

博士論文

心臓自律神経調節システムの
in vitro 再構成

大岩 孝輔

目次

第1章 序論

1-1 研究背景	2
1-1-1 不整脈と心房細動	2
1-1-2 心拍制御システムとしての自律神経系	4
1-1-3 心房細動の治療手法	7
1-1-4 マイクロ加工技術を利用した神経-心筋 <i>in vitro</i> 系の研究	10
1-2 本論文の目的	12
1-3 本論文の構成	13

第2章 自律神経細胞の培養と活動評価

2-1 心拍制御に関与する自律神経系	15
2-1-1 解剖学的構造	15
2-1-2 伝達物質と受容体	16
2-2 実験方法	19
2-2-1 細胞培養	19
2-2-2 神経回路活動計測	22
2-2-2-1 電気活動計測	22
2-2-2-2 細胞内 Ca^{2+} 濃度計測	26
2-3 実験結果	27
2-3-1 ICG 神経細胞採取-培養プロトコルの改良	27
2-3-2 細胞種の同定	29
2-3-3 神経回路活動	34
2-3-3-1 自発電気活動計測	34
2-3-3-2 細胞内 Ca^{2+} 濃度変化	35
2-4 考察	39
2-4-1 副交感神経細胞採取と培養	39
2-4-2 培養系に含まれる細胞種	40
2-4-3 培養自律神経系における神経回路活動	42
2-5 結論	43

第3章 自律神経細胞—心筋細胞共培養システムの構築

3-1 自律神経系による心拍制御システムの研究	45
3-2 実験方法	46
3-2-1 共培養システム	46
3-2-1-1 共培養システムの設計	46
3-2-1-2 鋳型の作製	49
3-2-1-3 培養チャンバの作製	51
3-2-1-4 MEA 基板の作製	52
3-2-1-5 共培養デバイスの構築	52
3-2-2 細胞培養	53
3-2-3 共培養システムの形態的評価	54
3-2-3-1 蛍光細胞リンカー法	54
3-2-3-2 免疫組織化学染色法	54
3-2-4 電気活動計測による神経支配の評価	54
3-2-4-1 自律神経細胞の活動による心房筋細胞の拍動リズムの評価	55
3-2-4-2 自律神経細胞群に対する電気刺激実験	55
3-2-5 心房細動モデルとしての共培養システムの評価	56
3-3 実験結果	56
3-3-1 共培養システムの形態的評価	56
3-3-2 共培養システムの機能的評価	60
3-3-2-1 自発電気活動計測	60
3-3-2-2 定常状態における心房筋細胞群の活動評価	63
3-3-2-3 自律神経細胞群に対する電気刺激	64
3-3-3 心房細動モデルとしての共培養システムの評価	72
3-4 考察	76
3-4-1 共培養システムの機能評価	76
3-4-2 自律神経細胞の自発活動による心房筋細胞拍動リズムの変動	78
3-4-3 心房細動モデルとしての可能性	78
3-5 結論	79

第4章 自律神経細胞に対するマイクロ磁気刺激システムの構築

4-1 磁気刺激法	81
4-1-1 磁気刺激法の誕生とその応用	81
4-1-2 磁気刺激の空間分解能向上に向けた研究の現状	81
4-1-3 自律神経系に対する磁気刺激の可能性	82
4-2 実験方法	82
4-2-1 マイクロ磁気刺激システム	82
4-2-2 コンピュータシミュレーションによるコイル温度上昇, 磁界分布及び誘導電流分布の推定	87
4-2-3 細胞培養	92
4-2-4 マイクロ磁気刺激システムの形態的評価	92
4-2-5 磁気刺激印加システム	92
4-2-6 神経細胞の活動評価	93
4-2-7 自律神経軸索に対する磁気刺激実験プロトコル	93
4-2-8 生体外からの自律神経刺激を想定したコンピュータシミュレーション	93
4-3 実験結果	95
4-3-1 コンピュータシミュレーションによるコイル温度上昇, 磁界分布及び誘導電流分布評価	95
4-3-2 マイクロ磁気刺激システムの形態的評価	97
4-3-3 磁気刺激による神経細胞の活動評価	97
4-3-3-1 刺激頻度による神経細胞の活動変化	97
4-3-3-2 微小コイルの配置による神経細胞の活動変化	103
4-3-4 磁気刺激の空間分解能評価	105
4-3-5 生体外からの自律神経刺激を想定したコンピュータシミュレーション	107
4-4 考察	109
4-4-1 磁気刺激頻度による神経細胞の活動変化	109
4-4-2 微小コイルの配置による神経細胞の活動変化	110
4-4-3 微小コイルによる磁気刺激の空間分解能評価	110
4-4-4 生体外からの自律神経刺激の可能性	110
4-5 結論	111

第5章 結論と展望

5-1 結論	113
5-2 今後の展望	115
謝辞	116
参考文献	118
業績	137

略語一覧

AC	Adenylate Cyclase (アデニル酸シクラーゼ)
ACDD	Aromatic L-amino Acid Decarboxylase (芳香族アミノ酸脱炭酸酵素)
ACh	Acetylcholine (アセチルコリン)
AChE	Acetylcholinesterase (アセチルコリンエステラーゼ)
AM	Acetoxymethyl (アセトキシメチル)
ANS	Autonomic Nervous system (自律神経系)
AR	Adrenergic Receptor (アドレナリン受容体)
ATP	Adenosine Triphosphate (アデノシン三リン酸)
BDNF	Brain Derived Neurotrophic Factor (脳由来神経栄養因子)
cAMP	Cyclic Adenosine Monophosphate (環状アデノシン一リン酸)
ChAT	Choline Acetyltransferase (コリンアセチル基転移酵素)
CHT	Choline Transporter (コリントランスポーター)
CNTF	Ciliary Neurotrophic Factor (毛様体神経栄養因子)
COMT	Catechol-O-Methyltransferase (カテコール-O-メチル基転移酵素)
cTnI	Cardiac troponin-I (トロポニン I)
C.V.	Coefficient of variation (変動係数)
DAPI	4',6-DiAmidino-2-PhenylIndole dihydrochloride
DBH	Dopamine- β -Hydroxylase (ドーパミン β 水酸化酵素)
DIV	Days <i>in vitro</i> (培養日数)
DMEM	Dulbecco's modified Eagle medium (ダルベッコ・フォークト変法イーグル最小必須培地)
EGF	Epidermal Growth Factor (上皮成長因子)
EPSC	Excitatory Postsynaptic Current (興奮性シナプス後電流)
FBS	Fetal Bovine Serum (ウシ胎児血清)
GDNF	Glial cell line-Derived Neurotrophic Factor (グリア細胞由来神経栄養因子)
HBSS	Hank's Balanced Salt Solution (ハンクス平衡塩溶液)
HEPES	2-[4-(2 Hydroxyethyl)-1-piperazinyl]ethanesulfonic acid
HEX	Hexamethonium (ヘキサメトニウム)
HMDS	Hexamethyldisilazane (ヘキサメチルジシラザン)
IBI	Inter-Beat-Interval (拍動間隔)
ICG	Intracardiac Ganglion (心臓神経節)
ITO	Indium-tin-oxide (酸化インジウムスズ)
LIF	Leukemia Inhibitory Factor (白血病抑制因子)

mAChR	Muscarinic Acetylcholine receptor (ムスカリン性アセチルコリン受容体)
MEA	Microelectrode Array (微小電極アレイ)
MEM	Minimum Essential Medium Eagle (イーグル最小必須培地)
NA	Noradrenaline (ノルアドレナリン)
nAChR	Nicotinic Acetylcholine Receptor (ニコチン性アセチルコリン受容体)
NGF	Nerve Growth Factor (神経栄養因子)
NPY	Neuropeptide Y (ニューロペプチド Y)
PBS	Phosphate Buffered Saline (リン酸緩衝生理食塩水)
PDMS	Polydimethylsiloxane (ポリジメチルシロキサン)
pe-st	Penicillin-Streptomycin (ペニシリンストレプトマイシン)
PFA	Paraformaldehyde (パラホルムアルデヒド)
PKA	Protein Kinase A (プロテインキナーゼ A)
PKH	Paul Karl Horan
SCG	Superior Cervical Ganglion (上頸神経節)
TH	Tyrosine Hydroxylase (チロシン水酸化酵素)
TMS	Transcranial Magnetic Stimulation (経頭蓋磁気刺激)
rTMS	Repetitive Transcranial Magnetic Stimulation (反復経頭蓋磁気刺激)

第1章 序論

心臓は全身に血液を循環させるポンプ機能を持ち、不整脈をはじめとするその不調は、生体恒常性の維持に重篤な影響を与える。心房細動は最も一般的に見受けられる不整脈であるが、生命の危機に直結する心室細動に比べ研究が進んでいない。心房細動の発症率が加齢に伴い顕著に増加することを考慮すると、超高齢社会に突入した日本において、心房細動発症メカニズムの解明を通じた早期診断・治療手法の確立は重要な課題である。心房細動の発症と日常生活におけるストレスや不規則な生活習慣の相関から、自律神経系の関与が示唆される。自律神経活動の乱れによる心房細動の発生機序を理解することができれば、薬物投与、電気・磁気等物理的な刺激を含めて新たな治療の可能性が開かれる。自律神経活動を指標とする生活習慣の見直しを通じて予防医学への展開も期待できる。

心房細動の治療手法には薬物療法と非薬物療法があるが、副作用や侵襲性の点でいずれも限界がある。磁気刺激はある程度離れたところにある組織に対する刺激効果を有する手法であるが、標的として自律神経系を想定する場合、十分な空間分解能が得られていない。マイクロコイルを設計し、その配置を最適化することにより、自律神経系の活動異常による心房細動の非侵襲的な治療技術になる可能性がある。

上記事項を勘案し、本論文では「自律神経系の活動異常による心房細動」に焦点を当て、その発症メカニズム解明と非侵襲的な治療技術の確立に向けて必要とされる要素技術を開発し、基礎的な知見を得ることを目的とする。具体的には、自律神経系の構成要素である交感神経／副交感神経細胞と心房筋細胞を共培養したマイクロデバイスを開発し、交感神経の過剰活動に起因する心拍リズム変調発生の観測を目指す。併せてマイクロ磁気刺激システムの設計・試作を行ない、自律神経刺激への応用の可能性につき検討する。

1-1 研究背景

1-1-1 不整脈と心房細動

心臓は全身に血液を循環させるポンプ機能を持つ。不整脈をはじめとするポンプ機能の不調は、生体恒常性の維持において重篤な影響を与える。平成 25 年度における死因分類別に見た死亡者数に着目すると、心疾患による死亡者数は、悪性新生物による死亡者数に次いで第 2 位であり、196,547 人となっている。心疾患による全死亡者数の中でも、致死性不整脈及び刺激伝導系の障害による死亡者数は 28,660 人となり、心疾患による全死亡者数に対し 14.6%を占めている [厚生労働省 平成 25 年人口動態統計月報年計]。

代表的な不整脈に心室細動と心房細動がある。心室細動は全身に血液を送り出す心室が不規則に痙攣し血液を全身に送り出すことができない状態であり、致死性不整脈と位置づけられる [de Luna et al. 1989]。心室細動に関する研究報告は多く、臨床例の他、現象としての理解や発生機序解明に向けた研究が進められている。心臓標本を電位感受性色素で染色することにより、その異常興奮現象を時空間パターンとして可視化する光学マッピングを利用した研究 [Kim et al. 1997; Lee et al. 2001]、細胞内 Ca^{2+} 濃度変動に焦点を当て、筋小胞体から放出される Ca^{2+} が心室細動の維持に寄与することを示唆した報告 [Omichi et al. 2004; Goldhaber et al. 2005]などがある。

これに対し、心房内で起こる高頻度無秩序な電氣的興奮が不規則に心室に伝わることで起こる頻拍を心房細動と呼ぶ。心房細動は最もありふれた不整脈であり [Benjamin et al. 1998; Go et al. 2001]、患者数は米国で 220 万人、欧州で 450 万人 [Fuster et al. 2011]、国内でも 70 万人以上 [井上他 2013]と推定されている。初期には細動が起こっても自然に復帰する一過性・発作性心房細動として発現し、直ちに命に関わることはほとんどない。しかし、長期間の頻脈状態の持続は心房筋肥大や心房線維化、ギャップ結合の変化など構造的リモデリングにつながり、持続性・永続性心房細動の基質となる。また、心房の不規則な収縮が血液の流れを阻害した結果血栓ができ、脳

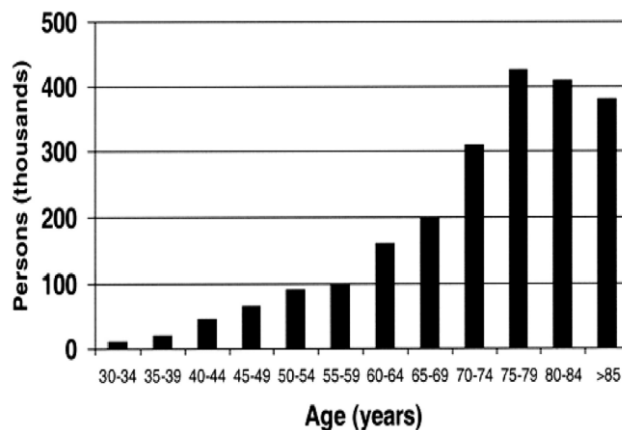


Fig. 1-1 加齢に伴う心房細動発症の増加 [Fuster et al. 2011]

梗塞を引き起こすこともある。心房細動患者における脳梗塞の発症率は、非心房細動患者と比較しておよそ5倍とされ [Wolf et al. 1991], 脳梗塞の15%は心房細動による血栓が原因と考えられている [井上他 2013]. さらに特徴的な傾向として、加齢と共に発症確率が高くなることも知られている (Fig. 1-1) [Fuster et al. 2011]. これらの事項を勘案すると、心室細動に比べて研究の少ない心房細動について、早い段階で診断し治療を行なうために、発症メカニズムの解明を通じて予防の方策を確立することが、超高齢社会に突入した日本では特に重要な課題であると言える。

1628年のHarveyによる動物の死の直前に心房が細動することの発見が心房細動に関する初めての報告とされている [McMichael 1982]. その後、発症メカニズムに関する研究が進められ、僧帽弁狭窄症などの器質的な原因により心房細動が誘発されることが報告されたのが20世紀前半である [Clarence et al. 1934; Wood 1954]. さらに、最近になって器質的な原因が認められないにも関わらず心房細動が発症する事例(孤立性心房細動)が少なからず存在することが認識され、そのような症例では: (1) 仕事のストレスの蓄積 [Fransson et al. 2015; Torén et al. 2015], (2) 肥満度を表すBody Mass Index (BMI) の増加 [Wilhelmsen et al. 2001; Wang et al. 2004; Frost et al. 2005; Dublin et al. 2006], (3) アルコール摂取量の増加 [Conen and Albert 2011; Larsson et al. 2014] との相関関係があることがわかってきた。心房細動が日常生活におけるストレスや不規則な生活習慣と関係する、すなわち自律神経系による心拍制御システムの関与が示唆される。

実際に、自律神経系の活動異常が心房細動発症につながることを示した報告もある [Binkley et al. 1991; Coumel 1994; Malliani et al. 1994; McCully et al. 2013]. Yamashitaらは、心房細動発作の日内変動の観察を行なうことで、心房細動を交感神経活動の亢進に起因する交感神経依存型と、迷走神経活動の亢進に起因する迷走神経依存型に分類している [Yamashita et al. 1998]. 動物実験により自律神経の活動と心拍の同時計測を行なった例もある。Tanらは、埋め込み電極を利用して、交感神経である星状神経節及び副交感神経である迷走神経、さらに心臓電気活動の同時計測を行ない、交感・副交感両方の神経活動が同時に賦活された場合に心臓の拍動間隔が短縮することを示した (Fig. 1-2) [Tan et al. 2008]. その後、同じ研究グループにより、左側迷走神経に対する電気刺激による星状神経節の活動抑制、それに対応した心拍低下も確かめられている [Shen et al. 2011].

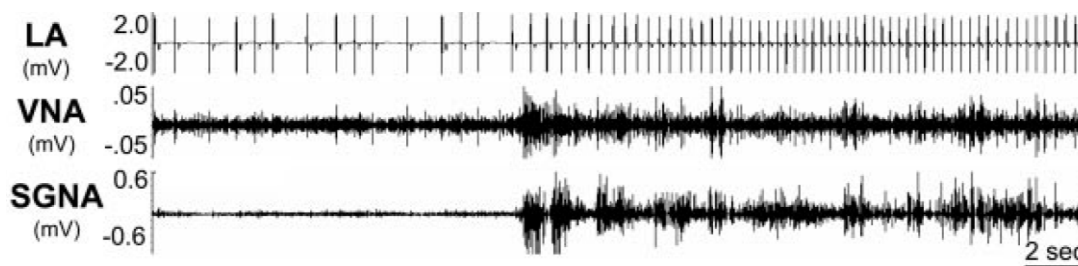


Fig. 1-2 自律神経－心房電気活動の同時計測 [Tan et al. 2008]. 左心房 (Left Atrial; LA) の電気活動発生間隔が、迷走神経活動 (Vagal Nerve Activity; VNA) と星状神経節の活動 (Stellate Ganglion Nerve Activity; SGNA) の同時賦活時に短くなっていることがわかる。

自律神経活動による心拍制御のメカニズム、自律神経活動の乱れによる心房細動の発生機序を理解することができれば、自律神経活動を制御する薬物の投与、電気・磁気等物理的な作用を利用した刺激による新たな治療の可能性が開かれる。メカニズム理解に基づき、加齢という要素も勘案した上で自律神経活動を適切に保つ生活習慣を提案することが可能になれば、予防医学の観点からも大きな意義がある。

1-1-2 心拍制御システムとしての自律神経系

緊張したとき—交感神経優位の状態—には心拍が増加し、リラックスしたとき—副交感神経優位の状態—には心拍が低下することは日常的に経験されることであり、そのバランスが崩れた状態の長期間の継続が心疾患を誘導する要因になり得ることは容易に想像できる。しかしながら、自律神経系に焦点を当てた基礎研究はあまり多くない。自律神経系を「節前細胞からの入力に応じて標的組織の活動を制御する出力を送る中継システム(であり、それ以上の情報処理機能はない)」と位置づける考え方が一般的だったことが、恐らくその理由である。結果として、自律神経細胞の集団である神経節組織内に相互結合を有する神経回路が形成されているか、そのネットワークが情報の処理や統合といった機能を持つか、さらには入力や活動の履歴に依存して変化する可塑性を有するか、といった課題が注目されることはないまま推移してきた。

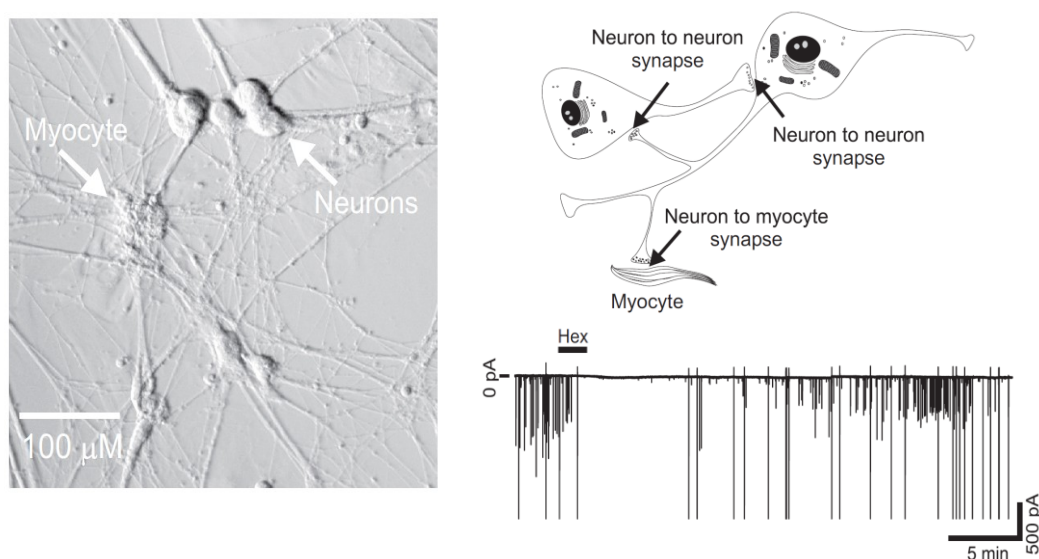


Fig. 1-3 交感神経細胞—心室筋細胞共培養系の構成とその電気活動 [Luther et al. 2013] SCG 神経細胞と心室筋細胞を共培養してその位相差顕微鏡画像からシナプス結合の模式図を描いている。SCG 神経細胞—心室筋細胞間だけでなく SCG 神経細胞—SCG 神経細胞間にもシナプス結合が形成されている。さらに、SCG 神経細胞に流れ込むシナプス電流を計測し、それが nAChR の遮断薬である HEX の投与により消失することを示している。

最近、交感神経細胞が形成する結合とその信号伝達に関する実験結果が報告された。交感神経節の1つである上頸神経節 (Superior Cervical Ganglion; SCG) を構成する神経細胞 (以下 SCG 神経細胞とする) と心室筋細胞を実験動物から採取し、これらの細胞群が混在した状態で培養、パッチクランプ法を利用した細胞膜電位計測から、培養3日目では SCG 神経細胞の自発的な電気活動は見られず、3週目になって自発電気活動が観測されることを示したものである [Vega et al. 2010]。培養系であるため SCG 神経細胞に対する節前細胞からの入力には存在せず、それにも関わらず自発活動が発生したことは、SCG 神経細胞同士の機能的シナプス結合の存在を示唆する。その後、この系で作用するシナプス伝達物質に関する実験も行なわれ、ニコチン性アセチルコリン受容体 (nicotinic AcetylCholine Receptor; nAChR) に対するアンタゴニストであるヘキサメトニウム (Hexamethonium; HEX) の添加により自発電気活動が消失するという実験結果が示された (Fig. 1-3) [Luther et al. 2013]。節前細胞の神経伝達物質と考えられていた ACh を放出する細胞が SCG 組織内にも含まれていることを示したものである。同時に、SCG 神経細胞から記録される興奮性シナプス後電流 (Excitatory PostSynaptic Current; EPSC) の振幅が、脳由来神経栄養因子 (Brain Derived Neurotrophic Factor; BDNF) の添加により増大すること—すなわちここで形成されているシナプス結合が可塑性を有し、結合強度が BDNF により制御されている可能性—も報告された。2015年には、ダブルパッチ記録を適用したシナプス前後のニューロン対からの同時記録も行なわれ、SCG 神経細胞群単独培養系における nAChR を介するシナプス結合の存在が直接確認されるとともに、結合形成の確率が毛様体神経栄養因子 (Ciliary Neurotrophic Factor; CNTF) の添加により増加することが示された [Amendola et al. 2015]。自律神経節内部での神経回路形成、形成されているシナプスの可塑性が現実のものとなってきている状況である。ただし、ネットワークとしての自律神経細胞の活動を実際に観測した例はない。

電気活動計測の他に神経細胞の活動を可視化する手法として、蛍光色素を利用して細胞内部の Ca^{2+} 濃度変化を画像化する方法がある。この手法を利用して、Lai らは SCG 神経細胞の培養2日目における Ca^{2+} 濃度変動を観測している [Lai et al. 2012]。しかしその報告は単一の時点、単一細胞の信号に限定されており、神経回路網として、その形成過程を含めた長期的な変化については全くわかっていない点は電気生理計測と同様の状況である。

交感神経細胞に比べて、副交感神経細胞に関する報告は極めて少ない。その理由は技術的な難しさにある。交感神経細胞が神経節を形成し、細胞集団として容易に採取できるのに対し、副交感神経細胞は標的組織の表面に分散して存在することが一般的であり、純度の高い細胞群として採取することが難しい。その結果、培養プロトコルも確立されていない状況で推移しており、急性の試料で薬理刺激による誘発応答計測を実施した報告が唯一のものである [Hirayama et al. 2015]。心臓の機能調節に関与するとされる心臓神経節 (IntraCardiac Ganglia; ICG) 付近から採取した単離直後の ICG 神経細胞にパッチクランプ法を適用、ACh を添加して誘発応答が観測されたという結果が示されている。ICG 神経細胞については Ca^{2+} 濃度計測は行なわれていない。

以上、交感神経細胞については神経節組織内での相互シナプス結合の存在とその可塑性を示唆する報告が増えつつあるが、副交感神経についてはほとんどわかっておらず、また両者とも、ネ

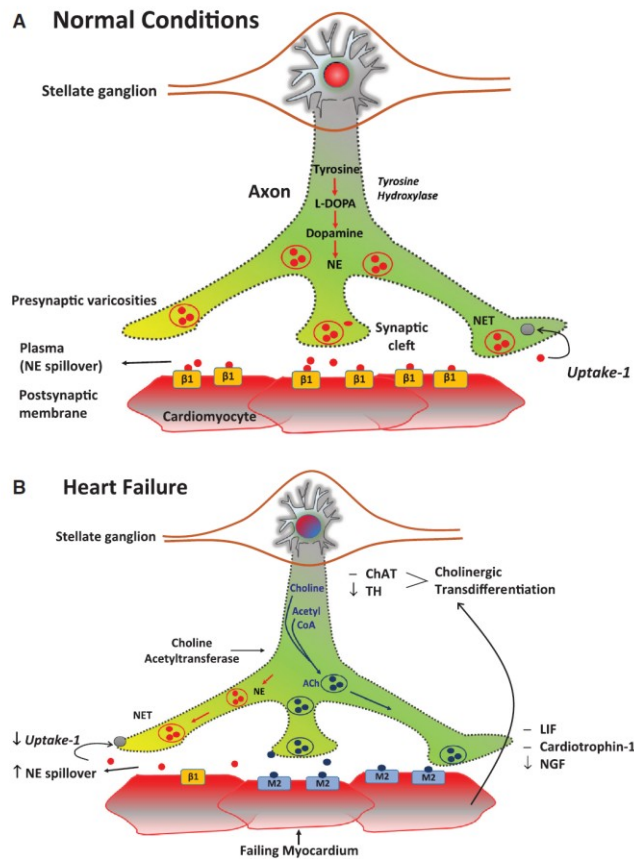


Fig. 1-4 交感神経細胞の分化転換. 心疾患では心筋は ACh 受容体サブタイプである M2 の発現が増加する. M2 受容体の増加は, 結果として交感神経賦活時の β -アドレナリン応答の減少とコリン作動性応答の増強をもたらすことになる [Fernandez and Canty 2015].

