

Siウィスカマイクロプローブ電極アレイによる局所網膜電位図の多チャンネル記録 Multiple local electroretinograms from isolated carp retina using Si whisker microprobe electrode array

針本 哲宏(PY)¹⁾³⁾, 石原 彰人²⁾³⁾, 河野 剛士¹⁾, 竹井 邦晴¹⁾, 石田 誠¹⁾, 臼井 支朗³⁾⁴⁾

Tetsuhiro Harimoto(PY), Akito Ishihara, Takeshi Kawano, Kuniharu Takei, Makoto Ishida and Shiro Usui

¹⁾豊橋技術科学大学大学院 工学研究科 電子・情報工学専攻

²⁾中京大学 情報理工学部 ³⁾中京大学 人工知能高等研究所

⁴⁾理化学研究所 脳科学総合研究センター

harimoto-t@dev.eee.tut.ac.jp

Abstract — We recorded multiple local electroretinograms directly from carp isolated retina using the “Si whisker microprobe electrode array” *in vitro* recording technique. Our Si microprobes, each with a few microns in diameter and high array density, were fabricated by a selective vapor-liquid-solid (VLS) Si growth. The analysis of retinal spatiotemporal properties with high spatial resolution is expected by the Si microprobes.

Keywords — Local Electroretinograms, Multi-channel, Si Whisker Microprobe, Isolated Carp Retina, VLS Si growth.

1 はじめに

脊椎動物網膜における視細胞, 水平細胞, 双極細胞, いくつかのアマクリン細胞は, 緩電位を発生させる神経細胞である. これら網膜を構成する細胞の光応答が重畳した応答電位を細胞外記録して得られる混成信号は, 網膜電位図 (electroretinogram: ERG) と呼ばれる[1]. 今日では, ERGはコンタクトレンズ電極を用いるヒトの視機能診断にも広く用いられており, 臨床応用から, 摘出した単離網膜を用いる動物実験まで多くの研究者によって研究されている. 網膜中心部から周辺部までを含む網膜全面に強いフラッシュ光を照射して得られる全視野ERG (full-field ERG) に対し, 網膜上の限られた領域のERGは局所網膜電位図 (local ERG) と呼ばれる. 網膜は部位によって細胞密度が異なるほか, 光受容野の広い細胞など空間的に構造が異なっており, それらの違いから, 複雑なパターンを持つ光刺激を照射することでERG波形も空間的に異なる. したがって, 網膜における空間分布特性の評価には, 多くの部位からの局所ERGを網羅的に計測する必要がある.

局所ERGの導出方法として, 三宅らは網膜黄斑部にスポット光を逐次照射して局所ERGを計測[2]したほか, Sutterや臼井らは多焦点の疑似ランダム系列に明滅する視覚刺激を用いて多数部位の局所ERGを相関法により導出した[3][4]. しかしながら, 多焦点視覚刺激による方法では神経細胞の側方抑制の相殺が懸念されている[5].

我々はこれまでSi基板上に直径数ミクロンの極微小なSiプローブをアレイ状に一括構築する選択的VLS (vapor-liquid-solid) 成長法を用いた神経細胞電位記録電極を開発してきた (図1A参照). これまでの研究において, 我々はVLS基板上に成長させたSiマイクロプローブの単一電極としての性能評価を行い, その電極でERGが記録できることを示した[6].

このようなマルチ電極アレイを局所ERGの計測に用いることで, 実際の網膜から1回の記録で直接的に多数部位の局所ERGを得ることができると考える.

本研究では, 新たに製作したSiウィスカマイクロプローブ電極アレイを用いて, コイ単離網膜からの多チャンネル記録を行ったので報告する.

2 実験の材料と方法

体長約30 cmのコイ (*Cyprinus Carpio*) を1時間以上暗順応させた後, 暗室用赤色光下で眼球を摘出し, 前眼部を切除した眼盂をhyaluronidase (0.1 mg : 10 ml) とRinger液 (NaCl 120; KCl 2.6; CaCl₂ 1.0; MgCl₂ 1.0; NaHCO₃ 28.0; glucose 5.0 mM, pH 7.5) との混合液に浸して硝子体を分解除去した. Ringer液でよく濯いだ後, 眼盂を吸水性の濾紙の上に網膜側を下にして置き, 色素上皮層から網膜を単離し, 神経節細胞側を下にしてディッシュ型チャンバーの電極上に設置した (図1B,C参照).

Siウィスカ微小プローブ細胞外電極アレイは, VLS成長法によりチップ上にSiプローブを成長させ, プローブ側面には絶縁保護のためSiO₂を成膜させた. プローブ先端はAuとし, それ以外は遮光膜としてブラックレジストを塗布した. 電極は直径約2 μm, 40 μm長で8本あり (図2C), インピーダンスは500 Hz時で80 ~ 150 kΩ, No.6のみ1 MΩである.

電極からの信号はヘッドアンプ, メインアンプ (Alpha Med Sciences) で10,000倍され, A/D変換 (National Instruments) を通してPCに集録した. 光刺激には白色LED (Philips Lumileds) を使用した.

