

# 視覚情報処理系の *in vitro* 再構成に関する基礎的研究

5 6 7 8 0 倉島 利明

指導教員 佐久間一郎 教授

Retina, thalamus or superior colliculus (SC), and visual cortex are probably fundamental components of biological visual information processing systems. Retina is not a simple transducer from photo to electrical signals, but plays an essential role in information processing. Thalamus and/or SC also have an important role. To visualize information processing at each step in this cascade, reconstruction of retina-thalamus (or SC)-cortex systems *in vitro* will be a promising tool. As the first step, we tried microelectrode-array (MEA) recording from acute retinal tissue. Retina was taken from postnatal day 30 rats and plated on MEAs with 64 embedded electrodes. Spontaneous electrical activity as well as responses to electrical and optical stimulation were observed. Then as the second step, we tried MEA-based recording from cultured retina and cultured superior colliculi and co-cultured tissue of retina and SC. Retina and SC were successfully cultured on MEA substrates. And from cultured retina and superior colliculi, spontaneous activity was recorded. The next step will be establishment of co-culture systems of retina and other tissue components that have precise connection with each tissue.

Keywords: MEA, spontaneous activity, evoked activity, retina, superior colliculus, co-culture

## 1. はじめに

視覚情報処理系は、ヒトの感覚入力の 90%以上の情報を担うと言われており、最も重要な感覚情報伝達・処理システムである。この経路における情報表現、処理メカニズムの理解は、生体を理解する立場からも、医学・医療の立場からも大きな意義を有する。哺乳類の視覚情報は、網膜の光受容体によって、光から電気信号へと変換された信号が、中継核を経て大脳皮質視覚野に到達する経路をたどることが知られている。網膜における光受容は錐体と桿体によって行われるが、それ以外にも多様な細胞とその結合が存在し、神経節細胞からの出力は、明暗や色の 2 次元的な空間分布だけではなく、既に符号化された形での情報を含んでいると言われて<sup>[1]</sup>。当然、中継核である上丘や視床でもさらに修飾を受け<sup>[2]</sup>、上位中枢に送られると考えられるが、各段階での情報表現とその処理機構については十分解明されているとは言えない。発達段階における様々な入力履歴に依存した変化の観察を通して、計測される信号と情報表現におけるその意味の理解に向けた研究が進められているのが現状である。

培養細胞をはじめとする *in vitro* 系は、組織のモフォロジーが可視化され、その情報に基づいて各部分にアクセスすることによって細胞レベルの計測が可能になるという特徴がある<sup>[3]</sup>。網膜、中継部（上丘、視床）、大脳皮質視覚野それぞれの組織切片を採取して *in vitro* 系で再構成するこ

とができれば、視覚系における情報処理メカニズム解明に向けて、有用なツールとなる。その延長線上に、視覚障害に対する人工的な補綴、さらには幹細胞を含む再生医療への展開も期待できる。

複数の組織から採取した試料を並べてその間を流れる信号を可視化することを考える場合、時空間的な信号計測手法が必要になる。これを可能にする手法の 1 つとして電極アレイ法 (Micro-Electrode Array: MEA)<sup>[4]</sup>が知られており、非侵襲的に長期にわたる計測が可能で、さらには多点電気刺激機能がある特徴とされている。本研究では実験動物（ラット）から採取した網膜、中継部（上丘、視床）、大脳皮質視覚野それぞれの組織切片を電極アレイ基板上で共培養し、*in vitro* 系で再構成することを目指す。今回、その第一段階として、急性網膜試料からの MEA 基板による自発電気活動・誘発応答計測、さらに第二段階として培養網膜、上丘及び網膜・上丘の共培養試料の観測、自発電気活動計測を試みた。これらの実験により得られた結果につき報告する。

## 2. 実験方法

### 2.1 生体試料の調整

網膜試料を 4.5 週齢の Wistar rat より採取した。解剖操作に先立って 1 時間以上暗室環境下に順応させ、ジエチルエーテルによる麻酔を施した後、眼球を摘出した。採取した眼球は、以下に