ネットワークレベルの活動計測は行なわれていないのが現状である.

活動電位や細胞内 Ca^{2+} 変動といった activity の計測がほとんど行なわれていなかったことと対照的に, 自律神経系では分化転換 (transdifferentiation; 既に分化した細胞が別の細胞種に転換する現象) という特異な現象が報告されていた. Patterson らは, 交感神経細胞と非神経細胞を混在して培養したところ, 交感神経細胞から放出される ACh 量が増大したという計測結果を示し, 非神経細胞から放出される物質の作用で交感神経細胞が副交感神経細胞に分化転換することを報告した [Patterson and Chun 1974]. その後, 分化転換を誘導する分子の同定が行なわれ, これまでに上皮成長因子 (Epidermal Growth Factor; EGF) [Fukada 1980], インターロイキン-6 (IL-6) サイトカインファミリーの 1 つである白血病抑制因子 (Leukemia Inhibitory Factor; LIF) [Yamamori et al. 1989] の関与が報告されている. LIF については, その作用機構として IL-6 に対する受容体を構成する分子である gp130 を介することが示されている [Bamber et al. 1994; Stanke et al. 2006]. 分化転換という現象は, 現時点では自律神経系における特異な可塑性の 1 形態と考えられているが, これを脳神経組織で一般的に起こり得る現象とする考え方もある [Spitzer 2015].

最近, この分化転換が心疾患にも関係する可能性を示唆する報告が増えてきている. Hirota ら

は心不全時における心筋細胞上に LIF が多数発現することを報告し、交感神経細胞の分化転換が心不全の発症に関与する可能性を示した [Hirota et al. 2004]. Kanazawa らは、心不全を引き起こしたラットの交感神経を染色することで、副交感神経のマーカーであるコリントランスポーター (Choline Transporter; CHT) やコリンアセチル基転移酵素 (Choline Acetyltransferase; ChAT) が発現していること示し、さらに gp130 をノックアウトしたマウスでは、分化転換が起こらないことを報告した [Kanazawa et al. 2010]. Fig. 1-4 に心疾患に関連する分化転換の考え方 [Fernandez et al. 2015] を示す. 本来交感神経として興奮性に寄与する細胞が抑制性になり、これに対応して伝達物質や受容体も変化するというものである. 分化転換に関しては、副交感神経でもその存在を示唆する報告がある. ICG を含む心房表面組織全体を採取し、免疫染色によりその構成要素を評価したところ、コリン作動性マーカーだけでなくアドレナリン作動性マーカーも発現しているという結果が得られ [Armour 2004; Hoover et al. 2009], ICG 神経細胞もまた、神経栄養因子など外部環境に依存して分化転換を起こす可能性が示された.

1-1-3 心房細動の治療手法

現在の心房細動治療手法は、薬物療法と非薬物療法の 2 つに大別される.

薬物療法としては、主として β 拮抗薬 [Atwood et al. 1987; Kanitz et al. 1990] や Ca 拮抗薬 [Bénardeau et al. 2001] を用いた治療が行なわれており、近年では、アンジオテンシン II 受容体拮抗薬が心房細動治療に効果的であることも示されている [Wachtell et al. 2005; Nagayama et al. 2015]. 薬物療法は最も広く用いられている手法であるが、対症療法であり副作用が無視できないこと、長期間の服用が薬剤耐性を引き起こす場合があることが知られており、心房細動発生メカニズムの理解に基づく治療手法の開発が望まれている状況である.

非薬物療法としてはカテーテルアブレーション [Haïssaguerre et al. 2000; Oral et al. 2002] と迷走神経に対する電気刺激がある. カテーテルアブレーションは、血管を経由して心臓に挿入したカテーテルを利用して異常な拍動の発生源を焼灼除去する方法である. 心房細動の発生源が肺静脈やその周辺の左心房の後壁にある場合が多いことが 1998 年に報告され [Haïssaguerre et al. 1998], 肺静脈に対するアブレーションが多く行なわれているが、再発率が高いことがその課題とされている. Fig. 1-5 はカテーテルアブレーションを適用した患者 100 名について術後の経過を調べた報告であるが、1 回の治療で効果があった患者は全体の約 1/3 であり、再発した患者のうち 2 回目のアブレーション治療を受けた場合でもその 6 割は再発が防げなかったことが示されている [Weerasooriya et al. 2011]. 迷走神経刺激は、迷走神経活動の賦活が交感神経活動の抑制につながることを着目し、交感神経系の活動異常による心房細動の治療手法として適用されているものである [Schauerte et al. 1999; Shen et al. 2011; Singh et al. 2014]. 頸部右側の迷走神経付近に電極を埋め込み (Fig. 1-6), 電気刺激により神経活動を誘導する. 自律神経活動の制御により心房細動の抑制を可能にする手法であるが、電極の体内への埋込みという侵襲性は避けられない.

近年、非侵襲的な治療技術として生体外部から時間的に変動する磁界により生体内に誘導電流を発生させ、誘導電流による生体組織や神経系に対する刺激を行なう磁気刺激法が開発され

[Barker et al. 1985], 外科手術を行なうことなく生体組織の刺激を行なうことができるという特徴により, その応用が広がりつつある. これまでのところ, 磁気刺激の適用対象は主に脳であり, 自律神経系や末梢神経系に対する磁気刺激の報告例はほとんどない. 自律神経系に対する磁気刺激が実現すれば, 自律神経系の活動異常による心房細動の非侵襲的な治療技術の確立に繋がるのが期待できる. しかし, 現在用いられている磁気刺激システムの空間分解能は低く, 自律神経系, 特に交感神経や副交感神経に対する選択的, 局所的な刺激は困難である. コイルの設計やその配置の最適化による磁気刺激の空間分解能向上が課題である.

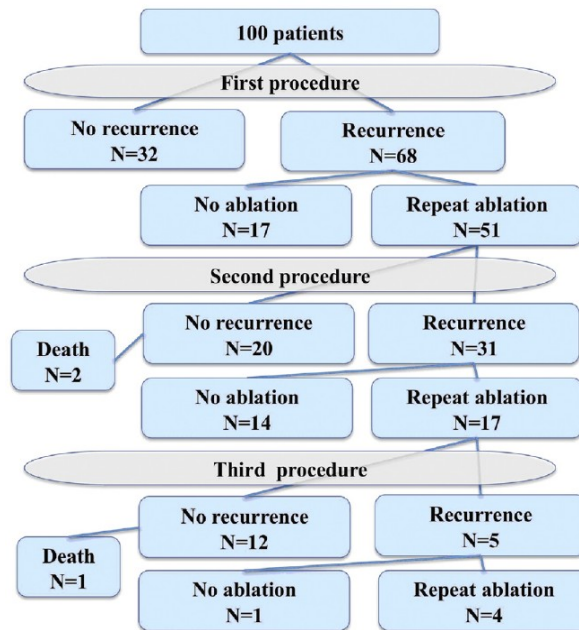


Fig. 1-5 カテーテルアブレーション適用患者 100 名の術後経過 [Weerasooriya et al. 2011]

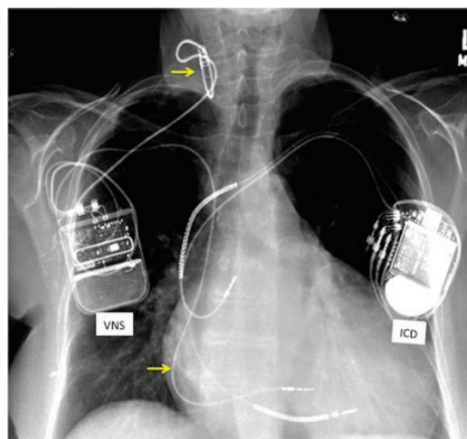


Fig. 1-6 生体内に埋め込まれた除細動器 (Implantable Cardioverter Defibrillator; ICD)と迷走神経刺激 (Vagus Nerve Stimulation; VNS) 装置 [Singh et al. 2014]

1-1-4 マイクロ加工技術を利用した神経—心筋 *in vitro* 系の研究

「交感—副交感神経からなる自律神経システムによる支配を受ける心筋細胞群」を *in vitro* システムとして構成することができれば：(1) 自律神経細胞群のネットワークとしての活動観測，(2) 自律神経活動と心筋拍動リズムの相関，(3) 自律神経活動の亢進状態を人為的に作り出した場合の心筋拍動への影響，(4) 自律神経に対する電気・磁気刺激条件の最適化，などが期待できる。

心筋細胞群の培養手法は確立されており，拍動や活動電位の記録が報告されている [Braam et al. 2010; Natarajan et al. 2011; Stancescu et al. 2015]。Fig. 1-7 は微小電極アレイ (MicroElectrode array; MEA) による電気活動計測を行なった例である。MEA はフォトリソグラフィを利用して基板上に多数の微小電極を形成し，その上で培養された細胞の電気活動を細胞外電位として記録するという手法である。多数の細胞から空間的に広がる信号を計測できる，非侵襲性ゆえに長期的な活動変化の追跡が可能，さらには様々な点からの電気刺激が可能という特徴がある。Fig. 1-7 の例では，心筋細胞に特有の活動電位波形—神経細胞に比べて継続時間が長い—が記録されている。心筋細胞については，電気信号だけでなく，機械的な特性を対象とする計測デバイスも報告されている。Fig. 1-8 はその例であり，3次元加工技術を利用して作製したマイクロカンチレバー構造上で心筋細胞を培養することにより，その収縮力を評価したものである [Wilson et al. 2010; Grosberg et al. 2011; Agarwal et al. 2013; Stancescu et al. 2015]。

交感神経細胞群の培養手法は確立されており，標準的な電気生理計測手法であるパッチクランプ法を適用した活動計測が行なわれてきたのは前述の通りである。MEA を適用し，交感神経細胞と心筋細胞を1枚の基板上で共培養，両者の信号を同時に計測した結果が2011年に報告された [Takeuchi et al. 2011]。しかしながら，副交感神経細胞については培養プロトコルから検討が必要な状況であり，これを含めた「交感—副交感神経からなる自律神経システムによる支配を受ける心筋細胞群の *in vitro* 再構成」は実現されていない。

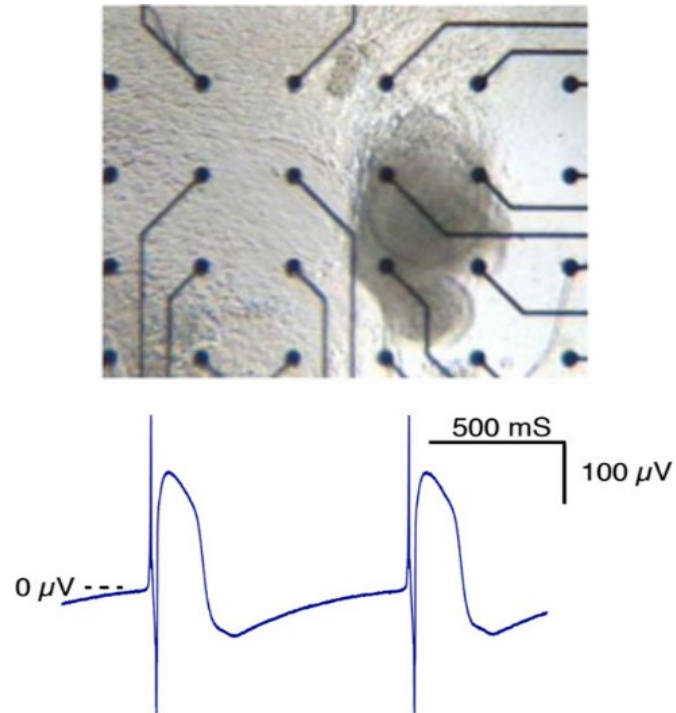


Fig. 1-7 MEA 基板上で培養した心筋細胞と記録された細胞外電位波形
[Braam et al. 2010]

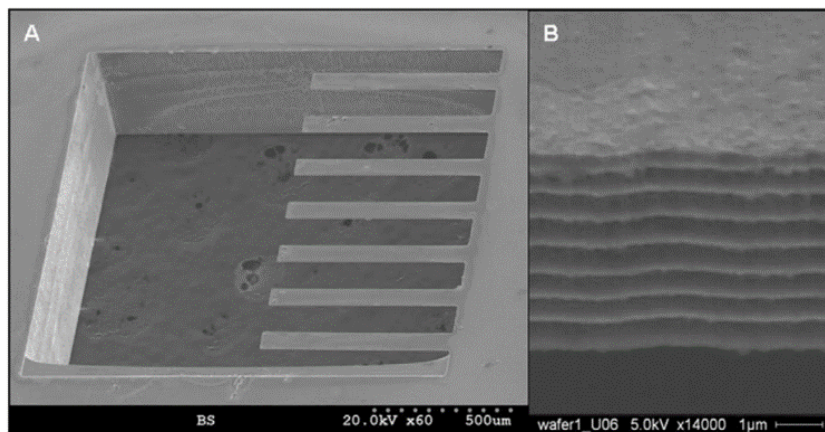


Fig. 1-8 心筋細胞の収縮力を測定するためのマイクロカンチレバー
(A):全体図, (B):マイクロカンチレバー部分の拡大図 [Wilson et al. 2010]

1-2 本論文の目的

自律神経系の活動異常に起因する心房細動に焦点を当て、その発症メカニズム解明と、非侵襲的な心房細動治療技術の確立を目指して必要な要素技術を開発、基礎的な知見を得ることが本論文の目的である。この目的に向けて以下の3つの課題を設定する。

- (1) 自律神経細胞群培養手法の確立とネットワークとしての活動の観測
- (2) 交感神経細胞, 副交感神経細胞, 心筋細胞の3要素からなる共培養システムの構築
- (3) 自律神経系に対する磁気刺激を想定したマイクロ刺激システムの設計, 刺激条件の検討

(1) については、副交感神経細胞の培養手法確立が鍵となる。交感神経細胞, 副交感神経細胞それぞれが形成すると想定される神経回路について、MEA を利用した電気活動計測, Ca^{2+} イメージングを用いた活動計測を実施する。細胞間相互作用に基づく同期活動の検出, 薬理操作による神経伝達物質の同定を目標に実験を行なう。

(2) については、3つの細胞培養区画を集積化した基板を設計・製作して共培養を行なう。自律神経支配を受けることによって生じる心筋細胞拍動リズム変化の検出を目指す。さらに、交感神経細胞群に慢性電気刺激を印加, 心筋拍動リズム変化の誘導を試みる。不可逆な変化を誘導する条件を見出すことが自律神経系の活動異常に起因する心房細動発症メカニズムの解明につながると考えられ、これを目標に実験と解析を進める。

(3) については、生体外からの非侵襲的な刺激印加の可能性を有する磁気刺激につき、特にその空間分解能向上を目指してシミュレーションと実験を行なう。自律神経線維を一方向に伸長させ、これに様々な角度で微小コイルを配置した系につき、有効な刺激強度と空間分解能を見出すことを目標にシミュレーションを行ない、実際にデバイスを試作して刺激の効果を検証する。

1-3 本論文の構成

以下に本論文の構成を示す。

第 1 章では、研究背景と本論文の立場を提示した。不整脈のうち、自律神経系の活動異常に起因する心房細動に焦点を当て、マイクロ加工技術を背景とするアプローチを行なうことが本論文の position であり、この視点から自律神経系の活動、心房細動とその治療手法に関する従来の研究状況についてまとめた。これに基づいて研究目的を設定、具体的な検討課題について記述した。

第 2 章では、自律神経細胞群の培養とその活動計測結果につき述べる。最初に副交感神経細胞の培養手法につき記述する。標的組織表面に分散して存在する副交感神経細胞を効率よく採取する手法を開発し、培養系で一定期間維持する条件を確立する。交感神経細胞も含めて免疫組織化学染色を適用し、アドレナリン作動性、コリン作動性マーカーを指標に評価する。ついで、自律神経細胞が形成するネットワークとしての活動計測を試みる。MEA を利用した電気活動計測、イメージングによる細胞内 Ca^{2+} 濃度計測により自発活動を記録、ネットワークとしての活動パターン評価を行なう。

第 3 章では交感神経細胞、副交感神経細胞、心筋細胞の 3 要素からなる共培養システムの構築につき述べる。MEA 基板上に 3 つの細胞培養区画を集積化し、区画間を細胞体は進入せず神経突起のみ通過可能な微小通路構造でつなぐデバイスを設計、製作する。このデバイス上で共培養を実施、自律神経支配を有する心筋細胞の拍動時系列につき評価する。さらにこの系で交感神経細胞群に対して慢性電気刺激を印加、人為的に誘起した活動亢進状態に対する心筋拍動リズム応答の経時変化を観測する。自律神経系の活動異常に起因する心房細動の発症メカニズム解明に向けて、構築する共培養システムの有用性を示す。

第 4 章では、マイクロ磁気刺激システムの設計と刺激条件の最適化に向けた検討結果を示す。自律神経系に対する磁気刺激を想定し、高い空間分解能を実現する条件を求める立場から、自律神経線維束を模擬して一方向に伸長させた神経軸索に対して微小コイルを配置、局所的な刺激を行なう系につき、シミュレーションと実験両面から検討した結果を記述する。

第 5 章では、本論文の結論と展望について述べる。

第 2 章

自律神経細胞の培養と活動評価

本章では、自律神経細胞の培養と、その活動計測を行なった結果を述べる。

交感神経細胞の *in vitro* 研究には多くの報告があるが、副交感神経細胞については極めて少ない。その理由は、後者が明確な神経節(神経細胞の集合体)を作らず、標的組織表面に分散して存在することによる「採取の技術的な困難さ」にある。本研究では、副交感神経細胞を効率よく採取する手法を開発し(従来手法の約 4 倍)、長期間(従来手法で 72 時間だったものが 3 週間に延長)培養系で維持する条件を確立した。交感神経細胞も含めて免疫組織化学染色を行ない、アドレナリン作動性及びコリン細胞性マーカーを指標とする評価を行なった。

さらに、MEAを用いた細胞外電位計測、蛍光イメージングによる細胞内 Ca^{2+} 濃度計測により、自律神経細胞群のネットワークとしての活動を観測した。従来、培養交感神経系でシナプス伝達が起こることだけが報告されていたが、今回の計測により、副交感神経系も含めて神経回路が形成されており、その活動が発達段階に応じて変化すること、シナプス伝達に関与する受容体が nAChR であることが明らかになった。

2-1 心拍制御に関与する自律神経系

2-1-1 解剖学的構造

心臓のポンプ機能は、洞房結節において生じる活動電位が正確なタイミングで制御されて刺激伝導系(心房内結節間伝導路→房室結節→His 束→右脚/左脚→Purkinje 線維)を伝わることにより実現されている。洞房結節にはペースメーカー細胞が存在し、ペースメーカー細胞が自発的に脱分極及び再分極を繰り返すことで、周期的な活動電位を生成する。自律神経系からの入力によりペースメーカー細胞の電気生理学的な特性が変化することで心臓内を伝達する活動電位のタイミングが変化すると考えられている。

自律神経系(Autonomic Nervous System; ANS)は、生体恒常性の維持がその主要な役割であり、Langley による提唱 [Langley 1898] 以来、その構造や機能について多くの研究が進められてきた。自律神経系は、fight-or-flight の状況で活性化する交感神経系(Sympathetic Nervous System)と、安静や睡眠時に活性化して体調を整え成長を制御する副交感神経系(Parasympathetic Nervous System)のバランスで機能していることは広く知られている通りである。構造的には、細胞体が脊髄や脳幹内にある節前ニューロンの活動により活性化される節後ニューロンが標的組織の活動を制御することになる。心臓の場合、これを制御する交感神経細胞群が明確な神経節を形成しているのに対し、副交感神経細胞は心臓表面に分散して存在しているという

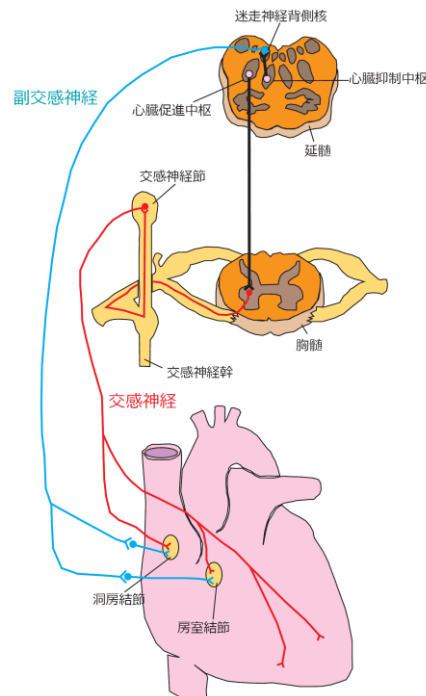


Fig. 2-1 心臓に対する自律神経支配の概要 [Olshansky et al. 2008 を基に作成]

特徴がある。

交感神経系を解剖学的にやや詳しく見ると、節前神経細胞は胸髄の側角に存在し、延髄の心臓促進中枢による支配を受けていることがわかる。その出力は節前線維として交感神経幹における交感神経節まで伸長し、神経節内で節後神経細胞に結合する。節後線維は心臓神経叢を經由して心臓に到達する(Fig. 2-1)。従って、心拍制御に関わる交感神経細胞の培養を考える場合は、節後神経細胞の集合である神経節を採取すればよいことになる。

副交感神経細胞の節前神経細胞は延髄の迷走神経背側核に存在し、延髄に存在する心臓抑制中枢の支配を受ける。交感神経系と異なり、節前線維は直接心臓表面まで伸長して節後神経細胞を支配する。心臓の中やその周辺部にあつてその節後神経線維が心臓内に分布する神経節を心臓神経節 (IntraCardiac Ganglion; ICG)と呼んでいるが、実態としては明確な神経節を形成していない。心臓の機能調節に関与する副交感神経細胞は、心臓表面の脂肪組織 (Fat Pad; FP)内に多く存在するという報告がある [Chiou et al. 1997]。Fig. 2-2 に示す通り、心臓表面には3ヶ所のFP (上大静脈-大動脈間, 右心房・右肺静脈接合部, 左心房・下大静脈接合部)があり、心拍制御に関与する副交感神経細胞の培養を考える場合、FP 付近の組織を採取してそこに含まれる神経細胞を効率よく単離する手法の確立が鍵となる。

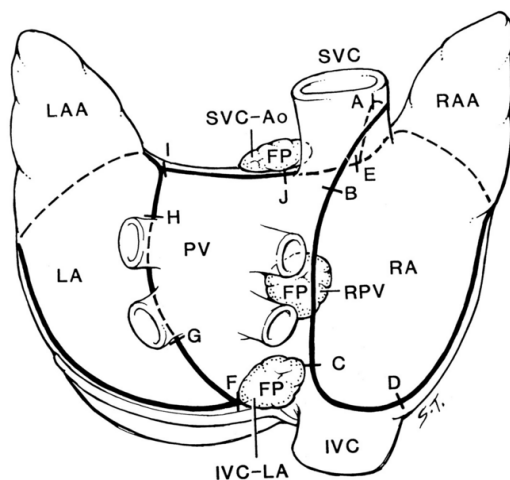


Fig. 2-2 心拍制御に関与する副交感神経節を含む心臓表面の脂肪組織 [Chiou et al. 1997]

