膜接触,从而在细胞膜上形成微小的孔(在这种情况下,在实现全细胞状态后,在电流测定前,再次将第二贮液部(6')内的溶液替换为不含有抗生素的第二导电性液体。)

[0094] 然后,向第一电极部与第二电极部之间施加规定的电压(称作膜电位)。由此,能够在细胞膜的离子通道通过的电流记录为通道电流。

[0095] 需要说明的是,在以上说明的单一通道装置(1)中,第一贮液部(6)通常配置在绝缘性基板(2)的上侧,但也可以构成为能够对其上壁进行开闭。之后,能够进行细胞向细胞配置区域(4)的配置、从细胞配置区域(4)进行的细胞采取、第一导电性液体的填充、更换、其他各种处理(例如,离子通道的封阻剂、用于研究细胞的药剂响应的药剂溶液的添加等)。但是,也可以与第二贮液部(6')同样地,在第一贮液部(6)也设置有送液流路(8)以及排液流路(9),使用它们进行第一导电性液体的填充、更换等。

[0096] 另一方面,经由送液流路(8)以及排液流路(9)而进行第二贮液部(6')内的第二导电性液体的填充、更换。即,从外部的供给源(未图示),通过送液流路(8)输送第二导电性液体,向第二贮液部(6')内填充。通常,通过在送液流路(8)或者排液流路(9)中设置泵等驱动部(未图示)来进行液体的驱动。另外,在第二贮液部(6')内预先存在有液体的情况下,将该液体经由排液流路(9)向外部排出,由此更换第二贮液部(6')内的液体。

[0097] 在此,在图1的单一通道装置(1)中,通过对设置于送液流路(8)以及/或者排液流路(9)中的阀(10)进行操作,能够控制第二导电性液体的流通/停止,并且控制第二贮液部(6')与第二电极部的电导通的形成/绝缘。由此,能够可靠地防止经由送液流路(8)以及/或

者排液流路(9)的漏液、漏电。进而,能够防止因不进行测定时的漏电而导致的电极的劣化。另外,第二贮液部(6')中的第二导电性液体的更换也变得更加容易。

[0098] 在培养型膜片钳装置的情况下,也可以在配置细胞(5)后将装置放入恒温箱等来培养细胞。在这种情况下,若考虑将装置放入恒温箱等时的操作性、尺寸限制等,也可以采用能够使包括基板在内的装置的一部分(例如不含电源、液体源等的部分)分离的结构。由此,能够仅分离出装置的一部分放入恒温箱。特别是,通过在分离出的部分的末端配置阀(10),在分离时将阀(10)设为关闭,能够防止液体从流路流出。在进行电流的测定时,形成在第一贮液部(6)中填充有第一导电性液体(例如巴斯溶液等),而在第二贮液部(6')中填充有第二导电性液体(例如移液管溶液等)的状态。

[0099] [多通道型平面膜片钳装置]

[0100] 接着,对组合多个单一通道装置而成的多通道型平面膜片钳装置(酌情简称作“多通道装置”。)进行说明。多通道型平面膜片钳装置是具有多个能够基于平面膜片钳法进行测定的构造单位(通道)的装置。

[0101] 在图4A中示出本发明的一实施方式的多通道型装置(1a)的示意剖视图。但是,本发明的平面膜片钳装置不限于图4A的多通道装置(1a)。例如,也可以如图4B所示那样,第一贮液部(6)中的细胞配置区域连续,在测定对象的细胞之间形成神经网络。此外,也可以如图4C所示那样设置两个以上具有第二电极部的送液排液系统。通过设置于送液排液流路的阀,能够利用各个送液排液系统选择测定对象的细胞。由此,能够在两个以上的测定点测定形成细胞网的细胞中的电流变化或者电位变化,能够通过阀切换测定对象细胞。

[0102] 在图4A~C的多通道型装置(1a)中,电绝缘性基板(2)分别具有多个细胞配置区域(4)以及与之对应的贯通孔(3)。另外,第二贮液部(6')与多个细胞配置区域(4)对应地也设置有多个。

[0103] 另外,送液流路(8)包括送液主流路(8a)、以及从送液主流路(8a)分支的多个送液支流路(8b),多个送液支流路(8b)分别与多个第二贮液部(6')连结。

[0104] 另外,排液流路(9)也包括排液主流路(9a)、以及从排液主流路(9a)分支的多个排液支流路(9b),多个排液支流路(9b)分别与多个第二贮液部(6')连结。