示す細胞外溶液 I 中に保持し、角膜、強膜などの組織を除去して網膜試料を調整した。

細胞外溶液 I : 110mM NaCl, 2.5mM KCl, 1.6mM MgCl<sub>2</sub>, 1.0mM CaCl<sub>2</sub>, 10mM D-glucose, buffered with 22.0mM NaHCO<sub>3</sub> PH 7.4 の溶液を、酸素 95%、二酸化炭素 5%の混合ガスでバブリングし、冷却したものを使用した。

上丘組織は生後 2 日目の網膜の摘出を行ったものと同一種の Wistar rat より採取した。マイクロライザー (堂阪イーエム) を利用して作成した厚さ 300 $\mu$ m の脳スライスからメスを用いて上丘部の切り出しを行った。操作は以下に示す細胞外溶液 II 中で実施した。

細胞外溶液 II : 149mM-NaCl、2.8mM-KCl、2mM-CaCl<sub>2</sub>、1mM-MgCl<sub>2</sub>、10mM-HEPES、10mM-glucose、PH : 7.2 を、酸素 95%、二酸化炭素 5%でバブリングし、冷却したものを使用した。

調整した組織切片は、同じ細胞外溶液 II 中を 37 $^{\circ}$ C に保ち、酸素 95%、二酸化炭素 5%の混合ガスでバブリングした状態で 1 時間以上回復させ、その後の操作を行った。

## 2.2 細胞培養

細胞培養用には、64 個のマイクロ電極付ガラス基板を使用した。個々の電極は 30x30 $\mu$ m であり、電極中心間距離 180 $\mu$ m で 4x8 の電極が配置されたブロックが 500 $\mu$ m の距離を隔てて 2 つ並んだ形状のものである (図 1(A))。基板表面を Poly-D-Lysine, Laminin によってコーティングし、さらに少量の血清を滴下して、調整した網膜もしくは上丘試料を配置した。この状態で少量の培養液を加え、接着するまで一定時間インキュベータ内に保持した後、通常量の細胞培養液を加え、37 $^{\circ}$ C、二酸化炭素 5%、水蒸気飽和のインキュベータで培養した。培養液は DMEM (Gibco) に熱処理した牛胎児血清、馬血清を各 10%、少量の BDNF と Forskolin を加えたものに、インシュリンと抗生物質を添加したものを使用した。これを 1 週間に 2 度、半量ずつ交換することにより環境を維持した。

## 2.3 電気信号計測

急性試料の測定においては、図 1(B)に示す機構により試料を固定した。基板表面は培養時と同様 Poly-D-Lysine, Laminin によるコーティングを施し、切片試料を配置した。サイズの異なる 2 枚のステンレスワッシャを重ねて接着し、その下面に分子分画量 50,000 の半透膜を装着したものを錘として試料上に設置した。試料にダメージを

与えずかつ確実な固定ができるよう、厚さ: 200 $\mu$ m の Filter paper をスペーサとして試料の周囲に配置した。網膜は神経節細胞が電極に接する向きとした。

基板上 64 ヶ所の電極で記録される細胞外電位を、網膜については帯域 100Hz–5 kHz、上丘に関しては帯域 10Hz–5 kHz にフィルタを設定し、これを 5,000-10,000 倍に増幅した後、分解能 12bit、サンプリング周波数 25kHz で A/D 変換し、ハードディスクに記録した。計測はすべて暗室下で行い、網膜に光刺激が混入しないようにした。データ収集のコントロールには Lab View (National Instruments 社) を用いた。