SVC-Ao: 上大静脈-大動脈間

RPV: 右心房・右肺静脈接合部

IVC-LA: 左心房・下大静脈接合部

2-1-2 伝達物質と受容体

節前細胞が放出する伝達物質は ACh であり、これは交感神経系、副交感神経系に共通である。節後細胞表面には nAChR が存在し、放出された ACh は興奮性に作用することになる。これに対し、

節後細胞が放出する伝達物質は交感神経と副交感神経で異なる。基本的には交感神経ではノルアドレナリン(NorAdrenaline; NA), 副交感神経では ACh である。

交感神経節後細胞内では, チロシン水酸化酵素(Tyrosine Hydroxylase; TH)の触媒下でチロシンからドーパが合成され, 芳香族アミノ酸脱炭酸酵素(Aromatic L-amino acid decarboxylase; ACDD)の作用でドーパからドパミン, さらにドパミン β 水酸化酵素(Dopamine β hydroxylase; DBH)によりドパミンから NA に変換される。一連の化学反応に関与する酵素が NA 作動性ニューロンを検出するマーカーとなる。

放出された NA はアドレナリン受容体(AR)に結合する。AR には α 受容体(α AR)及び β 受容体(β AR)の2種類が存在し, それぞれ α 1AR, α 2AR, β 1AR, β 2AR, β 3AR のサブタイプに分けられ [Lands et al. 1967; Langer 1974; Emorine et al. 1989], さらに β 4AR の存在を示唆する報告もある [Kaumann and Molenaar 1997]。心筋細胞には α 1AR, β 1AR 及び β 2AR が多く分布しており, β 1AR 及び β 2AR の存在比率は心房組織ではそれぞれ 60-70: 40-30 %, 心室組織では 70-80: 30-20 %程度と考えられている [Brodde 1991; Brodde 1993]。洞房結節では β AR が多く分布していることも報告されている [Rodefeld et al. 1996]。

NA が β 1AR に結合すると, 促進性の G タンパク(Gs)を介して, 細胞内のアデニル酸シクラーゼ(AC)を活性化し, アデノシン三リン酸(ATP)から環状アデノシンリン酸(cAMP)を生成する。cAMP は, プロテインキナーゼ A(PKA)の作用で細胞膜上に分布するイオンチャネルをリン酸化, 結果として Ca^{2+} の細胞内への流入を促進させる。 Ca^{2+} の流入が最終的に心筋収縮力の増加や, 心拍数の増加などの現象を引き起こす。これが交感神経活動による基本的な心拍亢進現象である。交感神経活動に伴う心拍変動が発現する過程では, セカンドメッセンジャーである cAMP を介した酵素反応を経なければならず, さらには代謝に関連するカテコール-O-メチル基転移酵素(COMT)の活性が低いことから, 効果の発現には一定の時間を要する。そのため, 交感神経活動による心拍数の動的な調節は一般に難しいとされている。また, NA を放出する神経終末自体にも NA に対する受容体(α 2NAR)がある。 α 2NAR に対する NA の作用は抑制性であり, 同じく神経終末に存在する ACh に対する受容体(M2AChR)と合わせて NA の放出を抑制する方向に作用する。

副交感神経節後細胞内では, コリンアセチル基転移酵素(ChAT)の触媒作用により, アセチル CoA とコリンから ACh が合成される。神経終末から放出された ACh は神経伝達物質としての役割を果たすと, アセチルコリンエステラーゼ(AChE)によりコリンと酢酸に分解され, コリンは再度細胞内に取り込まれる。これら一連の反応に関与する酵素がコリン作動性ニューロンを検出するマーカーとなる。

放出された ACh はアセチルコリン受容体(AChR)に結合する。AChR はニコチン性アセチルコリン受容体(nAChR)とムスカリン性アセチルコリン受容体(mAChR)の2種類に大別され, 心筋細胞には mAChR が多く分布する。現在, mAChR は M1 から M5 までのサブタイプが確認されており [Hammer et al. 1980; Bonner et al. 1987; Bonner et al. 1988], その中でも M2AChR が洞房結節細胞に多く分布する。

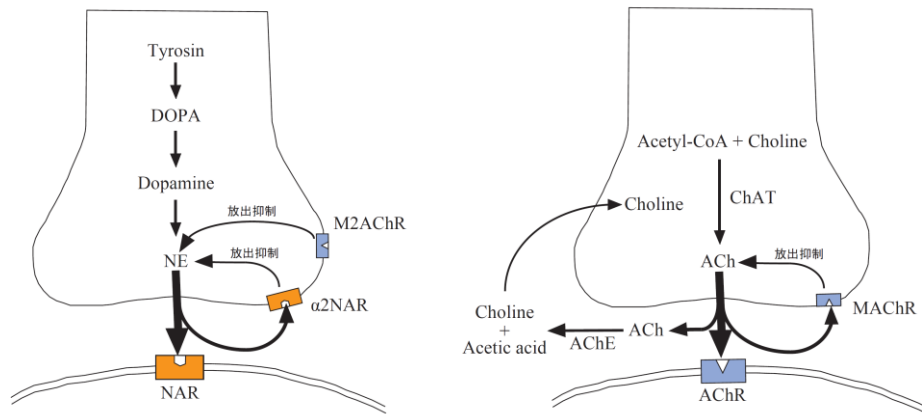


Fig. 2-3 交感神経及び副交感節後神経終末における伝達物質の合成，シナプス前後受容体への作用，酵素による分解と再取り込み過程 [井上 2001 を基に作成]

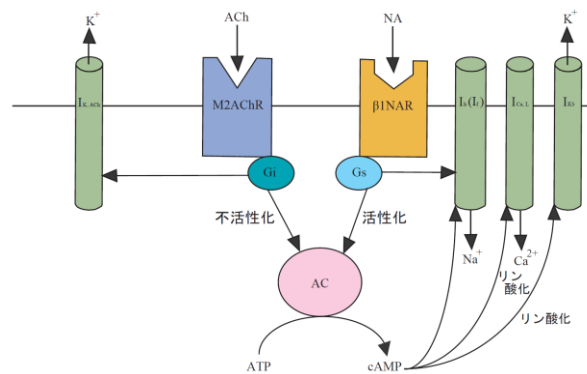


Fig. 2-4 交感／副交感神経による心拍亢進／抑制に関与する基本的な細胞内情報伝達機構 [井上 2001 を基に作成]

AChがM2AChRに結合すると、NAとは逆に抑制性のGタンパク(Gi)を介して細胞内のACを抑制、細胞膜上の K^+ チャネルを開口させる。結果として、cAMPの生成が抑制される同時に K^+ が細胞外へ流出して Ca^{2+} 電流が抑制され、心筋収縮力の低下や、心拍数の減少などの現象を引き起こす。これが副交感神経活動による基本的な心拍抑制現象である。AChを分解するAChEは細胞外に高濃度に存在するため、放出されたAChは直ちに分解され、その作用は消失する。そのため、副交感神経の効果の発現は交感神経系による調節と比較して短時間で起こると考えられている。また、NAの場合と同様、AChを放出する神経終末自体にもAChに対する受容体があり、過剰なAChの放出を抑制する方向に作用する。以上、自律神経系で作用する伝達物質と受容体についてその模式図をFig. 2-3, 4に示す。

自律神経細胞には上記基本となる神経伝達物質だけではなく、神経ペプチドなどの神経伝達修飾物質が貯蔵されている。交感神経節後線維に貯蔵される神経伝達修飾物質の1つにニューロペプチドY(NPY)があり [Kummer 1987; Warner and Levy 1990]、交感神経に対する高頻度、長時間の電気刺激によりその放出が起こることが報告されている [Warner et al. 1991]。NPYは、心筋

細胞上の Y₁ 受容体及び副交感神経細胞上の Y₂ 受容体に作用する。Y₁ 受容体はラット及び人間の心房筋細胞上に存在することが示されており [Jonsson-Rylander et al. 2003; Dvorakova et al. 2008], 心室筋細胞上の Y₁ 受容体を介して細胞内 Ca²⁺濃度が変化, 心室細動を誘発する可能性があることも報告されている [Heredia et al. 2005]. 迷走神経刺激前に交感神経に対する刺激を行なうと迷走神経刺激に伴う心臓の徐脈を抑制できる [Potter 1987], Y₂ 受容体の拮抗薬である BIIE0246 を作用させることにより, 交感神経刺激による徐脈の阻害を抑制できる [Smith-White et al. 2002], NPY の Y₂ 受容体への作用が, プロテインキナーゼ C (PKC) を介して ACh の合成を抑制する [Herring et al. 2012] などの報告もあり, これらの修飾物質を介する調節作用も薬理治療などの標的となる可能性がある。

2-2 実験方法

2-2-1 細胞培養

(1) 交感神経細胞の採取と単離操作

上頸神経節 (Superior Cervical Ganglion; SCG) から交感神経細胞を採取した。SCG 神経細胞の採取については, 序論にまとめた通り, 多くの報告がある [Vega et al. 2010; Takeuchi et al. 2011; Luther et al. 2013; Amendola et al. 2015]. 本研究では Takeuchi らと同様の手法を用いた。1-3 日齢の Wistar Rat 新生児 (チャールズリバー) から SCG を採取して 0.5 mg/mL の Collagenase (ライフテクノロジー) を含む Hank's balanced salt solution (HBSS, ライフテクノロジー) に入れ, 37°C に保温したシェイキングバス内で 60 分間攪拌した。その後さらに 1.2 mg/mL Trypsin (インビトロゲン) を加えて 15 分間処理した。酵素処理終了後, 10% (v/v) fetal bovine serum (FBS, コスモバイオ) を含む DMEM を 5 mL 加えてピペッティングにより単離した。調製した懸濁液は, 40 μm 径のセルストレイナー (BD) を通した後, 120 G, 4°C の条件下で 3 分間遠心処理, FBS を含む DMEM による上清置換を 3 回行ない, 細胞懸濁液を調製した。

(2) 副交感神経細胞の採取と単離操作

心拍制御に関与する副交感神経細胞を含む組織として心臓神経節 (IntraCardiac Ganglion; ICG) につき検討した。前述の通り, ICG は SCG のような明確な神経節を形成しておらず, 採取が難しい。ICG に関する先行研究として心房筋を含む心房表面組織全体を採取して単離, 3 日間培養した結果が報告されており [Hoard et al. 2007], 本研究では, ICG 神経細胞をより効率よく採取する手法, より長期間の維持を可能にする培養条件の確立が課題となる。

1-3 日齢の Wistar Rat 新生児から心臓を摘出, 顕微鏡下で FP を含む肺静脈付近の組織を選択的に採取した。採取した組織を眼科用ハサミで細切し, 10 mg/mL Collagenase を含む HBSS に入れて 37 °C のシェイキングバス内で 35 分間攪拌, 2 mg/mL Trypsin を加えてさらに 35 分間酵素処理を行なった。酵素処理終了後, 10 % (v/v) FBS を含む DMEM を 5 mL 加えてピペッティングにより単離した。神経細胞よりサイズの大きい細胞を除去するために 40 μm 径のセルストレイナーに通

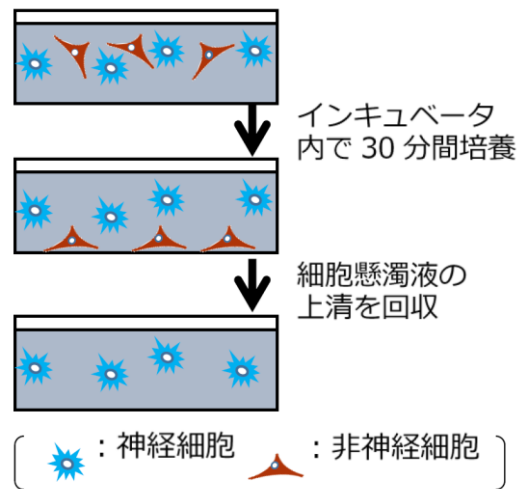


Fig. 2-5 副交感神経細胞を選択的に採取する手法(pre 培養)

した後, 120 G, 4°C, 3 分間の条件で遠心処理, FBS を含む DMEM による上清置換を 3 回行なった. 洗浄終了後, DMEM を培養液に置換し, 細胞懸濁液として調整した.

調製した細胞懸濁液を 35 mm 径滅菌シャーレに移し, インキュベータ内で 30 分間 pre 培養を行なった. 非神経細胞は神経細胞と比べて基板表面への接着に要する時間が短いため, pre 培養の過程で先にシャーレ表面に接着する(Fig. 2-5). 30 分間の pre 培養後, 上清を回収し, 再度細胞濃度を調整して最終的な細胞懸濁液とした.

(3) 細胞播種と培養

細胞の接着性を向上させるため, 培養基板表面をコラーゲンでコートした. Type I-C Collagen 原液(新田ゼラチン)を pH 3.0 に調節した希塩酸溶液(和光純薬工業)で 10 倍に希釈して培養基板に塗布, 冷蔵庫(4 °C)内に 1 晩静置した後コーティング液を吸引し, クリーンベンチ内(室温)で自然乾燥させた. 細胞播種前に培養液で 2 度洗浄した. 培養液組成は以下の通りである: Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM, インビトロゲン)を基本培地とし, これに 10 % (v/v) FBS (コスモバイオ), 1 % (v/v) penicillin-streptomycin (pe-st, ライフテクノロジーズ), 25 ng/mL 2.5S nerve growth factor (NGF, ライフテクノロジーズ), 10 ng/mL glial cell line-derived neurotrophic factor (GDNF ; ライフテクノロジーズ)を添加したものを使用した. 最終的に共培養系の構成を想定しているため, 培養液は SCGs, ICG に共通とした.

SCG 神経細胞, ICG 神経細胞とも, 播種する密度は 1000 cells/mm²とし, 37°C, CO₂ 濃度 5 %, 水蒸気飽和のインキュベータ内に保持した. 培養液は 2 日に 1 度, 半量を交換した. 以下, 播種した時点を培養開始 0 日目 (0 days *in vitro*, DIV)とする.

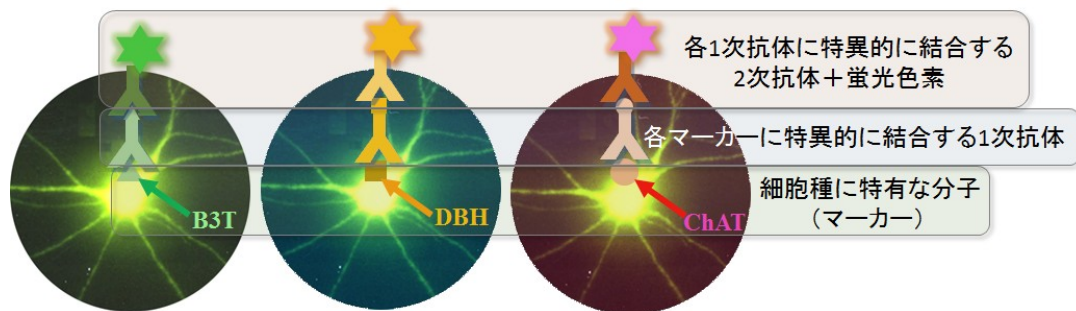


Fig. 2-6 免疫組織化学染色による細胞種の同定

(4) 免疫組織化学染色

神経細胞に特有の細胞骨格，細胞種に特有な代謝過程に関与する酵素などを指標に，それらのタンパク質に特異的に結合する抗体を利用して標識することにより蛍光画像として可視化することができる．本研究ではマーカーとして：

- * 神経細胞 Anti-beta 3 tubulin(B3T) 抗体
- * アドレナリン作動性 Anti-dopamine beta hydroxylase(DBH) 抗体
- * コリン作動性 Anti-choline acetyltransferase(ChAT) 抗体

を用いた．また，系に存在する全ての細胞を非特異的に標識するため，DNAに特異的に結合する蛍光物質である4',6-DiAmidino-2-PhenylIndole dihydrochloride (DAPI)を使用した．

最初に培養液を37℃に温めた4% Paraformaldehyde (PFA, 和光純薬工業)に置換して30分間室温下で静置，細胞を固定した．リン酸緩衝液 (Phosphate Buffered Saline; PBS, ライフテクノロジー)で3度洗浄した後，Triton X-100 (Calbiochem)による細胞膜の可溶化(0.25% (v/v) in PBS, 10-15分)，Block Ace (大日本住友製薬)による非特異的吸着の防止処理(4% (w/v), 4℃, 1晩)を行なった．ブロッキング終了後，溶液を1次抗体液に置換し，遮光した状態で4℃の冷蔵庫内で1-2日反応させた．希釈率は，Anti-B3T抗体は400倍，Anti-DBH抗体は500倍，Anti-ChAT抗体は200倍とした．結合反応終了後，PBSで3度洗浄してから2次抗体による標識を行なった(遮光条件下4℃の冷蔵庫内で4-8時間静置)．2次抗体は，Alexa fluor 488 anti-mouse IgG (Molecular probes)及びAlexa fluor 546 anti-rabbit IgG (Molecular probes)とし，0.4% Block Aceで500倍希釈したものを使用した．2次抗体液にDAPI (Sigma, 300 nM)を添加して核染色を行なうことにより，試料中に存在する全細胞を可視化した．反応終了後PBSで3度洗浄した．

蛍光観察は倒立位相差顕微鏡 (IX-71, オリンパス)，冷却 CCD カメラ (C8800-21C, 浜松フotonix)により行なった．各標識色素の励起/蛍光波長は以下の通りである：

- * Alexa fluor 488 励起 488 nm 蛍光 519 nm (赤)
- * Alexa fluor 546 励起 546 nm 蛍光 573 nm (赤)
- * DAPI 励起 358 nm 蛍光 461 nm (青)

細胞数の評価を行なう場合は，800 μm × 800 μm の観察視野を設定し，視野内の各マーカー陽

性細胞数をカウントした。DAPI 陽性のものを全細胞数とし、B3T 陽性、ChAT 陽性部位を含む細胞を検出してその割合を算出した。

2-2-2 神経回路活動計測

2-2-2-1 電気活動計測

(1) MEA 基板の製作

MEA (MicroElectrode Array) は表面に多数のマイクロ電極を集積化した細胞培養基板である。ITO (Indium Tin Oxide, 透明導電性材料) 薄膜付きガラス基板 (CBC オプティックス) を材料とし、2 度のフォトリソグラフィ (電極パターン, 絶縁膜パターン) プロセスにより電極アレイ構造を作製した基板にガラスリングを接着して細胞培養皿とした (Fig. 2-7)。



Fig. 2-7 MEA 基板

細胞電気活動計測用のマイクロ電極が 64 個集積化された細胞培養皿である。透明導電性材料の利用により、倒立顕微鏡による細胞形態の観察、蛍光画像観測が可能な構造としている。

フォトリソグラフィの操作手順・条件は以下の通りである (Fig. 2-8) :

- a. ITO 付きガラス基板の洗浄: 超音波洗浄 (界面活性剤 15 分, 0.5 M NaOH 90 分)
超純水で洗浄後 140°C のホットプレート上で乾燥
- b. フォトレジスト塗布: HMDS スピンコート (4500 rpm, 60 秒)
OFPR-800LB (東京応化工業) スピンコート (4500 rpm, 60 秒)
- c. プリベイク: 110°C のホットプレート上で 90 秒
- d. 露光: マスクアライナ (PEM-800, ユニオン光学) で密着露光 (20 秒)
- e. 現像: NMD-3 (東京応化工業) 中で 90-180 秒処理後, 超純水で洗浄
- f. ポストベイク: 140°C のホットプレート上で 5 分
- g. エッチング: 40°C の ITO-02N (関東化学) 中で 5 分間静置

h. フォトレジスト除去: 回路のショートがないか確認した後アセトンで超音波洗浄

上記フォトリソグラフィプロセスにより電極パターンを形成した基板に再度フォトレジストを塗布し、計測部分のマイクロ電極及び測定系との接続に利用するコンタクトパッド部分のみを除去した。この基板にガラスリング(25 Φ)を接着(シリコン接着剤 CAT-103+ KE-103, 信越化学, 80°Cのホットプレート上で1時間静置)した。

基板中央部に形成したマイクロ電極部分には電気化学的に白金黒を電気化学的に析出させた。50×50 μm の電極において、インピーダンスが 1 kHz で数百 kΩ になるように調整した。

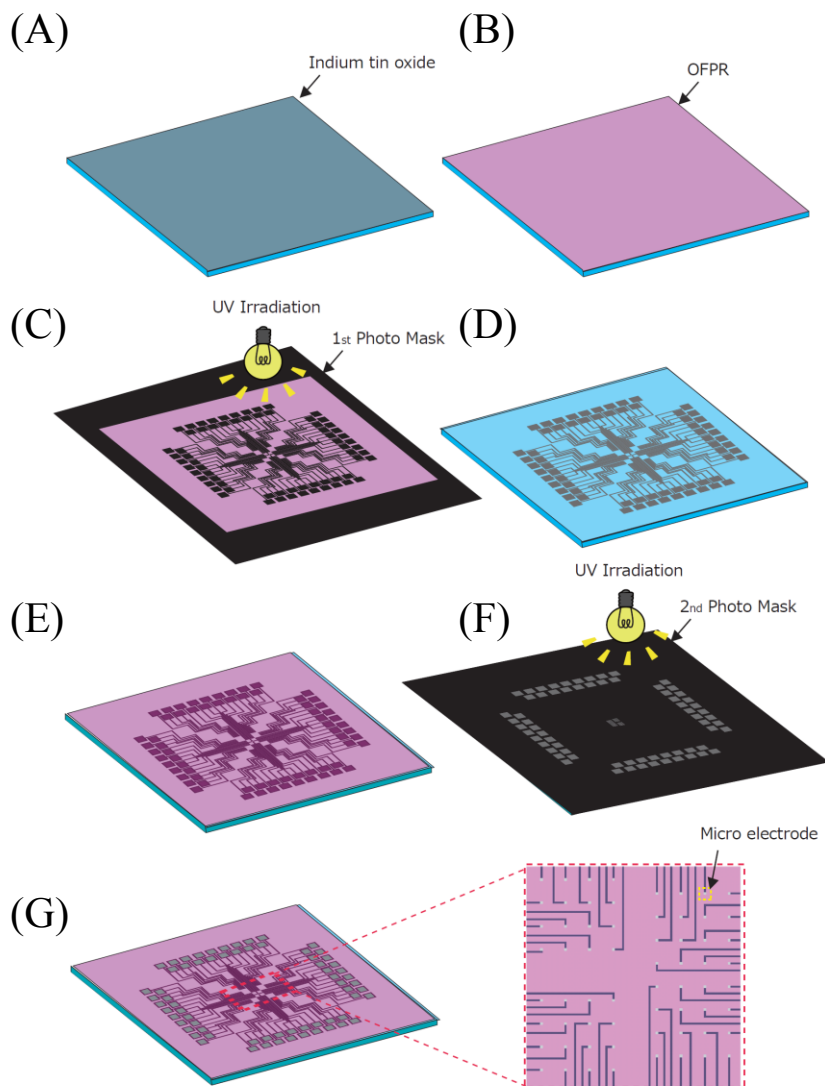


Fig. 2-8 フォトリソグラフィによる MEA 基板の製作プロセス

(A) ITO 基板, (B) フォトレジスト塗布, (C) 露光(電極パターン), (D) 現像, (E) フォトレジスト塗布, (F) 露光(パッシベーションパターン), (G) 現像&洗浄

(2) 細胞電気活動の計測と解析

MEA 基板上で細胞培養を行ない、その電気活動を細胞外電位として計測する。神経細胞の場合、活動電位の発生に伴って細胞外にも電流が流れ、結果として細胞近傍に電圧降下が生じる。活動電位の振幅が 100 mV 程度であるとき、細胞外電位として記録される信号は通常 100 μ V 程度になる。信号強度は低くなるが、侵襲性の低さゆえに多数の細胞の活動を長期間計測することができる、すなわちネットワークとしての活動を経時的に追跡できることがその特徴である。

計測システム [Jimbo et al. 2003]は、MEA 基板、増幅器(プリアンプ及びメインアンプ)、帯域通過フィルタ、制御用 PC、データ記録用 PC から構成される (Fig. 2-9)。倒立顕微鏡ステージにはアクリル樹脂製の簡易インキュベータ (37°C, CO₂ 濃度 5%, 水蒸気飽和) を設置、その中に試料を保持した状態で計測を行なった。培養液内に Pt をコイル状に成形した電極を配置し、これを基準として MEA の各電極の電位を計測した。