[0105] 另外,第二电极部(7')设置于送液主流路(8a)以及/或者排液主流路(9a)。

[0106] 另外,在与多个第二贮液部(6')分别连结的送液支流路(8b)以及/或者排液支流路(9b)中设置有阀(10)。

[0107] 对于未配置有第二电极的流路,支流路也可以不汇合而形成主流路。例如,在送液主流路(8a)中配置有第二电极部(7')的情况下,排液支流路(8b)也可以不形成排液主流路而直接进行排液。

[0108] 其他结构等与图1的多通道型装置(1)相同。

[0109] 按照以下的顺序使用具有这种结构的图4A~C的多通道型装置(1a)进行细胞(5)的离子通道电流的测定。

[0110] 首先,在电绝缘性基板(2)的第一表面(2S)的多个细胞配置区域(4)中,分别以覆盖贯通孔(3)的方式配置测定对象的细胞(5)。另外,形成在第一贮液部(6)中填充有第一导电性液体(例如巴斯溶液等),在第二贮液部(6')中填充有第二导电性液体(例如移液管溶液等)的状态。

[0111] 接着,在与贯通孔(3)接触的细胞膜的表面开设微小的孔,形成将细胞内部与第二贮液部(6')的第二导电性液体(移液管溶液等)电导通的状态(全细胞状态)。

[0112] 接着,通过将想要计量的通道的送液流路(8)以及/或者排液流路(9)的阀(10)设为打开,将其他阀(10)全部设为关闭,从而仅使想要计量的通道的细胞(5)经由第二导电性液体与第二电极部(7')导通。

[0113] 然后,向第一电极部(7)与第二电极部(7')之间施加规定的电压(称作膜电位)。由此,能够记录存在于所希望的通道中的细胞(5)的离子通道电流。

[0114] 需要说明的是,在图4A~C的多通道型装置中,在第一贮液部(6)存在有多个细胞配置区域(4),并存在有与细胞配置区域(4)对应的数量的贯通孔(3)。在此,能够在细胞配置区域(4)之间添加分隔件,由此能够将第一贮液部(6)划分为多个贮液区间(22)。该分隔件也可以由隔板构件(23)形成。例如,在将第一隔离构件(11)重叠于基板(2)的第一表面(2S)侧时,通过在第一隔离构件(11)的切口部配置隔板构件(23),能够划分出贮液区间(22)。在存在有多个贮液区间(22)的情况下,也可以将第一电极部(7)配置在各个贮液区间(22)之中。但是,通过在上述多个贮液区间(22)之间允许电导通,能够利用一个第一电极部(7)对所有的贮液区间(22)的细胞配置区域(4)的细胞(5)测定电信号。因此,在该情况下,作为隔板构件(23),可以使用例如金属、多孔质材料这样的导电性的构件,也可以使用绝缘性的构件,进而通过几乎不存在液体的往来的非常窄的通路进行连结,由此能够在贮液区间(22)之间实现电导通。通过将第一贮液部(6)划分为多个贮液区间(22),关于向各贮液区间添加的药剂对细胞带来的效果、离子通道的响应等,通过微型阀(31)的开闭能够选择性地对所计量的通道、即所要计量的第一贮液部(6)的贮液区间(22)进行计量,因此能够在短时间内测定多个药剂的效果,能够用于高通量筛选。另外,配置于基板(2)上的隔板构件(23)能够利用来自例如罩玻璃等盖构件(13)的上方的压力,保护由形成在基板(2)的细胞配置区域(4)的多个柱状的突起部(25)构成的细胞固定位置(24)。

[0115] [复合多通道型平面膜片钳装置]

[0116] 通过组合多个多通道型平面膜片钳装置,能够构成复合多通道型平面膜片钳装置。图5示出该复合多通道型平面膜片钳装置(1b)的一例,具体而言,示出组合四个5通道的培养型平面膜片钳装置而成的合计20通道的复合多通道型平面膜片钳装置(1b)。图5(a)是该装置(1b)的俯视图,在中央的圆形部配置有四个正方形的多通道基板(D1~D4),能够在该多通道基板(D1~D4)中的五个贮液区间(22)内测定电信号。此外,在圆形部的周围配置有四个流路分支板(M1~M4)、四个前置放大器(P1~P4)。在各流路分支板上连结有能够进行阀(10)的控制的五条压缩空气线(21),各前置放大器一方面与配置在流路分支板(M1~M4)内的第二电极部(7')连接,另一方面与通道电流计量用的设备连接。图5(b)是流路分支板(M1~M4)的放大图,配置有:由从送液主流路端子(19a)延伸的送液主流路(8a)和从送液主流路(8a)分支的送液支流路(8b)构成的送液系统;由从排液主流路端子(20a)延伸的排液主流路(9a)和从排液主流路分支的排液支流路(9b)构成排液系统;以及允许或者停止上述送液系统与排液系统的液体的流通以及电导通的阀(10);以及第二电极部(7')。在图5(b)中,与阀(10)连接的压缩空气线(21)未图示,仅图示了两对送液支流路(8b)以及排液支流路(9b),为了不使附图复杂而省略了其他三组送液支流路(8b)以及排液支流路(9b)。图5(c)是图5(a)的中央的圆形部的放大图,图5(b)的送液支流路(8b)与排液支流路