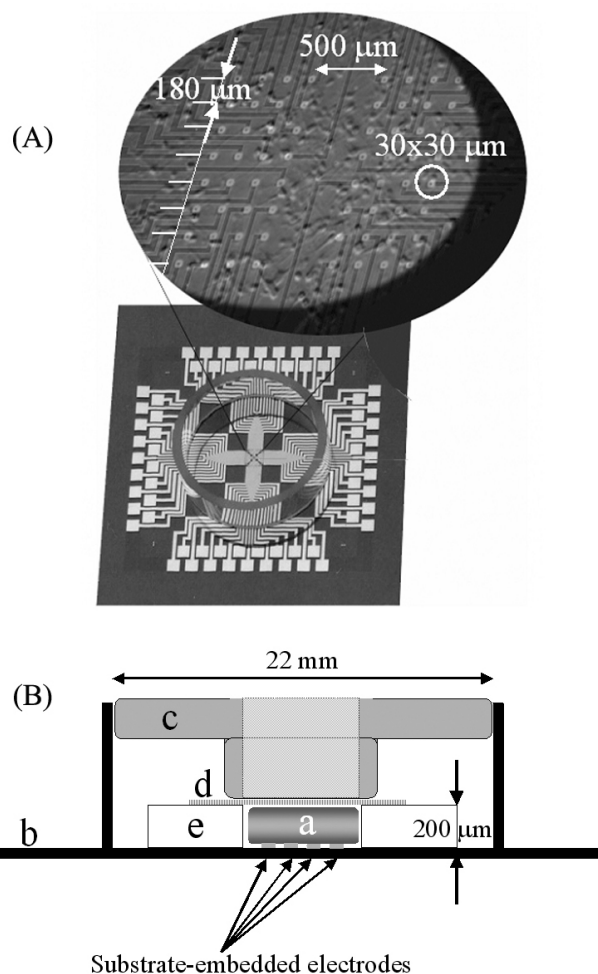


Fig. 1 Setup for electrical activity recording.  
a: retinal tissue, b: MEA substrate, c: stainless plummet, d: semi-permeable membrane, e: filter paper

## 2.4 電気刺激と光刺激

基板上の 64 ヶ所の電極のうちの 2 ヶ所を選択して振幅 1V の双極性パルス列を印加し、電気刺激とした。光刺激は、波長 520nm、出力 40nW の緑色 LED を光源とし、光ファイバを用いて基板裏面から照射した。これにより、通常の状態では網膜に光が当たる方向である神経節細胞側からの

照射となる。光照射のタイミングはファンクションジェネレータにより制御し、この制御信号を電気活動計測信号と同期して記録した。

### 3. 実験結果

#### 3.1 急性網膜試料からの電気活動記録

図 2 に急性網膜試料の電気活動計測結果を示す。(A)は自発活動、(B)は光刺激に対する応答、(C)は電気刺激に対する応答である。自発活動においては、振幅の異なる複数のスパイク信号が記録されている。電気刺激印加時は、大きなアーティファクトの後にクリアな神経スパイクが認められる。この場合も少なくとも 3 種類以上の振幅のスパイクが混在していることがわかる。光刺激応答においては、光照射開始から多少の遅れをもってバースト的な活動が記録されている。刺激と神経信号とのタイミングを評価するため、ラスタプロットを作成した結果を図 3 と 4 に示す。図 3 は電気刺激に対する誘発応答であり、図 4 は光刺激に対する誘発応答である。各 10 回の試行に対する結果を並べて表示し、検出したスパイクすべてについてヒストグラムを作成した。スパイクの検出は、ベースラインノイズの標準偏差の 5 倍を閾値とし、負の側に閾値を超えた時点スパイク発生タイミングとした。ここに示す電気刺激応答の例では、刺激印加直前の 50ms の区間に自発活動が認められず、明確に誘発応答が区別して記録できた。光応答計測の例では、刺激直後数 ms での反応は見られなかった。これは還流を行っていないため、組織状態が悪化し反応に時間差が生じたためであると考えられる。OFF 時にはほとんど見られなかった活動が、ON 時において増加していることから光刺激に対して応答を示したものと考えられる。

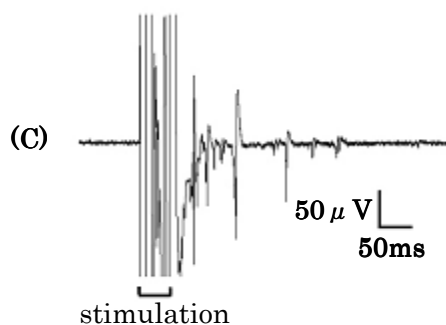
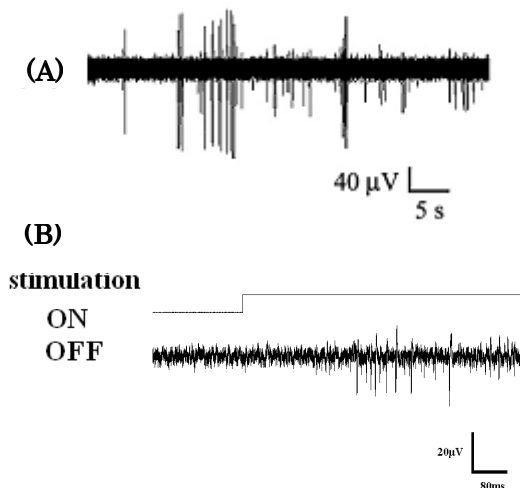