信号は、プリアンプ ($\times 20$, NF 回路設計ブロック) で直流成分まで含めて増幅した後 100-2000 Hz の帯域通過フィルタ (NF 回路設計ブロック) を通し、さらにメインアンプ (NF 回路設計ブロック) で増幅し、トータルでゲイン 5000-10000 程度の条件とした。サンプリング周波数 25 kHz, 分解能 12 bit で A/D 変換 (PCI-MIO-16E-1, National Instruments) したデータをハードディスクに記録した。データ記録の制御は LabVIEW (National Instruments) を利用して作成したソフトウェアを用いた。

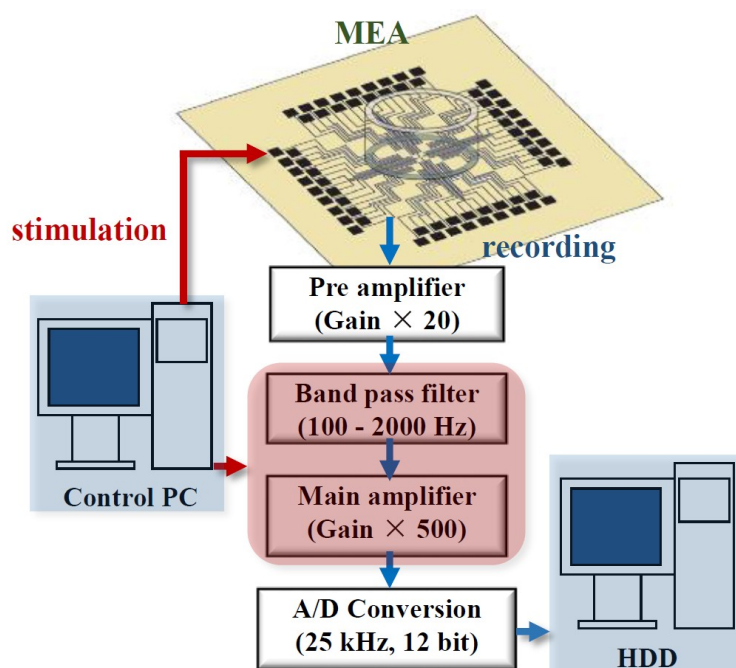


Fig.2-9 細胞外電位記録システムの構成

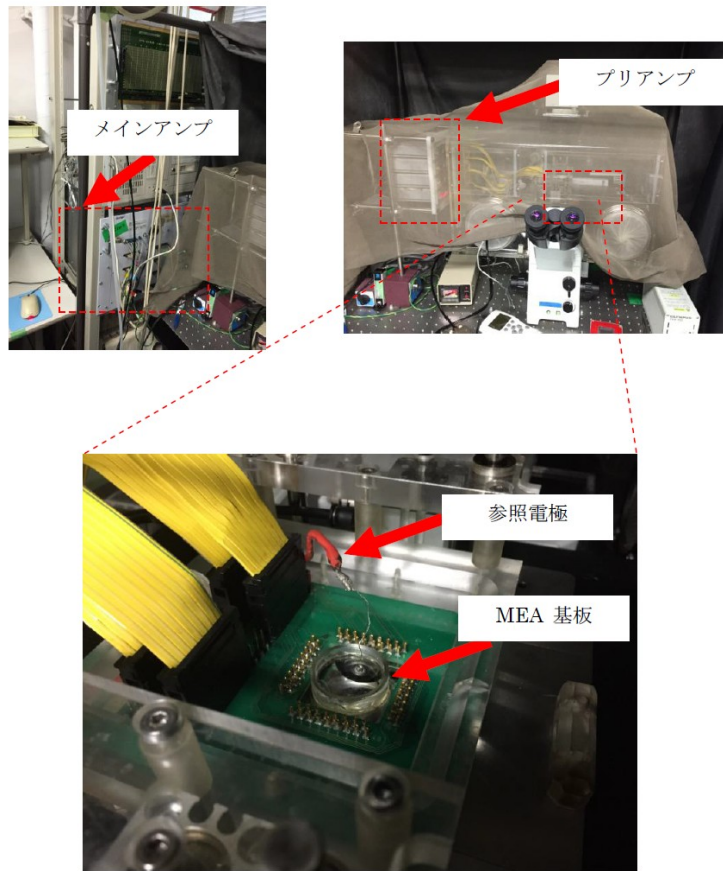


Fig. 2-10 細胞外電位記録システムの外観とMEAの設置部分

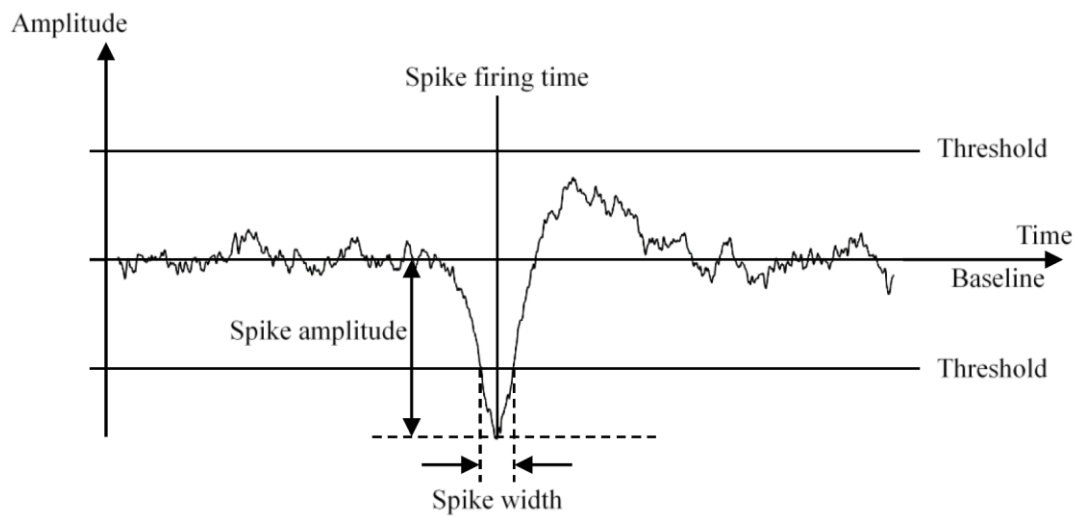


Fig. 2-11 細胞外電位波形からのスパイク検出

電気刺激は制御用の PC を通じて刺激強度とタイミング、電極の選択を行なった。メインアンプと顕微鏡ステージ脇に設置されたプリアンプ、ステージ上の MEA と接続治具、参照電極の実際の写真を Fig. 2-10、計測した細胞外電位データからスパイクを検出する手順を Fig. 2-11 に示す。計測されたデータについて 1 秒ごとの標準偏差を算出し、その 5 倍を閾値として負のピークを検出した。閾値を超えている区間をスパイク幅とした。

2-2-2-2 細胞内 Ca^{2+} 濃度計測

Ca^{2+} 濃度に依存して蛍光強度が変化する色素を利用して Ca^{2+} 分布の空間パターンを可視化する手法を Ca^{2+} イメージングと呼んでいる。本研究では、 Ca^{2+} プローブとして Fluo-8 を用いた。

滅菌水に 148 mM NaCl, 2.8 mM KCl, 2 mM CaCl_2 , 1 mM Mg Cl_2 , 10 mM Glucose, 10 mM 2-[4-(2 Hydroxyethyl)-1-piperazinyl]ethanesulfonic acid (HEPES; 同仁科学研究所) を添加した緩衝液を調製した。37°C に温めた緩衝液 1 mL に 5 μL Fluo-8 AM (Abcam), 2 μL pluonic f-127 (タカラバイオ) を添加したものを Ca^{2+} プローブ溶液として調整した。Fluo-8 AM は Fluo-8 のカルボキシル基をアセトキシメチル化することにより脂溶性を高めたものであり、細胞膜透過性を有する。細胞内に取り込まれた AM 体は、細胞内エステラーゼにより加水分解されて Fluo-8 になる。Fluo-8 は水溶性であるため細胞内部に留まり、 Ca^{2+} プローブとして機能する。

試料内の培養液と調製した Ca^{2+} プローブ溶液を置換し、インキュベータ内で 30 分間静置した。37°C に温めた緩衝液で 2 度洗浄し、再度緩衝液を加えてインキュベータ内で 15 分間保持した。蛍光画像は、倒立顕微鏡 (IX-71, オリンパス)、冷却 CCD カメラ (C8800-21C, 浜松フォトニクス)、共焦点スキャナユニット (CSU-X1, 横河電機) の系で取得した。励起光源は半導体レーザー (488 nm, コヒレント・ジャパン) を使用し、Fluo-8 による蛍光 (510 nm) 画像を解像度を 500×500 pixel, フレームレート 10 frames/s で取得した。計測は顕微鏡ステージ上の簡易インキュベータ内に試料を保持した状態で行なった (Fig. 2-12)。

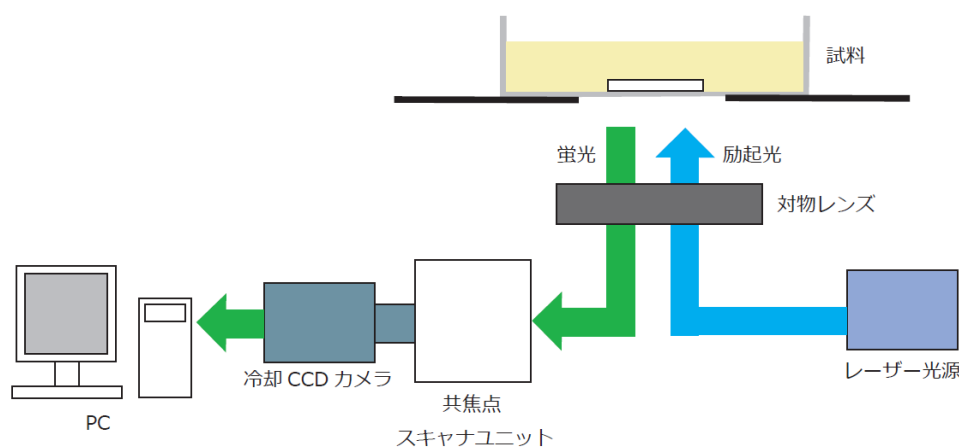


Fig. 2-12 細胞内 Ca^{2+} 濃度変化のイメージング

2-3 実験結果

2-3-1 ICG 神経細胞採取・培養プロトコルの改良

SCG 神経細胞の培養については多くの報告があるが、ICG 神経細胞の採取と長期培養手法は十分な条件が確立されておらず、検討課題となっていた。本研究で試みた改良点と従来手法 [Hoard et al. 2007] の比較を表 2-1 にまとめた。

本研究の手法を適用して採取した ICG 神経細胞を 20 日間培養し、神経細胞のマーカーである B3T により染色した結果を Fig. 2-13 (A) に示す。比較のため、従来手法を用いた場合を同図 (B)、SCG 神経細胞の染色画像を Fig. 2-14 に示す。図中緑色に見える部分が神経細胞であり、本手法のものは従来手法に比べて陽性細胞数が多く、また神経突起の伸長も良好であることがわかる。DAPI 陽性の部分 (青色) は試料に含まれる全細胞に対応すると考えられ、これに対する B3T 陽性

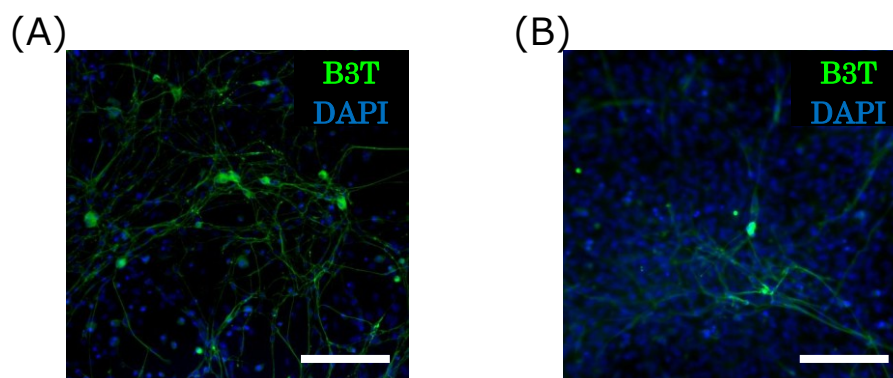


Fig. 2-13 ICG 神経細胞の B3T, DAPI の 2 重染色画像 (20 DIV; Scale bar, 200 μ m)
(A) 本研究における手法によって採取を行なった ICG 神経細胞の染色画像
(B) Hoard らの手法によって採取を行なった ICG 神経細胞の染色画像

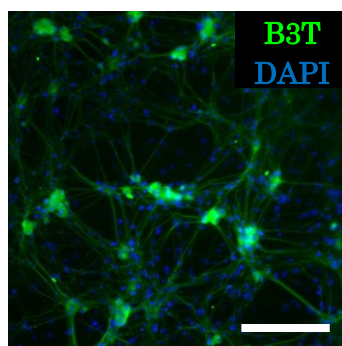


Fig. 2-14 SCG 神経細胞の B3T, DAPI の 2 重染色画像 (20 DIV; Scale bar, 200 μ m)

Table 2-1 ICG 神経細胞の採取及び培養手法

	本研究の手法	Hoard らの手法
培養液組成	DMEM+10% (v/v) FBS+ 1% (v/v) pe-st+25 ng/mL 2.5S NGF+10 ng/mL GDNF	MEM+10% (v/v) FBS
採取組織	肺静脈周辺組織	心房表面組織全体
セルストレイナーの使用	あり(40 μ m 径)	なし
pre 培養	あり(30 分間)	なし

Table 2-2 ICG 神経細胞の採取効率

本研究の手法				Hoard らの手法			
	全細胞数	ICG 神経細胞数	純度(%)		全細胞数	ICG 神経細胞数	純度(%)
Sample E	575	57	9.9	Sample I	526	10	1.9
Sample F	641	44	6.9	Sample J	563	1	0.2
Sample G	802	35	4.4	Sample K	437	9	2.1
Sample H	612	32	5.2	Sample L	609	12	2.0
平均± 標準偏差 (N=4)	657.5±100.0	42.0±11.2	6.6±2.4	平均± 標準偏差 (N=4)	533.8±72.9	8.0±4.8	1.5±0.9

Table 2-3 SCG 神経細胞数の採取効率

	全細胞数	SCG 神経細胞数	純度(%)
Sample A	571	283	49.6
Sample B	755	449	59.5
Sample C	432	163	37.7
Sample D	1007	442	43.9
平均±標準偏差 (N=4)	691.3±248.6	334.3±137.5	47.7±9.2

細胞の割合が定量評価の指標となる。従来手法と比べると本研究の手法は割合が高いことが認められるが、SCG の培養系ではほとんどの細胞が B3T, DAPI 両方の陽性を示しており、ICG 採取の手法は十分とは言えない状況である。定量評価の結果を Table 2-2 (ICG 神経細胞) と Table 2-3 (SCG 神経細胞) にまとめて示す。本研究の手法を適用した結果、ICG 細胞培養系における神経細胞の割合が従来の約 1.5 % から 6.6 %、約 4.4 倍の改善効果が得られている。SCG 神経細胞については、約 47% の高い割合であることが示されている。

2-3-2 細胞種の同定

交感神経節後細胞が放出する神経伝達物質は基本的にはノルアドレナリン (NA)、副交感神経細胞はアセチルコリン (ACh) であり、それぞれの合成過程に関与する酵素である DBH と ChAT がそのマーカーとなる。SCG 神経培養系の染色画像を Fig.2-15 から Fig.2-17, ICG 神経培養系の画像を Fig.2-18 から Fig.2-20 に示す。神経細胞のマーカーである B3T が陽性である細胞について DBH 陽性のものと ChAT 陽性のものをカウントすることにより、細胞種の割合を定量的に評価することができる。SCG 神経細胞及び ICG 神経細胞における B3T・DBH の 2 重陽性部位、及び B3T・ChAT の 2 重陽性部位を含む細胞の割合をまとめたものを Table 2-4, 2-5 に示す。

SCG 培養系について、B3T-DBH の 2 重染色を行なった試料では、B3T 陽性を示す細胞のほとんどが DBH 陽性部位を含むことが示された (Fig. 2-15, 96.7 %)。B3T-ChAT の 2 重染色を行なった試料では、多くの場合 2 重陽性部位は認められないという結果になった (Fig. 2-16)。ただし、ごく少数ではあるが、2 重陽性部位が見られた例もある (Fig. 2-17, 0.6 %)。

ICG 培養系について、B3T-ChAT の 2 重染色を行なった試料では、B3T 陽性を示す細胞のうち多くのものが ChAT 陽性部位を含むことが示された (Fig. 2-18, 85.1 %)。B3T-DBH の 2 重染色を行なった試料では、多くの場合 2 重陽性部位は認められないという結果になった (Fig. 2-19)。ただし、少数ではあるが、2 重陽性部位が見られた例もある (Fig. 2-20, 8.9 %)。

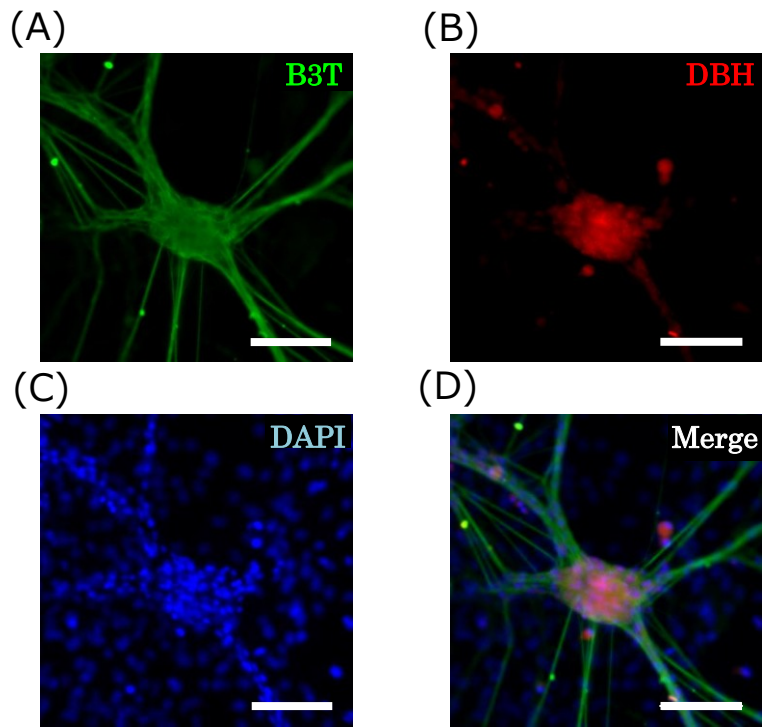


Fig. 2-15 SCG 神経細胞の B3T, DBH, DAPI の 3 重染色画像 (20 DIV; Scale bar, 100 μ m)

(A):B3T 陽性部位, (B):DBH 陽性部位

(C):DAPI 陽性部位, (D):B3T, DBH, DAPI 陽性部位の重ね合わせ

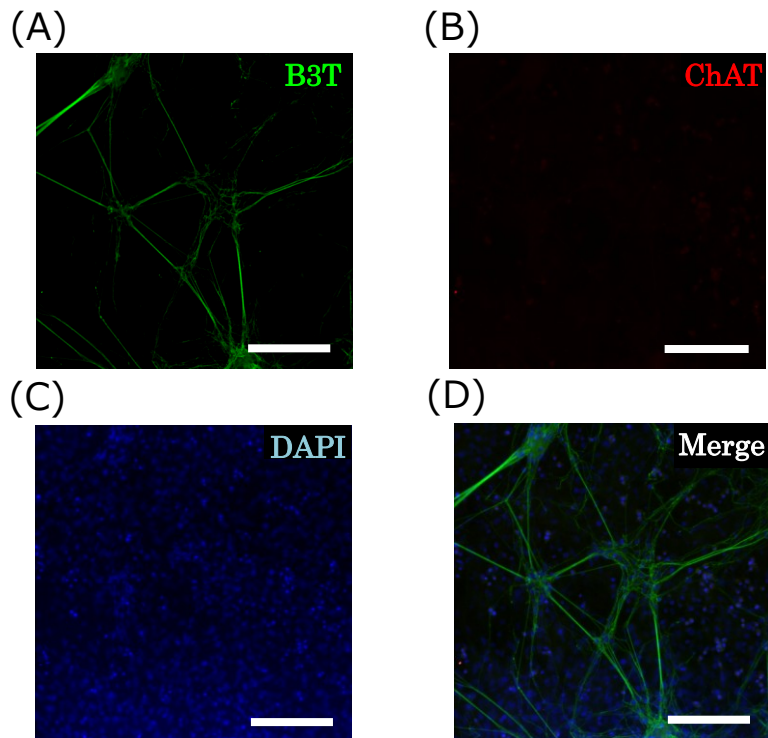


Fig. 2-16 SCG 神経細胞の B3T, ChAT, DAPI の 3 重染色画像

(B3T・ChAT の 2 重陽性部位が見られなかったサンプル, 20 DIV; Scale bar, 200 μ m)

(A):B3T 陽性部位, (B):ChAT 陽性部位

(C):DAPI 陽性部位, (D):B3T, ChAT, DAPI 陽性部位の重ね合わせ

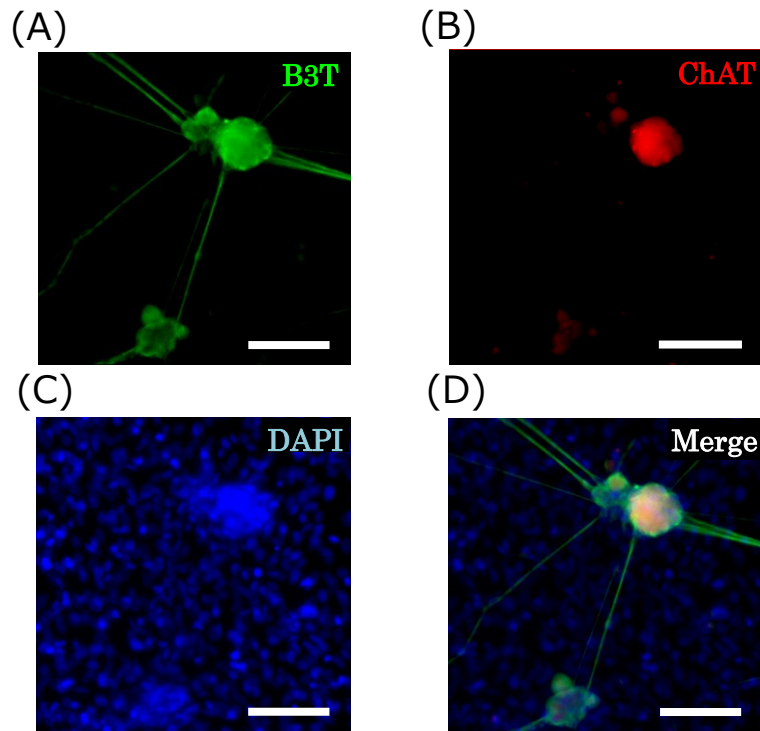


Fig. 2-17 SCG 神経細胞の B3T, ChAT, DAPI の 3 重染色画像
(B3T・ChAT の二重陽性部位が見られたサンプル, 20 DIV; Scale bar, 100 μ m)

(A):B3T 陽性部位, (B):ChAT 陽性部位
(C):DAPI 陽性部位, (D):B3T, ChAT, DAPI 陽性部位の重ね合わせ

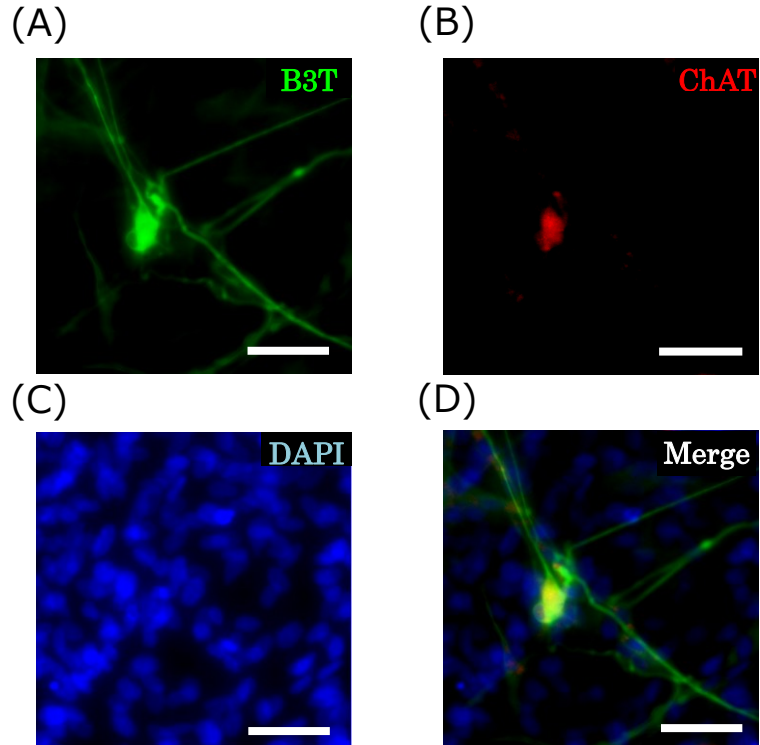


Fig. 2-18 ICG 神経細胞の B3T, ChAT, DAPI の 3 重染色画像 (20 DIV; Scale bar, 100 μ m)