(9b)经由送液支流路端子(19b)以及排液支流路端子(20b)而与基板上的1的贮液区间(22)连接。第二电极部(7')在各个流路分支板(M1~M4)上分别设置有一个。将五对阀(10)中的规定的一对阀(10)设为打开,能够同时通过最大四个通道计量基板上的规定的贮液区间(22)中存在的细胞(5)的电特性。

[0117] 图6是示出在图5所示的复合多通道培养型平面膜片钳装置(1b)中用作多通道基板(D1~D4)的五通道基板(D)的一例的俯视图。该基板由PMMA(聚甲基丙烯酸甲酯)构成,厚度为200 μm ,具有一边为60mm的正方形形状。在该基板上配置有五个一边为20mm的正方形形状的细胞配置区域(4),在其他的区域存在有隔离物,限制液体的移动。在各细胞配置区域(4)的中央部存在有直径为1.5~2 μm 的贯通孔(3),在该贯通孔(3)的下部形成有直径为150 μm 的第二贮液部(6'),该部分的基板的厚度为15 μm 。在细胞配置区域(4)中形成有多个细胞固定位置(24),各细胞固定位置被直径为30 μm 、高度约为10 μm 的圆柱状的突起部(25)包围,圆柱(25)与圆柱(25)的间隔被限制在10微米以下,以使得细胞(5)不从该细胞固定位置(24)脱离。通过除了配置于贯通孔(3)的位置的细胞固定位置(24)以外还制作细胞固定位置(24),能够将该基板利用于神经元网形成。在贯通孔(3)的下方的第二贮液部(6'),作为微型流路而形成有一对送液流路(8)以及排液流路(9)。

[0118] [平面膜片钳系统]

[0119] 本发明的膜片钳装置与流路控制系统、通道电流计量系统连接而被控制。图7是示出多通道型平面膜片钳装置的阀的控制系统的结构的一例的概念图。流路控制系统通过配置于流路中的泵而产生第二导电性液体的液流,此外,通过使输出与阀(10)的开闭有关控制信号的定序器(26)工作而使阀(10)开闭,由此能够控制第二导电性液体的流通以及电导通的允许或者停止。在通过压缩空气来控制阀(10)的开闭的情况下,使用将由定序器(26)输出的控制信号转换为控制阀(10)的空气压力的电磁阀(29)。定序器(26)与电磁阀(29)经由连接线(28)而连接,传递至电磁阀(29)的电信号转换为空气压力。经由与电磁阀连接端子(30)连接的压缩空气线(21)将空气压力向阀(10)传递,从而对流路进行开闭。定序器(26)经由连接线(28)与流路控制用的控制计算机(27)连接,能够通过控制计算机(27)进行操作。通道电流计量系统能够使用平面膜片钳的普通系统,例如包括控制电流放大器、低通滤波器、以及模拟数字转换器的电流计量用的计算机。流路控制用的计算机(27)与电流计量用的计算机可以彼此配合地工作,也可以通过单一的计算机进行控制。

[0120] [筛选方法]

[0121] 使用本发明的平面膜片钳装置、多通道型平面膜片钳装置、复合多通道型平面膜片钳装置、以及平面膜片钳系统,能够进行对神经元网造成影响的候选药剂的高通量筛选。作为用于对候选药剂进行筛选的条件,由本发明的装置测定出的通道电流需要能够表现出(1)健康状态、(2)疾病状态,并且(3)能够证实在疾病状态使候选药剂发挥作用而恢复健康状态。如实施例中所示那样,本发明的平面膜片钳装置能够分别测定上述(1)、(2)以及(3)的状态,能够进行药剂的筛选。作为装置结构,能够准备大量的如图1所示的单一通道装置,但电极部的维护繁琐,因此优选使用图4A~C所示的多通道型装置,此外,能够如图5的装置那样使用包括多个多通道型基板(D1~D4)的复合多通道型平面膜片钳装置,通过阀的控制依次测定各贮液区间的通道电流,从而高效地进行筛选。

[0122] 在本发明中,在筛选方法中,需要进行对本发明的平面膜片钳装置,优选为多通道