Fig. 2 Electrical activity recorded from acute retinal tissue:

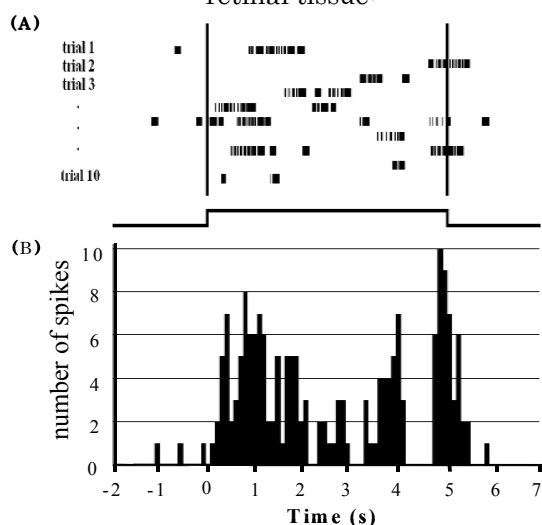


Fig.3 Optically evoked responses of retinal tissue

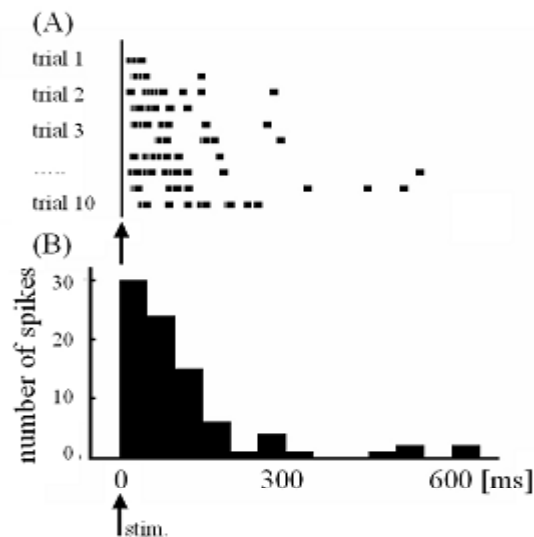


Fig. 4 Electrically evoked responses of retinal tissue

#### 3.2 培養切片試料からの電気活動記録

網膜を培養したところ、図 5(A)に示すように網膜に存在するグリア細胞の一種であるミュラー細胞と思われる細胞が確認された。また培養過程において、神経突起と思われるものが観察され

た。さらに培養 9 日目の網膜試料にて電気計測を行ったところ自発活動の計測を行うことができた。上丘を培養した結果、図 6(A)に示すように組織切片周辺に神経細胞とグリア細胞が放射状に広がる様子が確認できた。また培養 2 日目の培養試料に関して電気計測を行った結果、網膜と同様に自発活動を計測できた。以上の結果から、網膜、上丘の単独組織での培養は行えたものと言える。

図 7(A)から(B)に変化しているように上丘周辺に組織より剥がれ落ちた神経組織・グリア細胞が活発にネットワークを形成している様子が観察された。培養 2 日後には上丘からの細胞が密集しているため組織間で神経回路が形成されているかを確認することはできなかった(C)。共培養試料において組織周辺に神経細胞が生存し、軸索を伸ばしている様子が観察された(D)。以上より、共培養自体は行えていると考えられるが、電気活動の計測を行うことはできなかった。