(A):B3T 陽性部位, (B):ChAT 陽性部位
(C):DAPI 陽性部位, (D):B3T, ChAT, DAPI 陽性部位の重ね合わせ

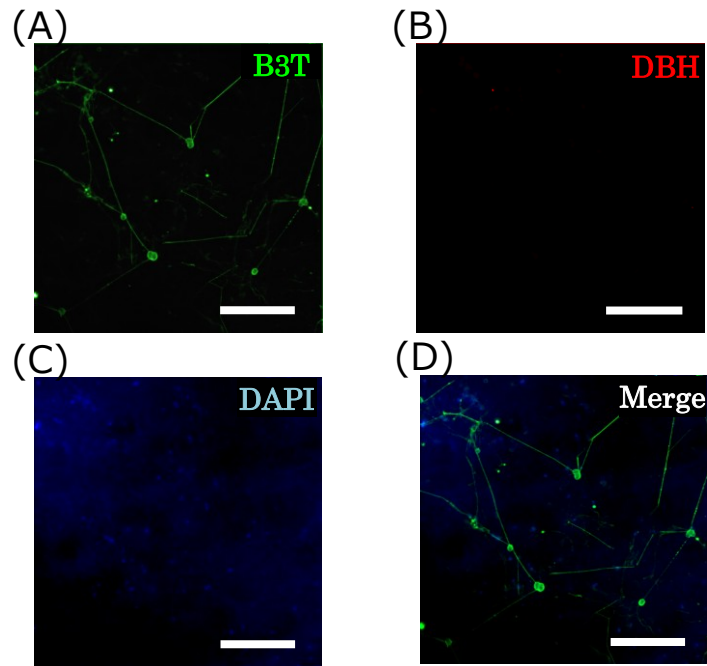


Fig. 2-19 ICG 神経細胞の B3T, DBH, DAPI の 3 重染色画像
(B3T・DBH の二重陽性部位が見られなかったサンプル, 20 DIV; Scale bar, 200 μ m)

(A):B3T 陽性部位, (B):DBH 陽性部位
(C):DAPI 陽性部位, (D):B3T, ChAT, DAPI 陽性部位の重ね合わせ

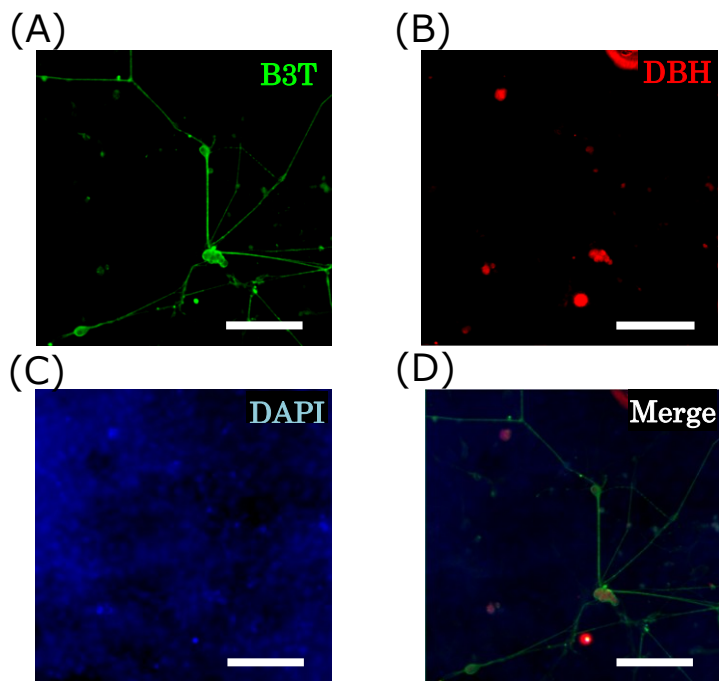


Fig. 2-20 ICG 神経細胞の B3T, DBH, DAPI の 3 重染色画像
(B3T・DBH の二重陽性部位が見られたサンプル, 20 DIV; Scale bar, 200 μ m)

(A):B3T 陽性部位, (B):DBH 陽性部位, (C):DAPI 陽性部位
(D):B3T, DBH, DAPI 陽性部位の重ね合わせ

Table 2-4 SCG 神経細胞における B3T-DBH, B3T-ChAT の 2 重陽性部位の割合

B3T+DBH				B3T+ChAT			
	B3T 陽性部位数	B3T+DBH 陽性部位数	比率 (%)		B3T 陽性部位数	B3T+ ChAT 陽性部位数	比率 (%)
Sample A	101	91	90.1	Sample D	275	2	0.7
Sample B	114	114	100	Sample E	163	0	0
Sample C	110	110	100	Sample F	504	5	1.0
平均± 標準偏差 (N=3)	108.3±6.7	105.0±12.3	96.7±5.7	平均± 標準偏差 (N=3)	314.0±173.8	2.3±2.5	0.6±0.5

Table 2-5 ICG 神経細胞における B3T-DBH, B3T-ChAT の 2 重陽性部位の割合

B3T+DBH				B3T+ChAT			
	B3T 陽性部位数	B3T+DBH 陽性部位数	比率 (%)		B3T 陽性部位数	B3T+ ChAT 陽性部位数	比率 (%)
Sample G	9	0	0	Sample J	64	50	78.1
Sample H	30	8	26.6	Sample K	63	54	85.7
Sample I	15	0	0	Sample L	71	65	91.5
平均± 標準偏差 (N=3)	18.0±10.8	2.7±4.6	8.9±15.3	平均± 標準偏差 (N=3)	66.0±4.3	56.3±7.8	85.1±6.7

2-3-3 神経回路活動

2-3-3-1 自発電気活動計測

MEA 基板上で培養した SCG, ICG 神経細胞から記録された自発電気活動時系列と検出したスパイク信号の形状を Fig.2-21 に示す. 20 日間培養した試料から 10 分間の信号記録を行なった. SCG 神経細胞 19 試料中 3 試料において, 3-4 ヶ所の測定点からスパイクが観測され, 発火頻度は 1 分間当たり 47.8 ± 28.4 回 (平均 \pm 標準偏差, $n=3$ samples) であった. ICG 神経細胞群 19 試料中 2 試料において, 1-2 ヶ所の測定点からスパイクが観測され, 発火頻度は 1 分間当たり 62.2 ± 22.6 回 (平均 \pm 標準偏差, $n=2$ samples) であった. SCG, ICG とも, スパイク発火パターンに一定の傾向は見られず, また明確な同期活動も認められなかった.

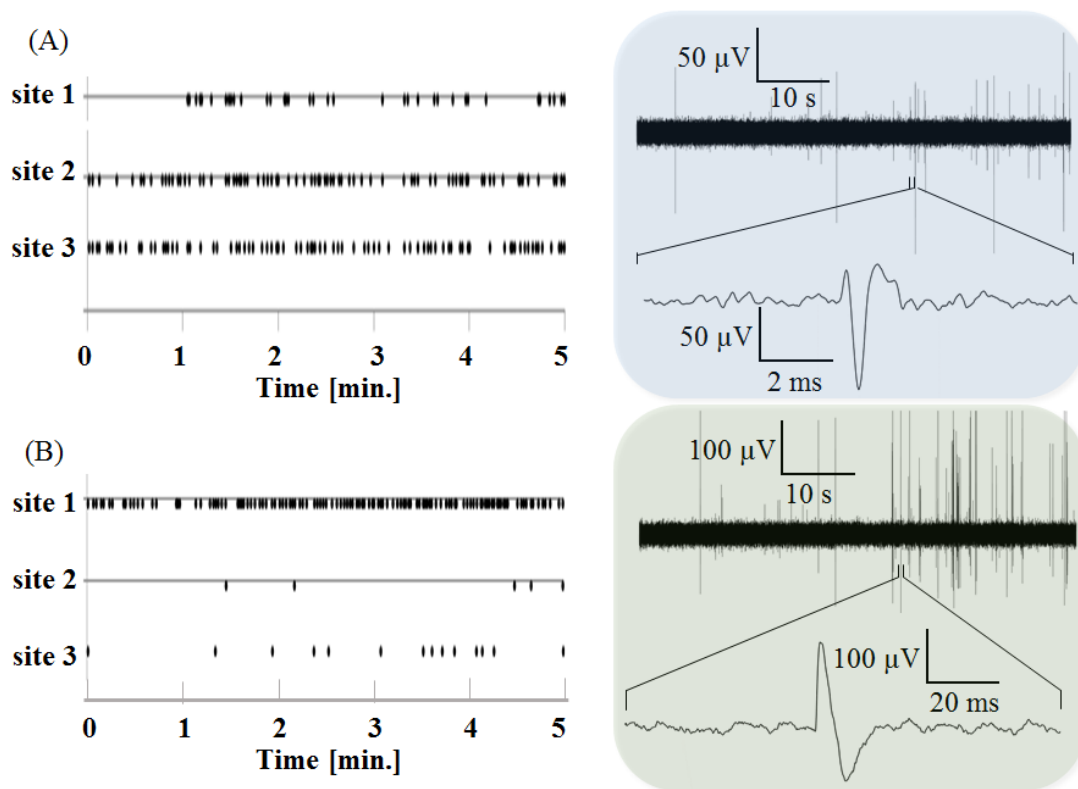


Fig. 2-21 培養自律神経細胞の自発電気活動 (20 DIV)

(A): SCG 神経細胞 (B): ICG 神経細胞

2-3-3-2 細胞内 Ca^{2+} 濃度変化

(1) 培養日数の経過に伴う Ca 信号の変化

培養開始から3日, 7日, 20日の時点で観測した細胞内 Ca^{2+} 濃度変化を Fig.2-22, 23 に示す. 濃度変化を示す波形の縦軸は, 蛍光画像の相対輝度値を表す ($\Delta F/F_0$). 30秒間の計測を実施した. SCG 及び ICG に関して, それぞれ5試料中3試料において Ca^{2+} 濃度変化を測定することができた. 3 DIV の試料では SCG, ICG 神経細胞とも, 明確な細胞内 Ca^{2+} 濃度変化は見られなかった. これに対し, 7 DIV では両者とも, 自発 Ca 変動が生じている. ただし, どちらの系でも細胞間の同期性は認められなかった. また, 変化の時間経過が異なる傾向があり, SCG では比較的ゆっくりした変化が1分間に数回であったのに対し, ICG 神経細胞群で数秒の間に上昇して元に戻る変化が観測された. 20 DIV になると, SCG, ICG 両者とも, 明確に細胞間で同期した Ca^{2+} 振動が記録され, 発生頻度も高くなる傾向であった. タイムコースとしては, SCG が数秒程度の速い変化を示したのに対し, ICG の変化は遅いという, 7 DIV とは逆の傾向になった.

(2) nAChR 遮断時の神経細胞の活動変化

20 DIV の試料について, nAChR の遮断薬を投与した際の変化を調べた. 自発的に生じている Ca 振動が系内の他の神経細胞からのシナプス入力によるもので, ニコチン性アセチルコリン受容体を介するものであると仮定すると, この薬理操作により自発活動は消失することが予想される. 最初に30秒間自発活動を観測し, 溶液投与という機械的な刺激, 環境の変化に対する応答として PBS を添加して30秒間記録, 最後に nAChR に対する阻害薬である Hexamethonium (HEX) を最終濃度が $100 \mu\text{M}$ [Vega et al. 2010; Luther et al. 2013] となる条件で添加し, さらに60秒間の信号取得を行なった. 結果を Fig.2-24 に示す. SCG 及び ICG に関して, それぞれ5試料中2試料において Ca^{2+} 濃度変化を測定することができた. 図中の矢印は PBS 及び HEX を添加したタイミングを示す. 初期状態では SCG, ICG とも自発 Ca 変動が生じていたが, HEX 添加後の60秒間では両者とも明確な Ca 振動は認められないという結果になった. ただし, ICG では PBS 投与の時点で既に自発変動が見られなくなっており, SCG について PBS 投与後に見られた変化もそれまでのものとはタイムコースの異なる経過を示していることから, 今後さらに計測を増やして議論する必要がある.

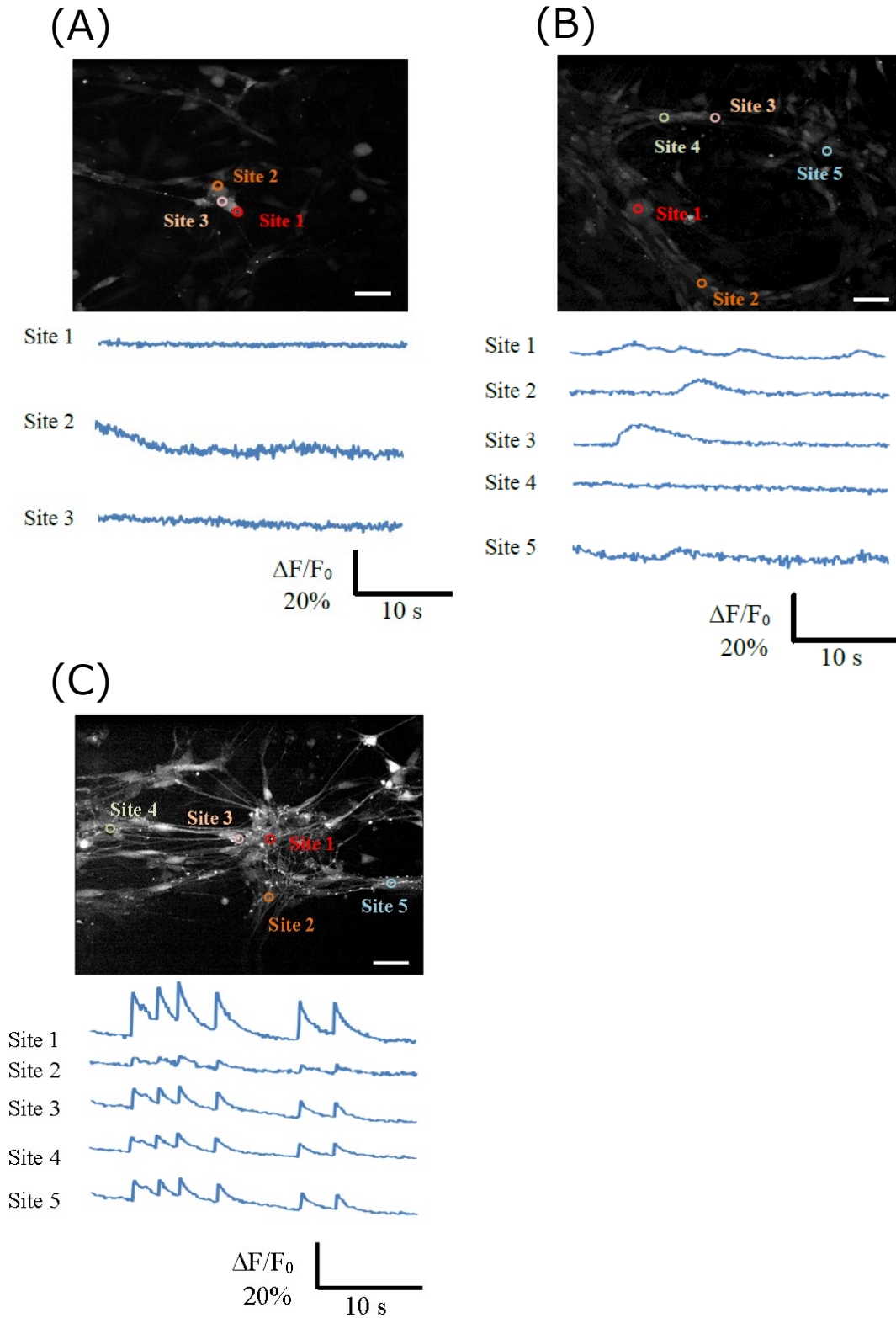


Fig.2-22 培養 SCG 神経細胞の細胞内 Ca^{2+} 濃度変化 (Scale bar, 100 μm)
 (A) 3 DIV, (B) 7 DIV, (C) 20 DIV

3 DIV では明確な Ca^{2+} 濃度変化は見られない。7 DIV では濃度変化が見られるが、細胞内で同期した濃度変化は認められない。20 DIV では細胞内で同期した濃度変化が認められた。

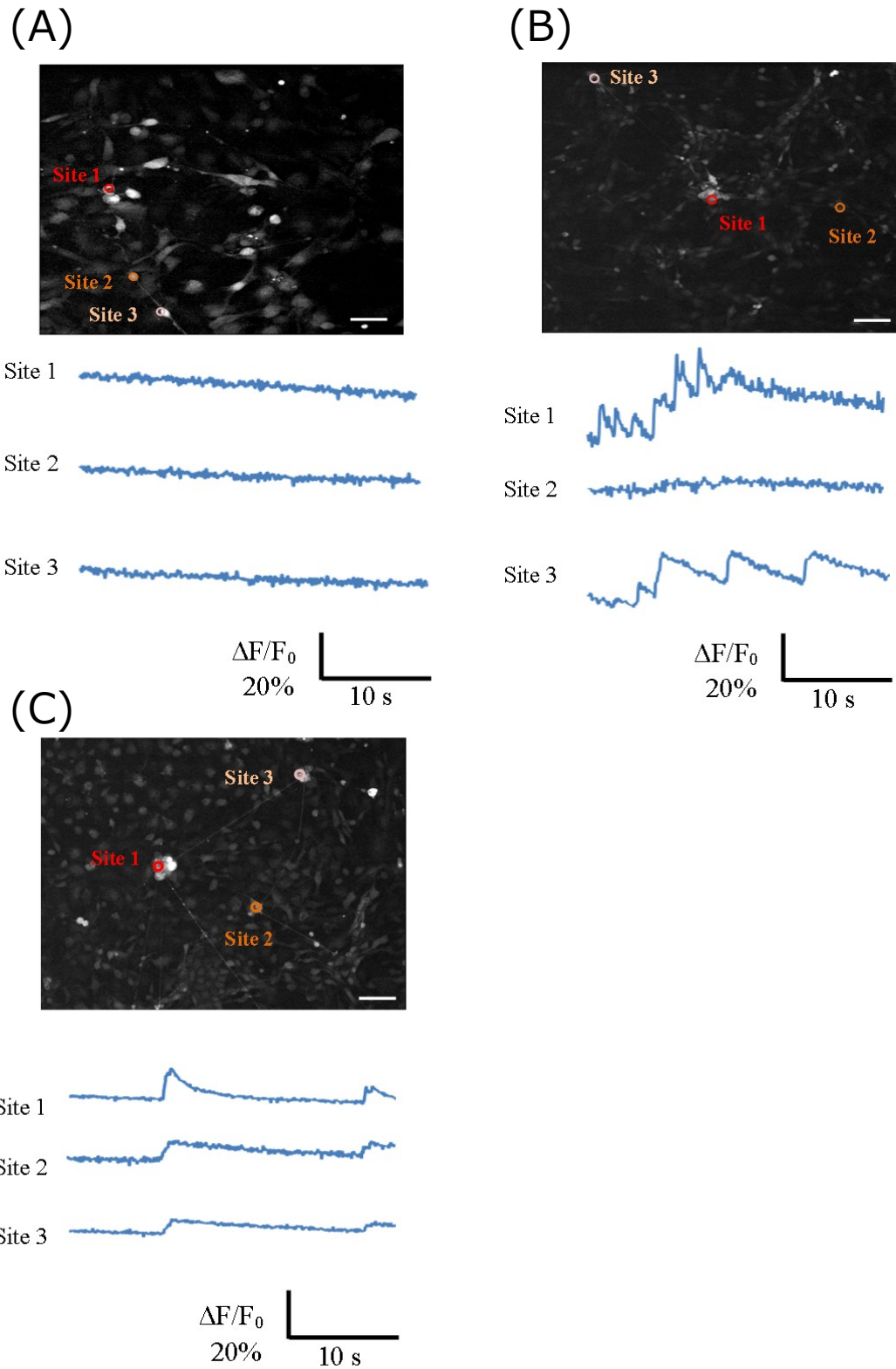


Fig.2-23 培養 ICG 神経細胞の細胞内 Ca^{2+} 濃度変化 (Scale bar, 100 μm)
 (A) 3 DIV, (B) 7 DIV, (C) 20 DIV

3 DIV では明確な Ca^{2+} 濃度変化は見られない。7 DIV では濃度変化が見られるが、細胞内で同期した濃度変化は認められない。20 DIV では細胞内で同期した濃度変化が認められた。

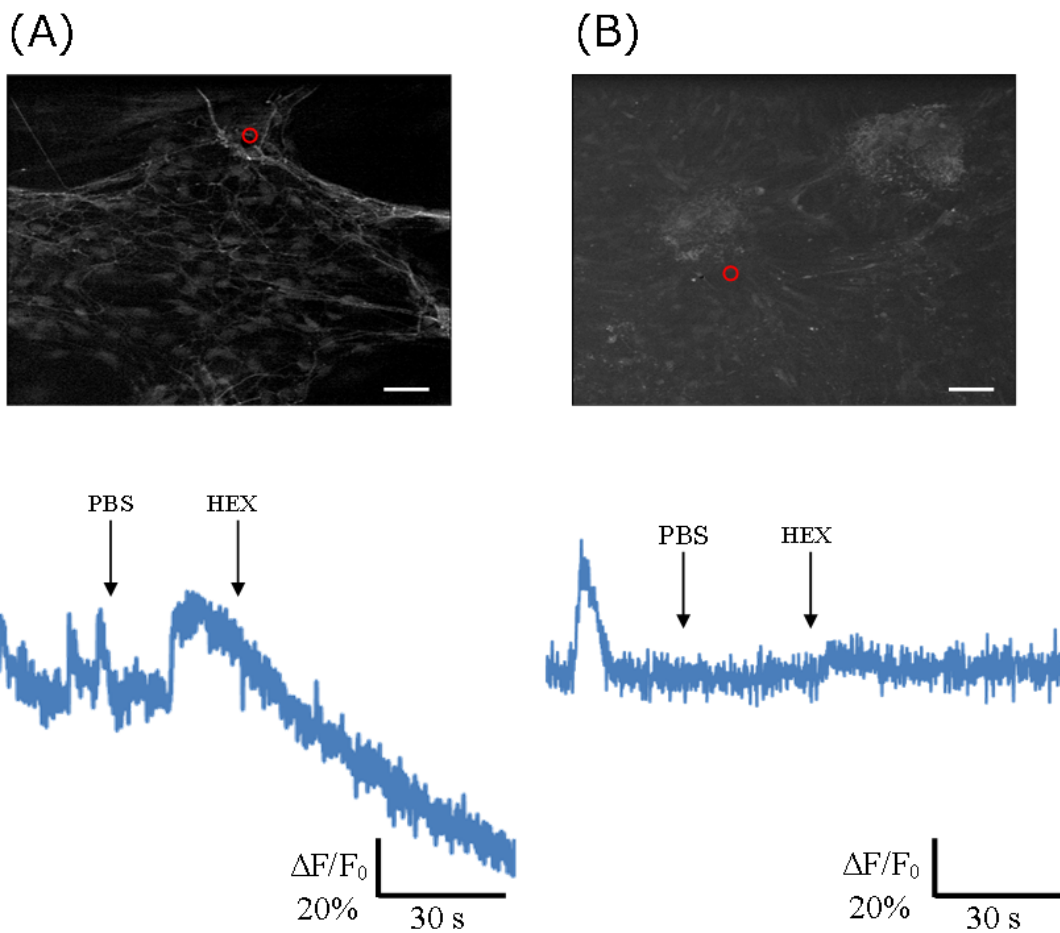


Fig.2-24 nAChR 薬理遮断時の細胞内 Ca^{2+} 濃度変化
(20 DIV; Scale bar, 100 μm)

(A) SCG 神経細胞, (B) ICG 神経細胞

○印で示した位置における Ca^{2+} 濃度変化を示す。
自発的に生じていた Ca^{2+} 濃度変化が HEX 添加後は消失しているように見える。

2-4 考察

2-4-1 副交感神経細胞採取と培養

今回開発した手法の適用により、従来手法の4倍以上の含有率で ICG 神経細胞を採取し、3 週間培養系で維持できることを示した。

ICG 神経細胞は SCG と異なり明確な神経節を作らず、心臓組織表面に分散して存在する。これがその採取を難しくする要因であった。今回、以下の 3 点につきその効果を検討した。