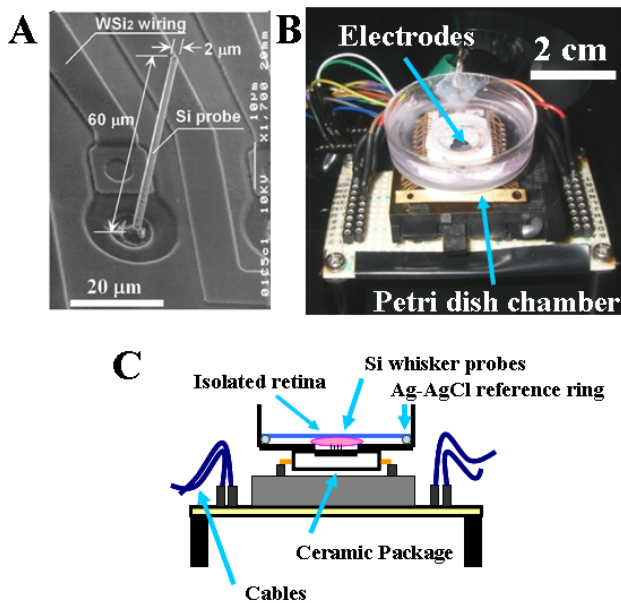


図 1: Si ウィスカ電極アレイを実装した記録チャンパー. **A:** Si ウィスカマイクロプローブ電極の一例[7]. **B:** 網膜光応答を記録するための計測系 (写真). **C:** 横から見たディッシュ型チャンパー. コイ単離網膜は神経節細胞を下側にして電極上に設置した.

3 実験結果

白色フラッシュ光 (1300 lx) を網膜に全面照射したとき, Siプローブ電極アレイで記録された局所ERG波形を図2に示す. ERG信号は5回の加算平均処理後に500 Hz以上の高周波をローパスフィルタで遮断した. 網膜全面に光を照射しているため, ほぼ同じ波形がどのチャンネルからも記録されている. この結果は, 今後, 空間的に差が見られるか確認する際の基準となる.

4 まとめ

本研究では, Siウィスカマイクロプローブ電極アレイを用いて局所ERGの多チャンネル記録を行った. 現段階では8 chではあるが, 現在さらに大規模な多チャンネルプローブの製作も進めており, 将来に期待が持てる結果といえる. 今後は, 多焦点刺激を用いて, 多入力多出力による網膜の時空間局所応答分布特性の解析を中心に進めていく.

謝辞

本研究に一部は, グローバルCOEプログラム「インテリジェントヒューマンセンシングのフロンティア」, 科学研究費補助金 (基盤研究 (S)), 中京大学特定研究助成によるものである. 記して感謝する.

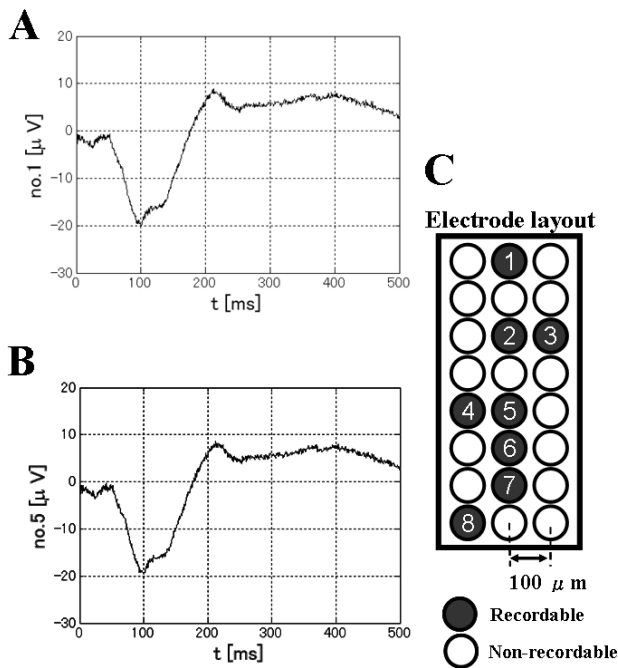


図 2: 局所網膜電位図のマルチチャンネル記録の一例. プローブ No.1 (A) と No.5 (B) で記録された局所 ERG. C: 電極レイアウト. 数字はプローブ番号を示す. 各電極間距離は 100 μ m ピッチで配置されている. 記録された波形は信号処理の際にカットオフ周波数 500 Hz のローパスフィルタで処理した.

参考文献

- [1] 富田恒男 (1983) “ERG波の細胞起源”, 日本眼科学学会誌, **4**, 1, 1-13.
- [2] 三宅養三 (1988) “黄斑部疾患の基礎と臨床—黄斑部局所ERGの研究”, 日本眼科学会誌, **92**, 1419-1449.
- [3] E. E. Sutter and D. Tran (1992) “The field topography of ERG components in man: I: The photopic luminance response”, *Vis. Res.*, **32**, 433-446.
- [4] S. Usui and E. Nagasaka (1994) “Spatial distribution of local flash electroretinogram by multi-input stimulation”, *Doc. Ophthalmol.*, **88**, 1, 57-63.
- [5] M. Wilims and E. Reinhard (2005) “Spatiotemporal receptive field properties of epiretinally recorded spikes and local electroretinograms in cats”, *BMC Neurosci.*, **6**, 50, 1-14.
- [6] T. Harimoto, A. Ishihara, T. Kawano, M. Ishida and S. Usui (2005) “Recordings of retinal light responses by silicon microprobe array”, *ICONIP 2005, Taipei, Taiwan*, 270-275.
- [7] T. Kawano, H. Takao, K. Sawada and M. Ishida (2003) “Multichannel 5x5-Site 3-Dimensional Si Microprobe Electrode Array for Neural Activity Recording System”, *Jpn J. Appl. Phys. Part 1*, **42**, 4B, 2473-2477.