#### 4. まとめ

今回は、第一段階として網膜試料のみからなる系の信号記録、第二段階として網膜、上丘培養とその電気計測。また網膜と上丘との共培養を行った。各試料に関して組織周辺に神経細胞・グリア細胞が広がる様子が観察された。さらに培養網膜、上丘においては自発活動が観測された。これにより、網膜、上丘の培養が行うことができ、共培養による神経回路網の構築に向けた研究の基礎が構築できたと考えられる。今後は、視覚情報処理系の *in vitro* 系再構築に向け、大脳皮質視覚野切片試料との共培養も含めた条件の検討を進め、長期培養によって各組織間で信号伝達が形成され、機能することを目指す。また本研究において大きな課題である網膜の光応答性を保存したままでの培養についても検討を進める。網膜において、光感受性は解剖後数時間で失われてしまい、現在のところ長期で維持しできている例を見受けられない。実現に向けては使用する実験対象の年齢選定や、栄養補給に関する検討が特に重要と考えており、その部分に着目し検討を進める。

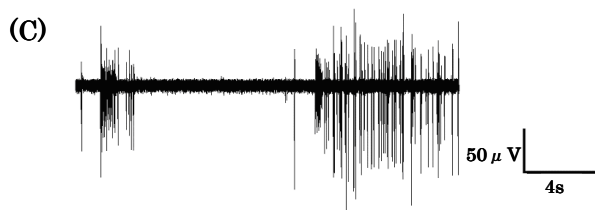
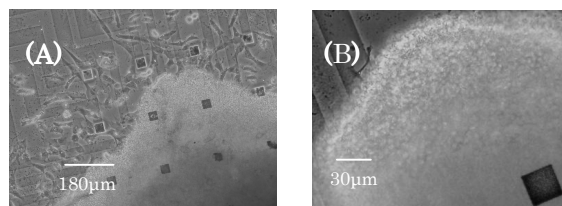


Fig.5 Electrical activity recording from cultured retinal tissue.

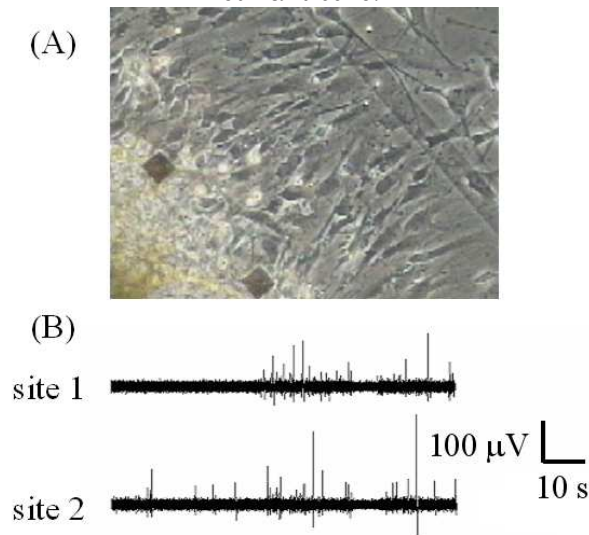


Fig. 6 Electrical activity recording from cultured SC

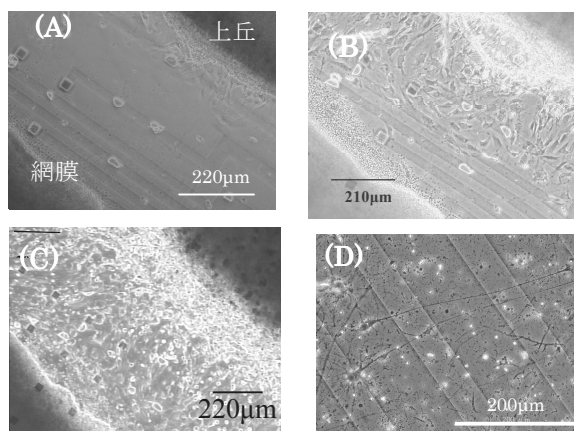


Figure 7. Microphotograph of co-cultured retina and superior colliculus

#### 文献

- [1] Nirenberg S., Meister M, Neuron, 18, 637-650 (1997)
- [2] Lo F., Mize R., J. Neurophysiol., 81 954-958 (1999)
- [3] Yamada K., Yamamoto N., Toyama K., European Journal of Neuroscience, Vol.12, pp.3854-3862, 2000
- [4] Jimbo Y., Robinson H., Bioelectrochem., 51, 107-115 (2000)