- (1) 顕微鏡下で肺静脈周辺組織 FP を選択的に採取する手技
- (2) 40 μm 径セルストレイナーによるフィルタリング
- (3) 30 分間の pre 培養操作

Fig. 2-2 に示した通り、心臓表面には ICG を多く含む FP 組織が 3 ヶ所(上大静脈—大動脈間、右心房・右肺静脈接合部、左心房・下大静脈接合部)あることが報告されている [Chiou et al. 1997]。今回、このうちの 1 つを標的としてそれを含む組織を顕微鏡下の精密手技で選択的に採取することを試みた。解剖操作を短時間で行なうことが採取する細胞の“生きの良さ”に直結し、他方 3 ヶ所全てから組織を採取することができれば細胞の量を増やすことができる。3 ヶ所の FP で ICG 神経細胞の含有率が異なる可能性もある。これらの要素を勘案した上で、最適な標的の設定、手技の改善を行なうことが今後の課題である。

標的が明確な神経節ではなく「ICG を多く含む肺静脈周辺組織」であるため、採取する試料中に ICG 神経細胞以外の細胞(心房筋細胞や線維芽細胞など)が含まれることは避けられない。その除去の手段として、細胞のサイズの違いに注目したのがセルストレイナーによるフィルタリング操作である。ICG 神経細胞の直径が 20-35 μm とされる [Hassel and Burnstock 1986; Fieber and Adams 1991] のに対し、心房筋細胞は長さ 100 μm 程度であることが報告されており [Mackenzie et al. 2001]、40 μm 径のセルストレイナーを通すことにより心房筋細胞を選択的に除去することができると考えた。ただし、線維芽細胞など心房筋細胞以外のものはこの手法で除去することはできず、また心房筋細胞もその形状は等方的ではないため、流れる方向によってはフィルタを通過することもあり得る。また、ピペッティングによる単離操作後の段階で、複数の ICG 神経細胞がクラスタの状態であった場合は、このフィルタリング操作で除去されてしまう可能性もある。以上の要素を勘案し、条件の最適化を行なう必要がある。

基板表面への接着に要する時間の差異の利用を想定したのが pre 培養の適用である。線維芽細胞はこの時間が筋細胞や神経細胞に比べて短いことが報告されており [Arsic et al. 2008]、この操作によりフィルタリングで除去できない線維芽細胞を選択的に分離することができると考えた。今回、pre 培養時間を 30 分に設定したが、処理時間が短か過ぎる場合は線維芽細胞の除去率が低く、過剰な場合は ICG 神経細胞も除去されてしまうことになる。pre 培養時間の最適化が今後の課題である。

上記3つの要素を考慮したプロセスの適用により、平均6.6%のICG神経細胞を含む培養系が構築できた。これは従来手法の1.5%と比較すると良好と言えるが、SCG神経細胞について得られる47.7%という値には遠く及ばない(この割合はDAPI陽性細胞に対するもので、神経細胞採取時に必然的に付随してくるグリア細胞が含まれることを考慮すると、SCG神経細胞についてはかなり純度の高い採取ができていると考えられる)。交感/副交感神経系の活動バランスの変調に伴う心拍変動を誘導する実験を想定する立場から、ICG神経細胞の純度をSCG神経細胞とのバランスを考えられるレベルまで高くすることが目標となる。そのため、3ヶ所のFPから効率よく組織を採取する手技の確立、フィルタリング及びpre培養条件の最適化により含有率を高くすることが今後の課題である。また、複数の細胞種から特定の細胞種を分離する手法として、細胞の比重の違いを利用した分離法である密度勾配遠心法 [Fried et al. 1978]、細胞表面の特異的なタンパク質をマーカーとしたトラッピング手法である immunopanning 法 [Zhang et al. 2010] やフローサイトメリー (Fluorescence Activated Cell Sorting; FACS) [Sergent-Tanguy et al. 2003] が知られており、処理操作の複雑さ、要する時間などを考慮して、その適用の可能性についても検討する必要がある。

ICGの培養期間に関しては、先行研究 [Hoard et al. 2007] における72時間に対して、本研究では3週間培養することに成功した。長期培養を可能にした要因は培養液に添加する神経栄養因子(2.5S NGF, GDNF)であると考えられる。

* 副交感神経細胞の細胞体のサイズは NGF が存在するか否かで異なる

(NGF 存在下の方が大きい) [Singh et al. 2013]

* 副交感神経細胞である毛様体神経節細胞の生存率は培養液中の GDNF 濃度に依存する

[Buj-Bello et al. 1995]

という報告を勘案し、今回、2.5S NGF(25 ng/mL)とGDNF(10 ng/mL)を添加した培養液を使用した。心筋拍動リズム制御系としての動作、特に交感/副交感神経系の活動バランスの変調に伴う心拍変動を誘導する実験を想定する立場からは、1ヶ月以上の長期培養を可能にする条件の確立が望ましく、他の栄養因子や心房筋細胞との共培養も含めて最適な条件を探索する必要がある。

2-4-2 培養系に含まれる細胞種

自律神経系は、中枢からの指令を受けて標的組織の活動を制御するのがその役割であり、交感神経節後細胞が放出する神経伝達物質はNA、副交感神経節後細胞はAChというのが基本的な考え方である。今回、SCG、ICG培養神経系についてアドレナリン作動性マーカーであるDBH、コリン作動性マーカーであるChATを指標とする免疫組織化学染色を適用して評価したところ:

SCG培養神経系: DBH陽性細胞 96.7±5.7% ChAT陽性細胞 0.6±0.5%

ICG培養細胞系: DBH陽性細胞 8.9±15.3% ChAT陽性細胞 85.1±6.7%

という結果になった。神経細胞のマーカーであるB3Tを発現している細胞に対する割合としてカウントしており、両者の和が100%にならないという結果は(試料が異なることに加えて)、NA作動性、

ACh 作動性以外の神経細胞が系に含まれている可能性を示唆している。交感神経系には Small Intensely Fluorescent (SIF) cell と呼ばれる細胞があり、ドパミン投与に対して応答を示すという報告 [Shtukmaster et al. 2013] があることから、SCG については SIF 細胞が含まれている可能性がある。ICG についても同様の可能性が想定できるが、現時点で関連する報告例はなく、ICG 培養系に含まれるアドレナリン／コリン作動性以外の神経細胞の同定は今後の課題である。

SCG 培養系については、ほぼ全ての神経細胞がアドレナリン作動性であることが示され、心拍制御に関与する交感神経系としての役割を *in vitro* 系で発揮することが期待できる結果となった。ごくわずかに含まれるコリン作動性細胞については 2 つの可能性がある。1 つ目は介在ニューロンが存在する可能性である。前述の通り、節後細胞は節前細胞からの入力の中継するのが主要な役割であり、神経節に介在ニューロンが存在するかどうかという視点からの研究は行なわれていない。しかし、第 1 章に記述した通り、SCG 培養神経系における電気生理実験で、ダブルパッチ記録を適用した結果として nAChR を介するシナプス伝達の存在が示されており [Amendola et al. 2015]、これは介在ニューロンの存在を示唆すると解釈することができる。SIF 細胞が放出する伝達物質は現時点ではまだ同定されていないが、これがコリン作動性である可能性もある。2 つ目は、これも第 1 章で触れた分化転換である。SCG 神経細胞に関しては、非神経細胞と共培養することで交感神経細胞から放出される ACh 量が増大するという報告 [Patterson and Chun 1974] があり、本来アドレナリン作動性であった神経細胞がコリン作動性に変化する現象として認められている。一方、NGF の存在下ではアドレナリン作動性が維持されることを検証した報告もあり [Brum et al. 2006]、培養条件に依存したコリン作動性神経細胞の割合の変化を調べるのが今後の課題となる。

ICG 培養系については、コリン作動性神経細胞約 85%、アドレナリン作動性神経細胞約 9% という結果になり、基本的には副交感神経系としての動作が期待できるが、SCG と比べると純度が低いという結果になっている。これについては明らかな要因が 2 つある。1 つ目は、FP 付近の ICG を選択的に採取するという手技の限界である。心臓組織表面にアドレナリン作動性細胞が局所的に存在する可能性は否定できず、これが混入することは避けられない。2 つ目はカウントした細胞数が少ないことに起因する誤差である。現状、ICG 神経細胞については系全体の細胞の約 6%、最大でも 70 個程度の神経細胞を含むという結果になっている。アドレナリン作動性の細胞が含まれていると判定した試料の場合、カウントした神経細胞数は 30 であり、これを母数とする割合の算出は誤差が無視できない。ICG 神経細胞については、細胞採取と培養条件のさらなる最適化が重要である。ICG 神経細胞については研究例が少なく、現時点で介在ニューロンの存在を示唆する報告はない。心臓標本の肺静脈周辺の免疫組織化学染色により、ICG 神経細胞集団にアドレナリン／コリン両方の作動性を示す細胞が存在することを示した報告 [Zarzos et al. 2013] があり、ICG における特有な細胞種の存在、あるいは分化転換の可能性が示唆される。これらの可能性を想定した評価が必要になる。

SCG 神経細胞群におけるコリン作動性神経細胞、ICG 神経細胞群におけるアドレナリン作動性神経細胞の有無、介在細胞の存在や分化転換の可能性を明らかにすることが今後の課題である。今回は特定の試料に対してはアドレナリン作動性、コリン作動性のいずれかの評価を行なったが、

DBH/ChAT の 2 重染色の適用により, 1 つの系における両者の存在, その割合について確実なデータが得られる. 分化転換が生じる場合, 第 1 章 Fig. 1-4 に示した通り, 過渡的に両者が発現した状態が想定されることを勘案すると, これについても 2 重染色の適用が有効である. 自律神経系の変調に起因する心疾患に注目する立場から, 共培養系を構築して同様の評価を行なっていくことが今後の課題である.

2-4-3 培養自律神経系における神経回路活動

「節前細胞からの入力の中継して標的組織の活動を制御する」という自律神経節の基本的な位置づけゆえに, 神経節内部に相互に結合した神経回路が存在するのか, そこで信号処理が行なわれ生体情報処理システムとして何らかの役割を果たしているのか, という視点からの研究はこれまで行なわれていなかった. 第 1 章に記述した通り, SCG 培養系については nAChR を介するシナプス結合が存在し, かつ可塑性を有することが報告されている [Amendola et al. 2015]. 分化転換 [Fernandez et al. 2015] の可能性も含めてこれらが自律神経活動の変調に起因する心房細動の要因になり得ることを考慮すると, 自律神経節の細胞群が形成する神経回路活動の観測とその可塑性の検討が重要な課題であると考えるのが本研究の立場である.

培養開始後 20 日の時点で MEA を用いた電気活動計測を行なった. SCG, ICG とも自発電気活動が生じていることが確認されたが, 細胞間での時間的な同期は認められないという結果であった. ただし, Fig. 2-21 に示したトレースでは, 1 つの電極で数秒の区間内に多数の細胞の活動が検出されている(振幅の異なる多数のスパイク波形が混在している)ことが認められ, 局所的な細胞間の相関の可能性はある. 一方, 細胞内 Ca^{2+} 濃度計測からは, 神経回路の存在を示唆する結果が得られた. 20 DIV の試料において神経細胞間で明確に同期した自発活動が確認され, これはシナプス結合の存在—神経回路形成—を示唆するものである. 3 DIV の段階では自発活動が見られず, 7 DIV で局所的な(同期性のない)活動が見られ, 20 DIV で同期活動になるという経時変化は, 神経回路としての発達過程を示すものと考えられる.

同期活動の存在は興奮性シナプス結合の関与を示すものである. SCG 培養神経系については前述の通り nAChR を介する興奮性シナプス結合の存在が報告されており [Amendola et al. 2015], これを支持する結果になっている. ICG 培養神経系の神経回路活動についてはこれまで報告がなく, 今回の計測結果はこれについても SCG と同様興奮性シナプス結合の存在を示したことになっている. HEX 投与実験の結果もこれらと矛盾しないものであったが, 明確な活動の消失と結論づけるには不十分であり, 今後更に検討する必要がある.

2-5 結論

本章では、自律神経細胞の培養と、その活動計測を行なった。

採取が技術的に困難であり、心房表面組織から単離した細胞の 72 時間の培養が報告されるにとどまっていた副交感神経細胞につき、採取の手技、単離のプロセス、培養環境の改良を通して、これまでの 4 倍以上の副交感神経細胞を含む培養系を 3 週間維持する技術を確立した。

交感神経細胞を含めた免疫組織化学染色法による細胞種の評価より、培養系に維持した交感神経細胞のうちの 95%以上がアドレナリン作動性を示し、また副交感神経細胞についても約 85%がコリン作動性を示すことが確かめられ、共培養系の構築に向けた要素技術であることが示された。

これまで単一細胞の活動計測にとどまっていた自律神経細胞につき、ネットワークとしての活動を観測した。SCG, ICG 神経細胞を 20 日間培養させた時点で同期した自発活動が確認され、節後神経である両神経細胞はネットワークを形成することが明らかとなり、神経細胞間のシナプス伝達に関与する受容体が nAChR である可能性が示された。

第3章

自律神経細胞－心筋細胞共培養システムの構築

本章では、交感神経細胞、副交感神経細胞、心筋細胞の3要素からなる共培養システムの構築を行なった結果を述べる。

自律神経－心筋 *in vitro* 系として、交感神経細胞と心筋細胞の共培養系を構築し、両者の信号を同時に計測した報告があるが、副交感神経細胞を含めた「交感－副交感神経からなる自律神経システムによる支配を受ける心筋細胞群の *in vitro* 再構成」は実現されていない。本研究では、「自律神経支配を受けることによって生じる心筋細胞拍動リズム変化の検出」と「自律神経細胞の慢性刺激により心筋細胞活動の不可逆な変化を誘導する条件の導出」を目的として、3つの細胞培養区画を集積化した基板を設計・製作して、交感神経細胞、副交感神経細胞と心筋細胞の共培養を行なった。結果、自律神経細胞の自発活動及び神経刺激により心筋細胞の拍動リズムが変動すること、交感神経細胞に対する慢性刺激により心筋細胞活動の不可逆な変化を誘導する可能性があることが明らかになった。

3-1 自律神経系による心拍制御システムの研究

不整脈, 中でも心房細動の発生において, 自律神経系による心拍制御システムが関与する可能性を, 第1章において述べた. 心房細動の発症機序における自律神経活動の変化, つまり交感神経活動および副交感神経活動の亢進の寄与を理解することは, 治療方法の改善や予防医学の発展において大きな意義を持つ. 現在, 実験動物を用いた *in vivo* 実験, および培養細胞を用いた *in vitro* 実験の両方から研究が行なわれているが, 課題も残っている.

実験動物を用いた *in vivo* 実験系では, 自律神経系への刺激による心臓活動の変化に関する研究が広く行なわれている. He らは, 心臓神経叢に対し電気刺激を行なうことで, 心室の不応期が延長することを示した [He et al. 2013a; He et al. 2013b]. また, Huang らは, 交感神経に対する電気刺激後に迷走神経を刺激することで, 心拍が交感神経刺激前の状態に戻ることを示した [Huang et al. 2014]. *In vivo* 実験系では, 実際の生体で起こる現象を観測できるという利点がある. しかし, 自律神経系と心臓以外の臓器の影響を無視できない点や, 実験動物に対する侵襲性が高く長期評価に適さない点から, 自律神経系と心臓のみに着目した長期的な活動評価が困難である.

一方, 培養細胞を用いた *in vitro* 実験系では, マイクロ加工技術により複数の細胞集団を区画化して培養できるようになった. Nelson らは, 複数の培養区画を設けた培養チャンバを用いることにより, 交感神経細胞と筋細胞を区画化して共培養することに成功した [Nelson et al. 1993]. また, 区画間に微小通路を設けることで, 異なる区画の神経細胞集団が相互に機能的結合を形成することが示された [Park et al. 2009; Pan et al. 2015]. 自律神経細胞と心筋細胞に着目した場合, Takeuchi らにより, 共培養環境において SCG 神経細胞が心室筋細胞集団を機能的に神経支配したことが報告された [Takeuchi et al. 2011]. 上記のように, *in vitro* 実験系は, 対象とした細胞を抽出して評価できる点や, 理想的な培養環境を構築できる点から, 複数の細胞集団の関係の評価において有効である.

以上から, 自律神経系による心拍制御システムの評価には, 自律神経系を構成する交感神経細胞および副交感神経細胞と心筋細胞を共培養することが有効であると考えられる. しかし, 培養系において, 副交感神経細胞と心筋細胞の関係を評価した例はない. 理由として, これまでは純度の高い副交感神経細胞を得ることが技術的に困難であったことが挙げられる. 一方, 本研究では, 第2章で述べたように, 組織の採取方法および播種前の処理を工夫し, 副交感神経細胞である ICG 神経細胞の採取効率を改善し, 長期培養に成功した. 本手法により, 困難であった交感神経細胞, 副交感神経細胞および心筋細胞を含む共培養系が構築できると考えられる.

本章では, 交感神経細胞, 副交感神経細胞および心筋細胞の3要素からなる共培養系システムの構築を行なう. 最初に, SCG 神経細胞, ICG 神経細胞, および心房筋細胞を共培養し, それぞれの神経細胞が心房筋細胞を神経支配したことを確認する. 続いて, 自律神経支配を受けた場合に, 心筋拍動リズムにバラツキがあることを示す. 最後に, 交感神経細胞群に慢性的な電気刺激を行ない, 心筋拍動リズム変化の誘導を試みる.

3-2 実験方法

3-2-1 共培養システム

3-2-1-1 共培養システムの設計

交感神経細胞、副交感神経細胞及び心房筋細胞の共培養を達成するために、本システムが備えるべき設計要求事項は以下の通りとした。

- (1) 交感神経細胞、副交感神経細胞および心筋細胞をそれぞれ独立した状態で培養できること。
- (2) 交感神経細胞及び副交感神経細胞が、心筋細胞に対して機能的支配を形成できること。
- (3) それぞれの細胞集団の活動を計測できること。
- (4) 交感神経細胞のみ、もしくは副交感神経細胞のみに対して任意のパターンの電気刺激を印加できること。

(1)及び(2)を満足するために、培養細胞を任意の場所で培養するための培養区画、および神経細胞の軸索のみが選択的に通過できる微小通路を有する培養デバイスを設計し、マイクロ加工技術を使用して構築した。(3)及び(4)を満足するために、多数の細胞からの時空間的な活動を計測できる点、非侵襲性であり長期的な計測に適する点、さらには任意の点からの電気刺激ができる点から、細胞外電位記録システムを使用した。

自律神経細胞ー心筋細胞共培養システムは、マイクロ加工技術により作製した培養チャンバと MEA 基板を組み合わせることで構築した。培養チャンバ及び MEA 基板のデザインを、それぞれ Fig. 3-1 及び Fig. 3-2 に示す。

培養チャンバの 3 つの培養区画は、神経細胞を培養するための 2 つの小培養区画と心房筋細胞を培養するための 1 つの大培養区画から構成される。200 μL のピペットチップを使用して細胞を播種することを考慮し、小培養区画は縦 2 mm×横 2 mm、大培養区画は縦 4.6 mm×横 2 mm とした。また、培養区画の高さは、細胞播種時に各細胞種が混合しないよう、1 mm とした。微小通路は、2 つの小培養区画と大培養区画の間に、10 本ずつ設けた。微小通路の幅や長さは、予備実験として交感神経細胞及び副交感神経細胞の軸索伸長評価を行ない、幅 50 μm 、長さ 400 μm とした。また、微小通路の高さは、神経軸索のみを選択的に伸長させることを考慮して 5 μm とした。

MEA 基板上の微小電極の配置は、培養チャンバの培養区画の寸法を考慮して設計した。2 つの小培養区画には 4×4 の配置で 16 点、大培養区画には 8×4 の配置で 32 点の微小電極を配置した。それぞれの微小電極の寸法は 50 μm ×50 μm とし、各パターン内において微小電極の中心間隔を 500 μm に設定した。

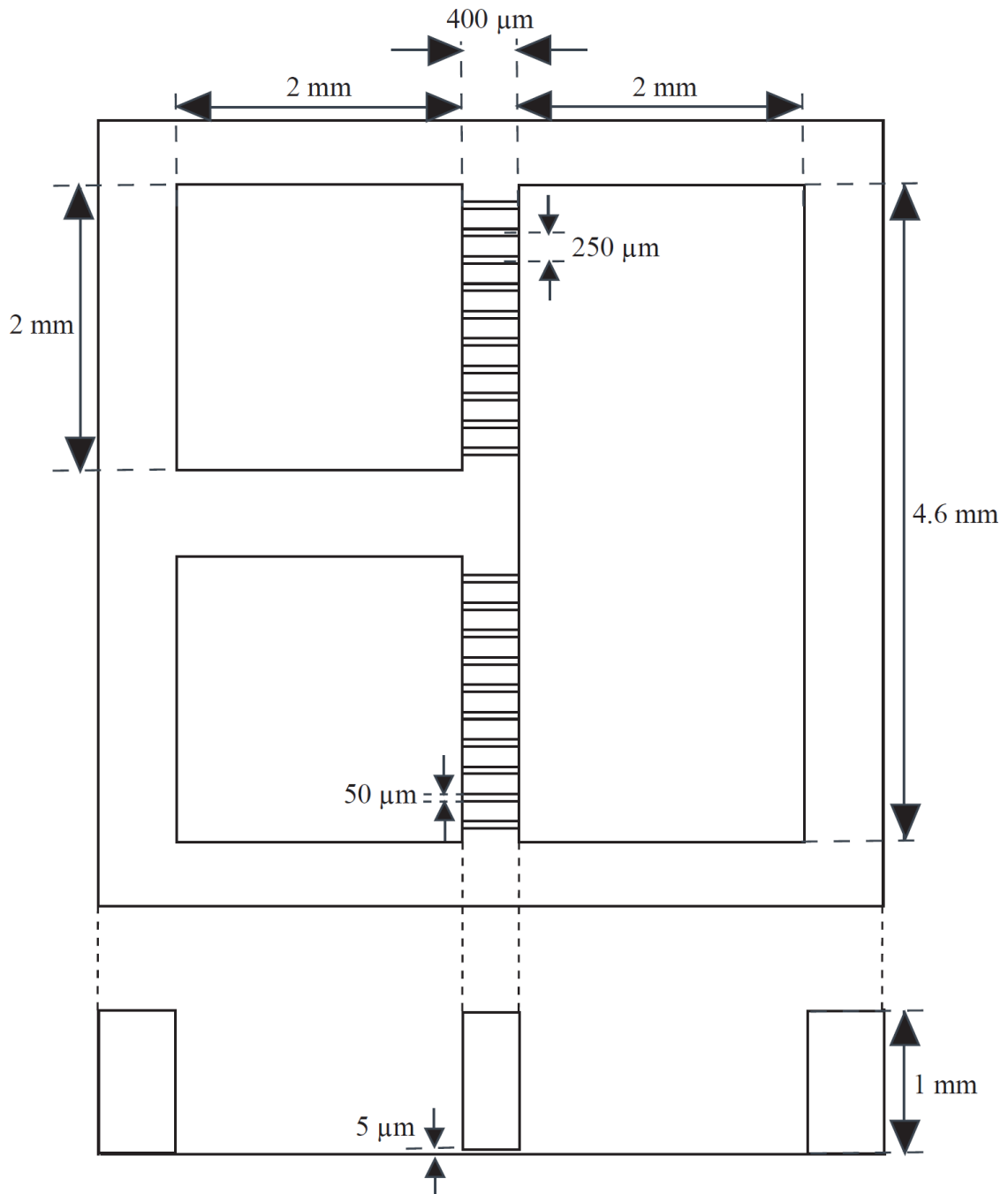


Fig. 3-1 培養チャンバのデザイン. 左側の2つの培養区画が, 自律神経細胞を培養するための小培養区画である. 右側が心筋細胞を培養するための大培養区画である. 培養区画間は, 10本の微小通路によって連絡している.

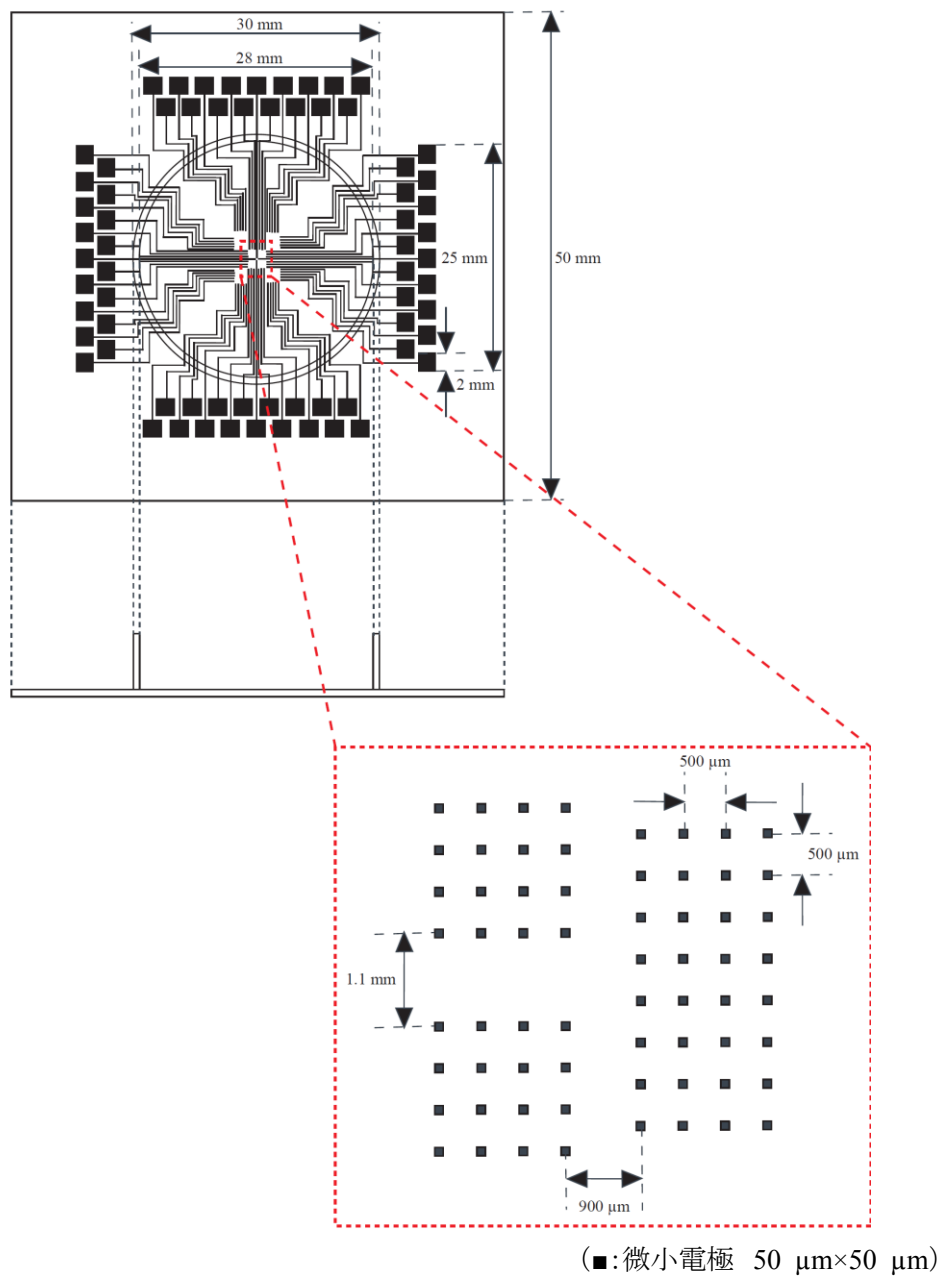


Fig. 3-2 MEA のサイズ及び微小電極の配置. 小培養区画および大培養区画には, それぞれ 16 点及び 32 点の微小電極を配置した.

3-2-1-2 鋳型の作製

培養チャンバと MEA 基板はフォトリソグラフィ技術により作製した。ここでは、培養チャンバの形成に利用する鋳型の作製手順を述べる。鋳型はシリコンウエハ上にネガティブレジストである SU-8 の構造物を構築することで作製した。鋳型の作製手順を Fig. 3-3 に、作製した鋳型を Fig. 3-4 に示す。

(1) シリコンウエハ表面の前処理

シリコンウエハを界面活性剤(コンタミン LS-II; 和光純薬工業)で 15 分間超音波洗浄した。次に、基板表面上の濡れ性を向上させるために 0.5 M 水酸化ナトリウム水溶液で 90 分間超音波洗浄した。シリコンウエハを超純水により洗浄した後、140°C のホットプレート上で乾燥させた。最後に、1,1,3,3,3-Hexamethyldisilazane (HMDS; 和光純薬工業)をスピコート(4500 rpm, 60 秒)した後、再度乾燥させた。

(2) 微小通路構造の構築

シリコンウエハ上に 5 μm の厚さで SU-8 3005 (MicroChem) をスピコート(4000 rpm, 30 秒)し、95°C のホットプレート上で 3 分間プリベイクした。次に、微小通路構造のパターンを有するフォトマスクとシリコンウエハを密着させ、ハンディタイプの紫外線露光装置 (HLR100T-2; アズワン) を用いて紫外線を 30 秒間照射した。照射後、シリコンウエハを、65°C および 95°C のホットプレート上で、それぞれ 1 分間および 3 分間ポストベイクした後、室温まで冷却した。続いて、SU-8 Developer (MicroChem) を使用して現像し、イソプロパノール、超純水の順にすすぎを行なった。最後に、シリコンウエハを 140°C のホットプレート上で乾燥させた。

(3) 培養区画構造の構築

シリコンウエハ上に 100 μm の厚さで SU-8 3050 (MicroChem) をスピコート(1200 rpm, 30 秒)し、95°C のホットプレート上で 45 分間プリベイクした。その後、培養区画構造のパターンを有するフォトマスクとシリコンウエハを密着させ、紫外線露光装置を用いて紫外線を 30 秒間照射した。照射後、シリコンウエハを 65°C および 95°C のホットプレート上で、それぞれ 1 分間および 15 分間ポストベイクした後、室温まで冷却した。次に、SU-8 Developer を使用して現像し、イソプロパノール、超純水の順にすすぎを行なった。続いて、シリコンウエハを 140°C のホットプレート上で乾燥させた。最後に、シリコンウエハを 150°C のホットプレートで 40 分間ハードベイクし、SU-8 構造物をシリコンウエハに強固に接着させた。

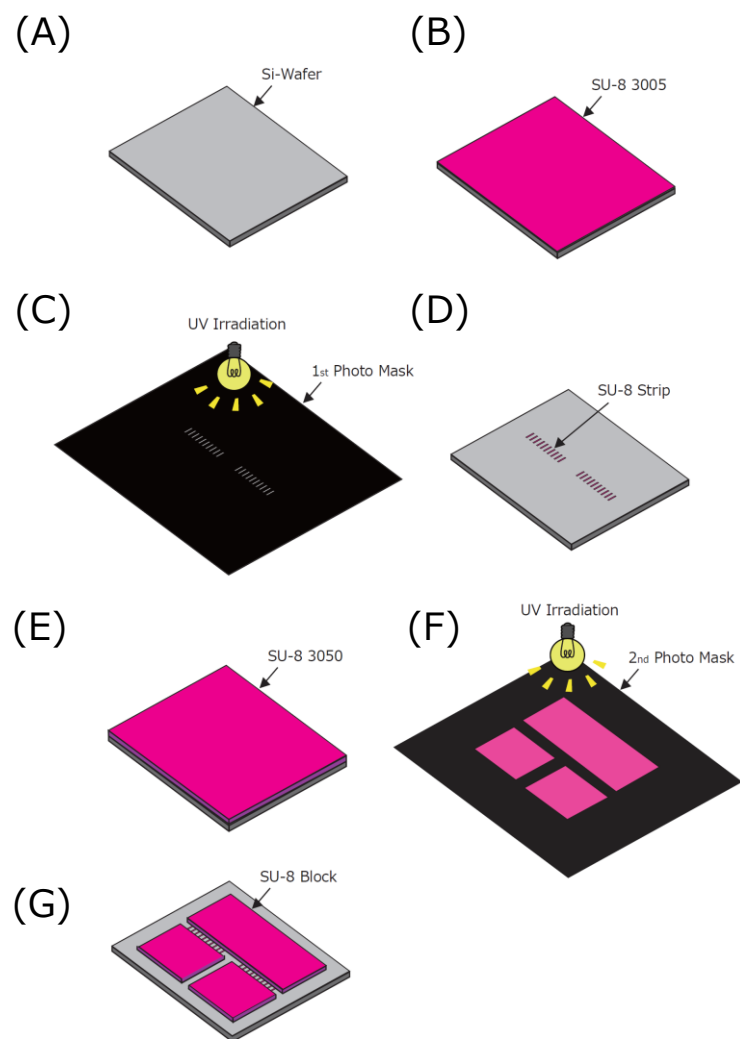


Fig. 3-3 SU-8 鑄型の作製手順. シリコンウエハ(A)上に SU-8 3005 をスピコートした(B). 微小通路構造を有するフォトマスクを介して紫外線を照射した(C). SU-8 Developer を使用して現像した(D). SU-8 3050 をスピコートした(E). 培養区画構造のパターンが転写されたフォトマスクを介して紫外線を照射した(F). SU-8 Developer を使用して現像した(G).



Fig. 3-4 作製した SU-8 鑄型. 左側の 2 つの小培養区画と, 右側の大培養区画が見られる.

3-2-1-3 培養チャンバの作製

培養チャンバは、鋳型上に生体適合性の高いシリコンゴムである Polydimethylsiloxane (PDMS) を流し込み、硬化させることで作製した。培養チャンバの作製手順を Fig. 3-5 に、作製した培養チャンバを Fig. 3-6 に示す。PDMS 及び硬化剤 (Silpot 184, 東レ・ダウコーニング) を重量比 10:1 の割合で混合し、鋳型上に流し込んだ。次に、80°C のホットプレート上で 1 時間静置し硬化させた。硬化後、鋳型から PDMS を剥離し、培養区画に相当する部分を手術用メスにより切り出すことで培養チャンバを形成した。最後に、付着したホコリやカビなどを除去するために、70% エタノール及び超純水により洗浄を行なった後、30-40 分間紫外線を照射した。

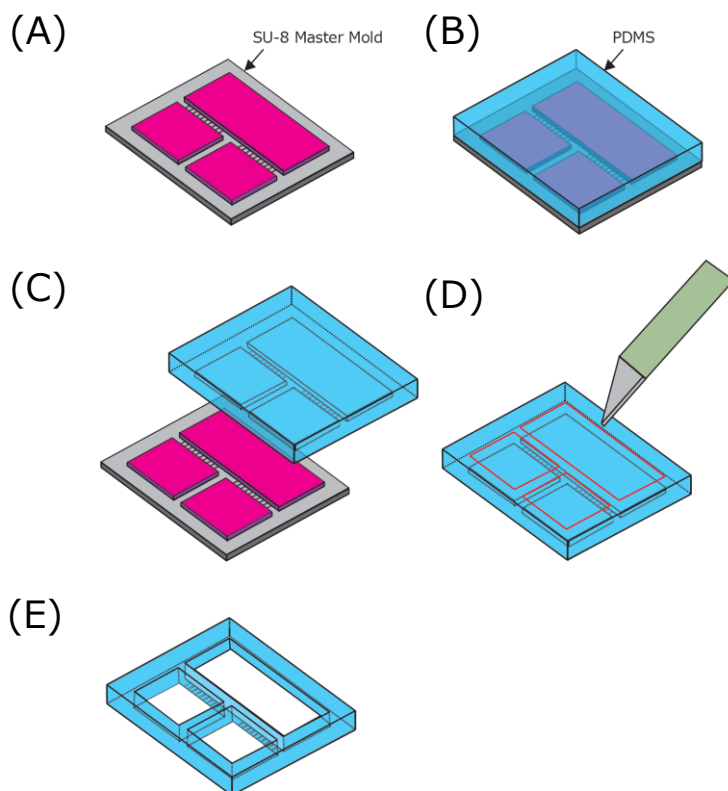


Fig. 3-5 培養チャンバの作製手順。鋳型(A)上にPDMSと硬化剤の混合物を流し込み、硬化させた(B)。PDMSを鋳型から剥離し(C)、培養区画に相当する部位のPDMSを切り出した(D, E)。

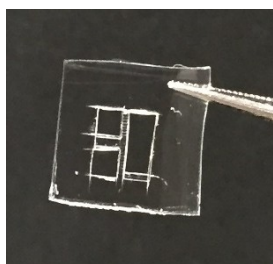


Fig. 3-6 作製した培養チャンバ。

3-2-1-4 MEA 基板の作製

MEA 基板は, 2-2-2-1 項に示す手順で作製した.

3-2-1-5 共培養デバイスの構築

培養チャンバと MEA 基板を組み合わせることで共培養デバイスを構築した. 培養区画内に微小電極が配置されるよう, 双眼実体顕微鏡下で培養チャンバを MEA 基板上に配置した. 共培養デバイスを Fig. 3-7 に示す. 以下, 小培養区画を右側に配置した際の, 上側の小培養区画を Compartment A, 下側の小培養区画を Compartment B, 大培養区画を Compartment C と呼称する.

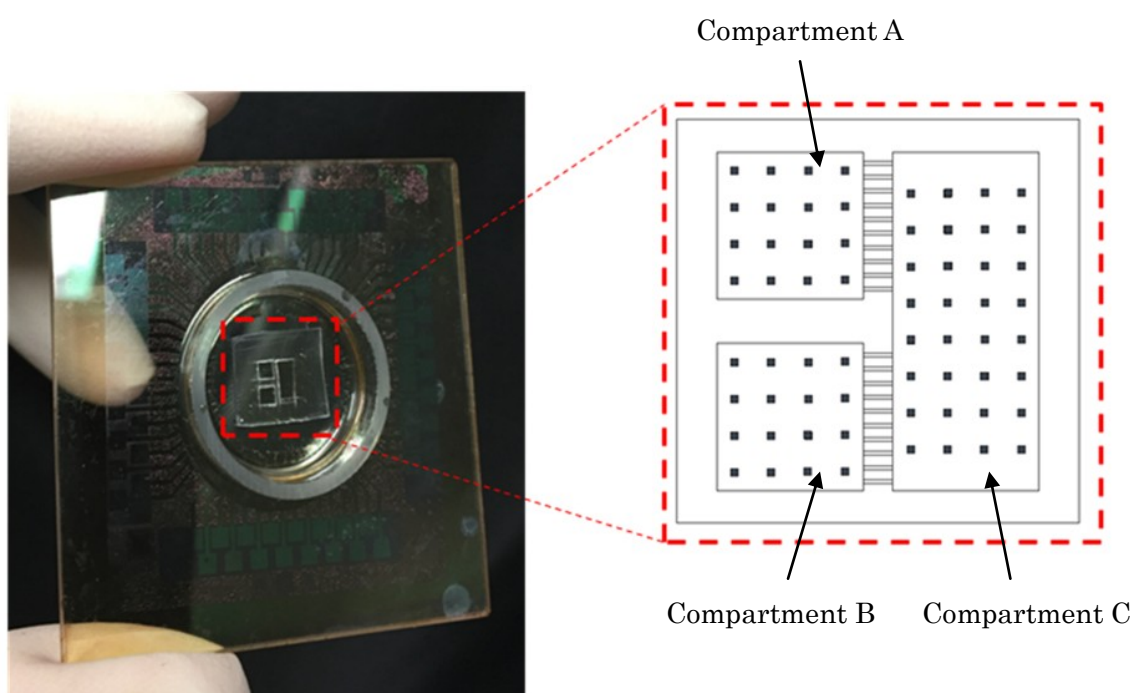


Fig. 3-7 構築した共培養システム. 交感神経細胞, 副交感神経細胞, 及び心房筋細胞をそれぞれ Compartment A, Compartment B, 及び Compartment C 内で培養した.

3-2-2 細胞培養

共培養には、交感神経細胞及び副交感神経細胞として、それぞれ SCG 神経細胞及び ICG 神経細胞を用いた。また、心筋細胞として、SCG 及び ICG より伸長する節後神経の大半が投射する洞房結節を含めた心房筋細胞を用いた。また、共培養には、2 章において SCG 神経細胞および ICG 神経細胞を培養した培養液を用いた。培養環境を維持するために、2 日に 1 度の頻度で培養液を半量交換した。SCG 神経細胞及び ICG 神経細胞の採取及び単離は、それぞれ 2-2-1 項に示す手順で行なった。

心房筋細胞の単離は、Hassall らの方法を一部改変して行なった [Hassall et al. 1988]。はじめに、1-3 日齢の Wistar Rat 新生児(チャールズリバー)から心房組織を採取し、10 mL HBSS を入れた 60 mm 径滅菌シャーレ(Corning)内で、眼科用はさみを用いて細切した。次に、細切した心房筋片を 50 µg/mL Trypsin を添加した 10 mL の HBSS に移し、4°C の冷蔵庫内で 16-20 時間静置した。さらに、心房筋片を含んだ HBSS を 50 mL 遠沈チューブに回収し、2 mg/mL Collagenase を添加した後、37°C に保温したシェイキングバス内で 3-5 分間攪拌した。酵素処理後、10% (v/v) FBS を含む DMEM を 5 mL 加えてピペッティングし、心房筋細胞を単離した。続いて、70 µm 径のセルストレイナー(BD)を通した後、120 g、4°C の条件下での 3 分間の遠沈操作、及び FBS を含む DMEM による上清の置換操作からなる洗浄過程を 3 度繰り返すことで、酵素の作用を停止させた。細胞懸濁液に含まれる線維芽細胞の比率を低下させるために、細胞懸濁液を 35 mm 径滅菌シャーレ内に移し、インキュベータ内で 30 分間 pre 培養を行なった。pre 培養後、滅菌シャーレ内の細胞懸濁液を 15 mL 遠沈チューブに回収し、再度細胞濃度の調節を行なった。

単離細胞を播種する前に、2-2-1 項に示す手順でコラーゲンをコーティングした。培養デバイスの微小通路内にコーティング液を充填するために、真空チャンバにより微小通路内の空気を脱気した後、培養区画にコーティング液を充填した。SCG 神経細胞、ICG 神経細胞及び心房筋細胞は、それぞれ Compartment A、Compartment B 及び Compartment C に 1000 cells/mm² の密度で播種した。なお、心房筋細胞は ICG 神経細胞及び SCG 神経細胞を播種してから、16-20 時間後に播種した。本章では、心房筋細胞を播種し、共培養を始めた日を 0 DIV と定義した。

3-2-3 共培養システムの形態的評価

3-2-3-1 蛍光細胞リンカー法

共培養デバイス内において、SCG 神経細胞、ICG 神経細胞及び心房筋細胞が混在しなかったことを確認するため、蛍光細胞リンカー法を用いた。蛍光細胞リンカー法は、長鎖脂肪酸末端を持つ Paul Karl Horan (PKH) 色素を利用した標識手法である。PKH 色素を含む溶液内で細胞をインキュベートすることで、長鎖脂肪酸末端が細胞膜の脂質領域に挿入され、細胞表面を標識できる。

本実験では、PKH26 及び PKH67 の 2 種類の色素を使用して、培養細胞を標識した。以下に、蛍光細胞リンカー法の手順を述べる。はじめに、標識媒体 (Diluent C; Sigma) 248 μ L に蛍光色素を 2 μ L を加え、蛍光色素溶液を調整した。次に、細胞懸濁液を、120 g, 室温の条件下で 3 分間遠沈し、上清を吸引した。続いて、5 mL PBS を用いて細胞を懸濁した後、再度 120 g, 室温の条件下で 3 分間遠沈し、上清を吸引した。Diluent C 250 μ L を用いて細胞を懸濁した後、懸濁液と蛍光色素溶液を混合し、室温で 2-5 分間インキュベートすることにより、蛍光色素をロードした。最後に、PBS で 3 度洗浄した後、細胞を培養液で懸濁し播種した。

PKH26 は、波長 546 nm の励起光に対して、波長 567 nm 程度の赤色光を発し、PKH67 は波長 488 nm の励起光に対して、波長 504 nm 程度の緑色光を発する。そこで、それぞれの蛍光波長において画像を取得した。蛍光画像の取得には、2-2-1 項において示した免疫組織化学染色と同様のシステムを用いた。

3-2-3-2 免疫組織化学染色法

免疫組織化学染色法は、2-2-1 項に示す手順で行なった。1 次抗体として、神経細胞のマーカーである Anti-B3T antibody (400 倍; Abcam), 心筋細胞のマーカーである Anti-cardiac troponin I (cTnI) antibody (200 倍; Abcam), アドレナリン作動性細胞マーカーである Anti-DBH antibody (500 倍; Abcam) 及びコリン作動性マーカーである Anti-ChAT antibody (200 倍; Abcam) を用いた。2 次抗体として、Alexa fluor 488 anti-mouse IgG (Molecular probes) 及び Alexa fluor 546 anti-rabbit IgG (Molecular probes) を、それぞれ 500 倍の希釈倍率で用いた。

3-2-4 電気活動計測による神経支配の評価

細胞外電位記録システムを用いて、自律神経細胞及び心房筋細胞の活動を計測した。計測に利用したシステム及び活動の検出方法は、2-2-2-1 項に示した通りである。本項では、実験の目的ごとに、実験の概要および手順について述べる。なお、関与する神経伝達物質の確認のため、AR 及び AChR に対する拮抗薬として、先行研究を参考に、それぞれ propranolol 及び atropine を最終濃度 1 μ M で用いた [Hutter and Trautwein 1956; Black et al. 1964]。薬理遮断の際は、propranolol 及び atropine を同時に添加した。また、心房筋細胞の活動の評価指標には、活動のスパイク間隔として計測される拍動間隔 (Inter-Beat-Interval; IBI) を用いた。また、全てのデータは、平均値 \pm 標準偏差で示した。

3-2-4-1 自律神経細胞の活動による心房筋細胞の拍動リズム変動の評価

自律神経細胞群の自発活動が心房筋細胞の拍動リズムに与える影響を評価するために、自律神経細胞及び心房筋細胞から自発活動を計測した。対照群として、Compartment C に心房筋細胞のみを培養した試料(Myocyte 群), 及び β AR と mAChR を遮断した試料(Blockade 群)を用いた。使用する試料数はそれぞれ 4 試料とし、15 分間の自発活動を記録した。IBI は、15 分間の平均値で正規化した後、1 分間のピンごとの平均値として表示した。

3-2-4-2 自律神経細胞群に対する電気刺激実験

自律神経細胞と心筋細胞の機能的結合を、電気刺激により自律神経細胞の活動を誘発した前後での心房筋細胞の活動を計測した。SCG 神経細胞を刺激する際は Compartment A に配置した全電極から、ICG 神経細胞については Compartment B 内の全電極から印加した。電気刺激の波形は、定電圧の双極性方形波とした。予備実験により、SCG 神経細胞及び ICG 神経細胞が応答し、電気化学反応が発生しない条件を検討し、パルス幅を 1 ms に設定した。

最初に、刺激パラメータ決定のための予備実験を行なった。まず、刺激強度を決めるために、電気刺激に対する自律神経細胞群の誘発応答を計測した。本項目では、刺激頻度を 0.1 Hz とし、刺激強度を 1 V, 2 V 及び 3 V の 3 条件に設定した。続いて、刺激頻度を検討した。刺激強度を 3 V に設定し、刺激頻度を Levy らの刺激条件 [Levy and Zieske 1969]を基に、0.1 Hz, 1 Hz, 10 Hz の 3 条件に設定した。以上の予備実験を基に、刺激強度および刺激頻度を決定した。

次に、自律神経細胞が心房筋細胞を神経支配したことを確認するために、SCG 神経細胞あるいは ICG 神経細胞を刺激した際の心房筋細胞の活動変化を評価した。自発活動を 5 分間計測した後、SCG 神経細胞あるいは ICG 神経細胞に対して 1 分間の電気刺激を印加した。刺激後、再度自発活動を計測した。SCG 神経細胞については、8 試料中 4 試料では刺激後 5 分間、残り 4 試料で刺激後 10 分間の活動を計測した。ICG 神経細胞については、9 試料中 4 試料では刺激後 5 分間、残り 5 試料では刺激後 10 分間の活動を記録した。さらに、化学シナプスを介した機能支配であることを確認するために、拮抗薬を用いた。試薬添加後、計測システム内に 10 分間試料を静置した後、同様のプロトコルで刺激実験を行なった。心房筋細胞の活動変化の評価指標として、電気刺激前の IBI の平均値で正規化した IBI の値(以下、IBI ratio とする)と、IBI の平均値と標準偏差の比率である変動係数(Coefficient of variation; C.V.)を用いた。薬理遮断の影響を評価する際は、刺激後 5 分間のデータを用いた。

3-2-5 心房細動モデルとしての共培養システムの評価

本研究では、SCG 神経細胞に対して慢性的な電気刺激を印加し、心筋細胞拍動リズムの変化の誘発を試みた。実験プロトコルを以下に示す。培養細胞の自発電気活動を 20 分間計測した後、SCG 神経細胞に対して電気刺激を 1 時間印加した。刺激終了後から、再度自発活動を計測した。電気刺激の頻度は 10 Hz とし、刺激強度を 3 V に設定した。使用する試料数は 2 試料とした。1 試料については、刺激終了後から 1 時間自発活動を計測した。残り 1 試料については、刺激終了後から 3 時間自発活動を計測し、さらに 1 日後に自発活動を 20 分間計測した。

3-3 実験結果

3-3-1 共培養システムの形態的評価

播種 12 時間後の SCG 神経細胞及び ICG 神経細胞を Fig.3-8 に示す。心房筋細胞を播種する前に、SCG 神経細胞(緑色)及び ICG 神経細胞(赤色)を観察した。結果、SCG 神経細胞体及び ICG 神経細胞体は、互いに混在することなく各培養区画内に生着したことが確認された。

次に、各培養細胞播種後の細胞形態変化を Fig. 3-9 に示す。SCG 神経細胞群は、1 DIV から軸索を伸長し始め、3 DIV では、神経細胞同士がネットワークを構築した様子が観察できた。ICG 神経細胞群では、非神経細胞の割合が高く、神経細胞の判別が困難であった。心房筋細胞群では、共培養開始 12 時間後には少数の細胞が自発的に拍動する様子が観察されたが、細胞間で同期した拍動は確認できなかった。1 DIV で、拍動する細胞数が増加し、数個単位の細胞集団において同期した拍動が確認できた。

20 DIV において微小通路内に伸長した自律神経細胞の軸索の様子を Fig.3-10 に、各自律神経細胞の軸索が Compartment C に到達した様子を Fig.3-11 に示す。SCG 神経細胞の軸索は大半の微小通路内に伸長したのに対し、ICG 神経細胞の軸索は少数の微小通路内に伸長した。さらに、微小通路内を伸長した軸索は心房筋細胞上へと伸長した様子が見られた。

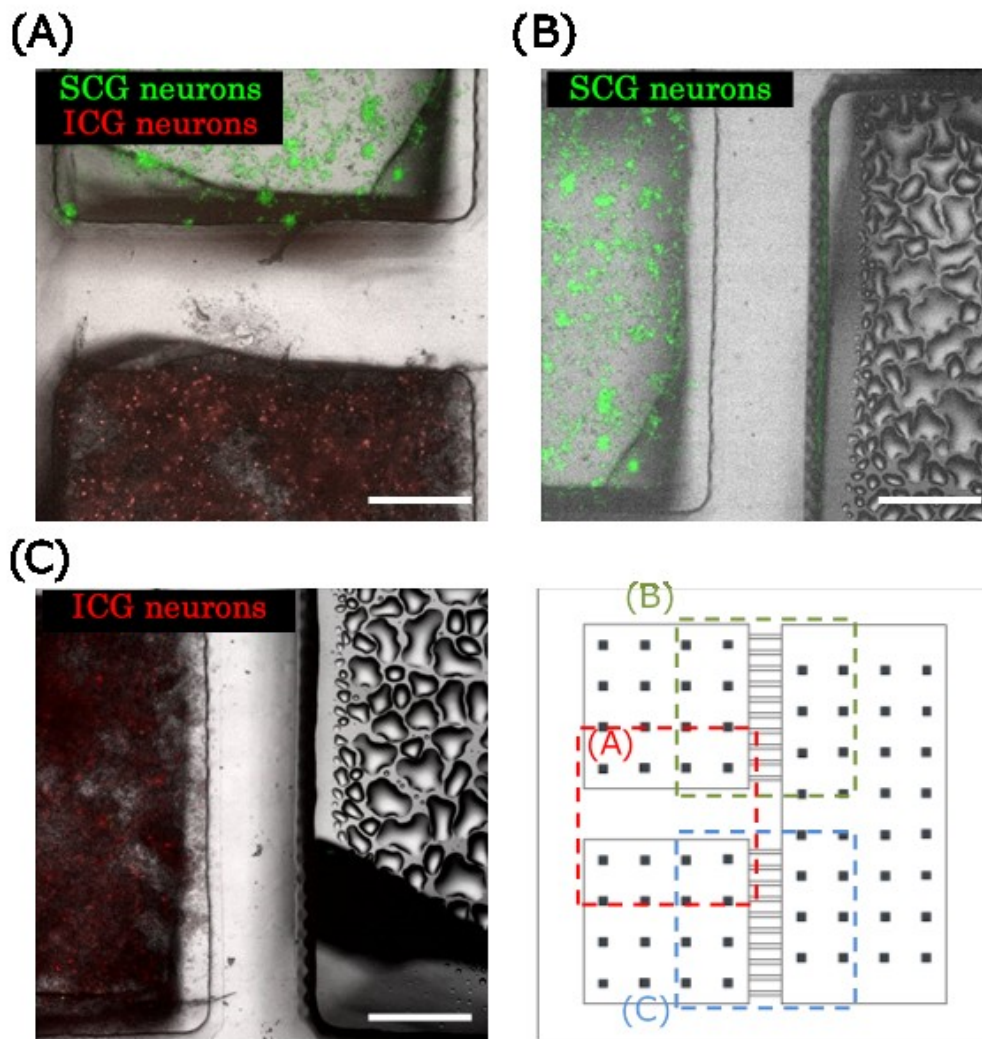


Fig. 3-8 培養区画間において独立に生着した自律神経細胞. SCG 神経細胞(緑色)及び ICG 神経細胞(赤色)が, 混在せずに生着したことが確認できた. A-C は, 右下の模式図において示した位置の蛍光画像を示す. Scale bar, 500 μm .

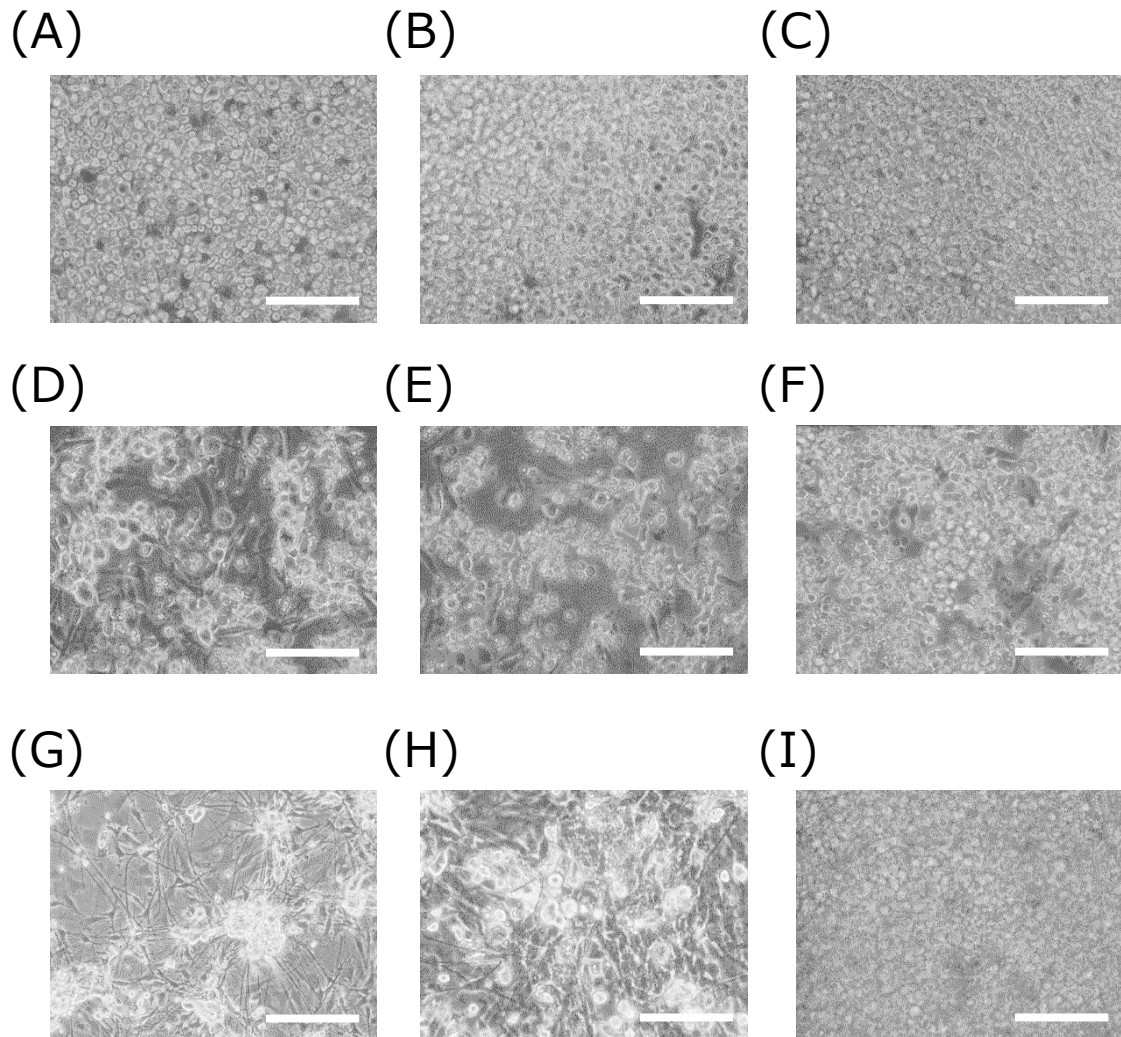


Fig. 3-9 SCG 神経細胞, ICG 神経細胞, 心房筋細胞の形態変化. SCG 神経細胞 (A, D 及び G), ICG 神経細胞 (B, E 及び H), 及び心房筋細胞 (C, F 及び I) の形態を示した. 画像は, 播種直後 (A-C), 1 DIV (D-F), 及び 3 DIV (G-I) に取得した. SCG 神経細胞が 3 DIV でネットワークを形成した様子が観察された. 一方, ICG 神経細胞では, 突起状の構造を有さない細胞の割合が多かった. Scale bar, 100 μm .

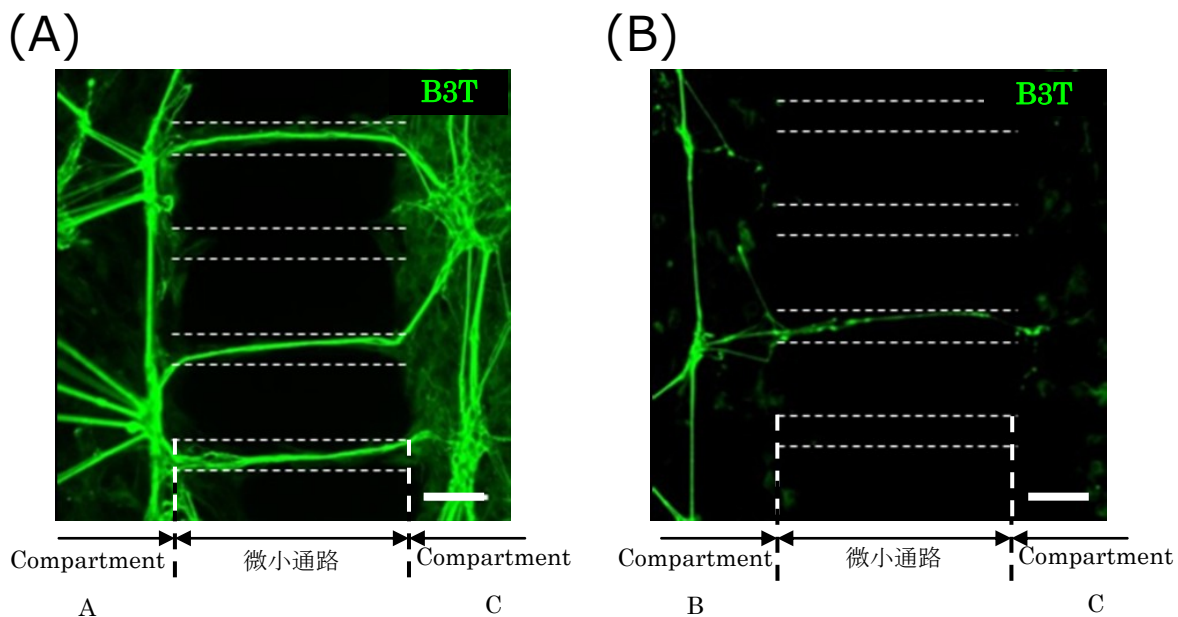


Fig. 3-10 微小通路内の SCG 神経細胞及び ICG 神経細胞の軸索. 20 DIV における SCG 神経細胞 (A) 及び ICG 神経細胞 (B) の様子を示す. 破線は微小通路を示す. Scale bar, 100 μm .

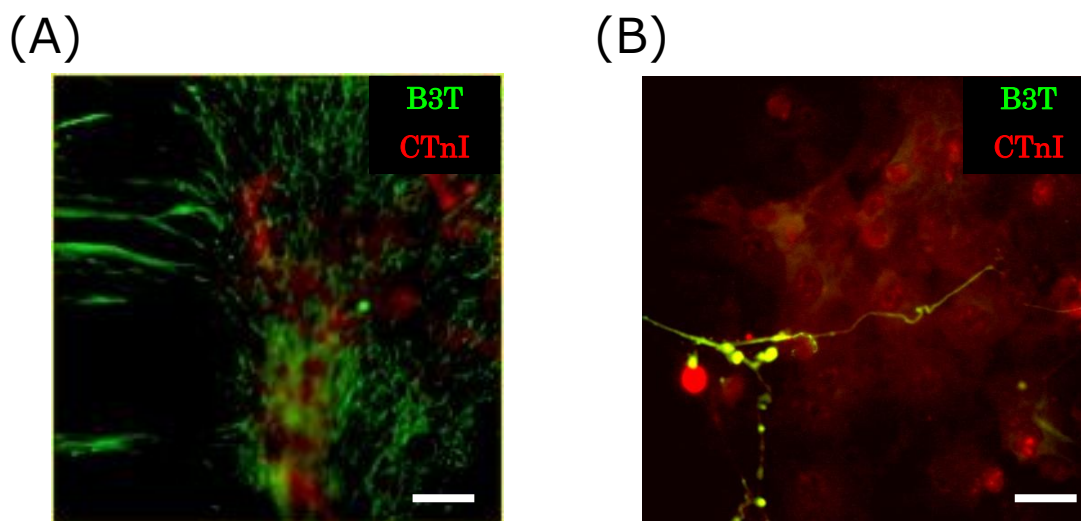


Fig. 3-11 微小通路を越えた軸索と心房筋細胞の様子. 20 DIV における SCG 神経細胞 (A) と ICG 神経細胞 (B) を示す. 神経突起 (緑色) が, 心筋 (赤色) 上に伸長した様子が確認された. Scale bar, 100 μm .

3-3-2 共培養システムの機能的評価

3-3-2-1 自発電気活動計測

SCG 神経細胞, ICG 神経細胞, 及び心房筋細胞の自発活動を計測した. それぞれの細胞群の代表的な自発活動の波形を Fig.3-12 に示す. SCG 神経細胞については, 19 試料中 3 試料において, 16 点中 3-4 点の微小電極から活動が観測された. 発火頻度は, 1 分間当たり 54.8 ± 35.7 回 ($n=3$ samples) であり, 発火パターンに一定の傾向は見られなかった. 一方, ICG 神経細胞については, 19 試料中 2 試料において, 16 点中 1-2 点の微小電極から活動が観測された. 発火頻度は, 1 分間当たり 52.4 ± 16.2 回 ($n=2$ samples) であり, 発火パターンに一定の傾向は見られなかった. 心房筋細胞群では, 19 試料中 14 試料で, 32 点中 10-20 点の微小電極から自発活動が観測された. 活動の頻度は, 1 分間当たり 19.3 ± 9.1 回 ($n=5$ samples) であった. さらに, 心房筋細胞の自発収縮に伴い, 細胞集団全体にわたって同期したタイミングで活動が観察された. さらに, 各自律神経細胞群及び心房筋細胞群における自発電気活動のスパイク幅に基づくヒストグラムを Fig.3-13 に示す. SCG 神経細胞群では, 0.1-0.7 ms の幅を持つスパイクが多く観測され, ICG 神経細胞群では, 0.1-3.0 ms の幅を持つスパイクが観測され, 心房筋細胞群では, 2.5-4.0 ms の幅を持つスパイクが観測された.

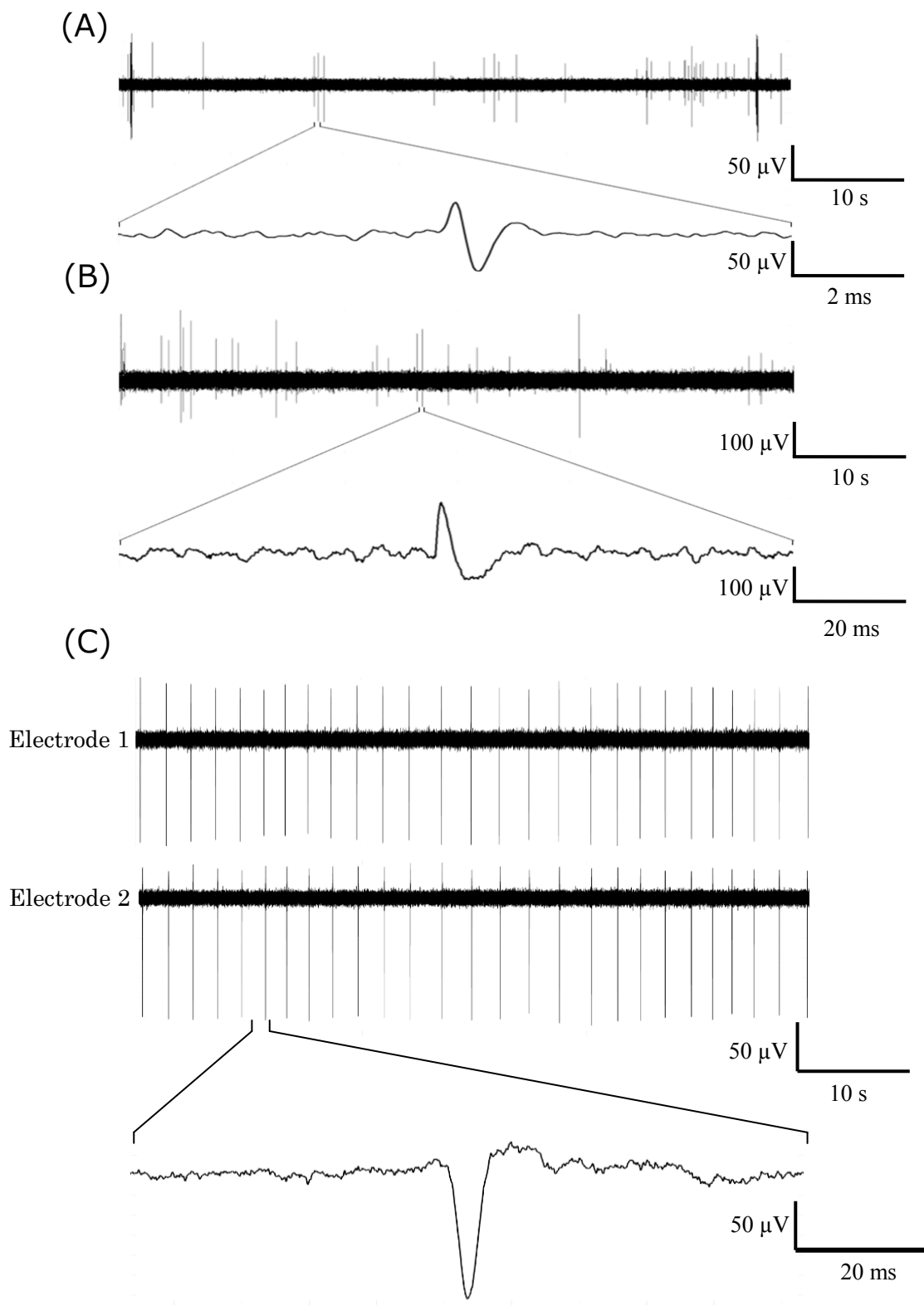


Fig. 3-12 SCG 神経細胞, ICG 神経細胞及び心房筋細胞培の自発活動の波形. 20 DIV において SCG 神経細胞 (A) 及び ICG 神経細胞 (B) では発火パターンに一定の傾向は見られなかった. 一方, 心房筋細胞 (C) では, 電極間で同期した活動が観測された.

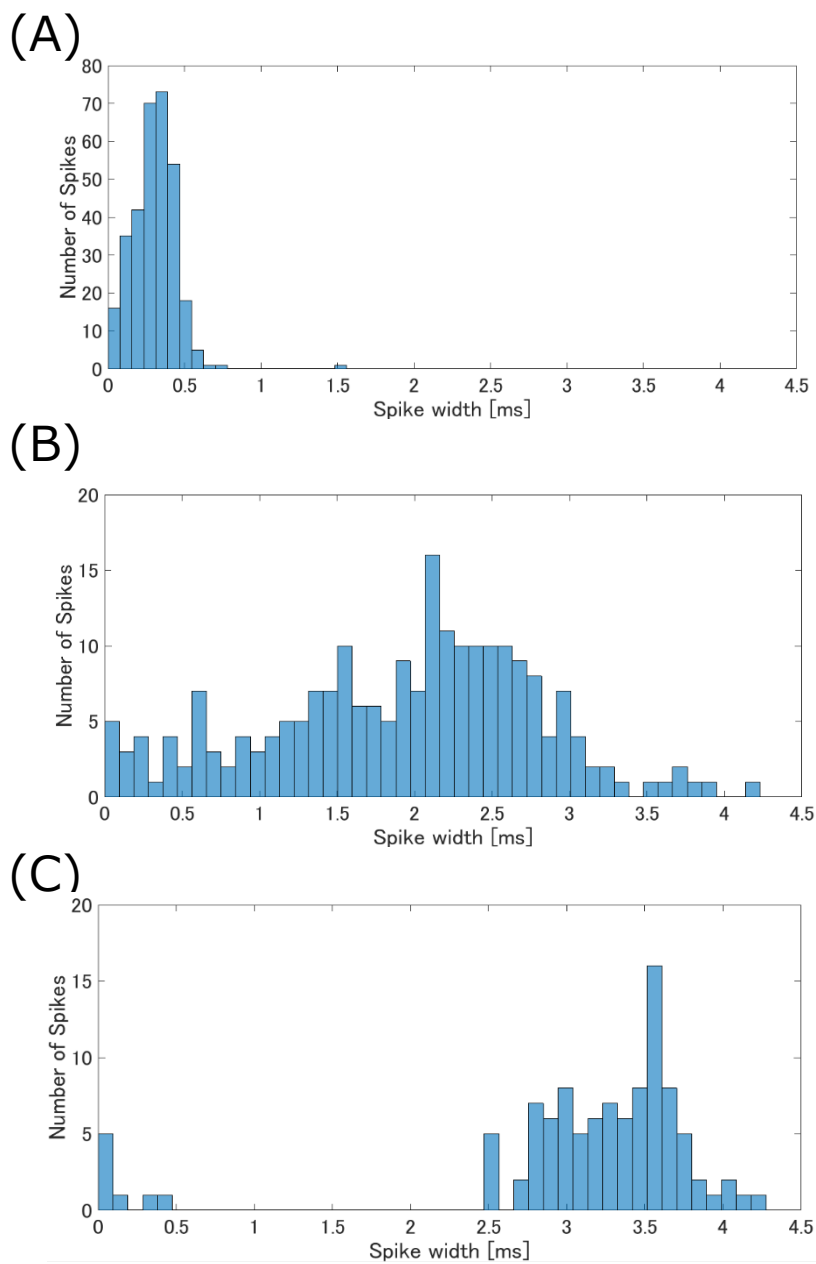


Fig. 3-13 自発活動のスパイク幅のヒストグラム. 20 DIV に計測したデータより作成した. (A) SCG 神経細胞. (B) ICG 神経細胞. (C) 心房筋細胞.

3-3-2-2 定常状態における心房筋細胞の活動評価

心房筋細胞の IBI の遷移とその C.V. を Fig. 3-14 に示す. また, 各試料における, IBI の平均値, 標準偏差及び C.V. を Table 3-1 に示す. 通常の共培養条件 (Co-culture 群) では, β AR と mAChR を遮断した条件 (Blockade 群), 及び心房筋細胞のみを培養した条件 (Myocyte 群) に比べて, IBI のバラツキが大きい傾向が観察された. 同一試料である Co-culture1 及び Blockade1 では, IBI の平均値が 6627 ms 及び 2390 ms であり, 副交感神経優位状態であった Co-culture1 に対し薬理遮断を行なうことで mAChR に対する ACh の作用が阻害され, IBI が短縮したと考えられる.

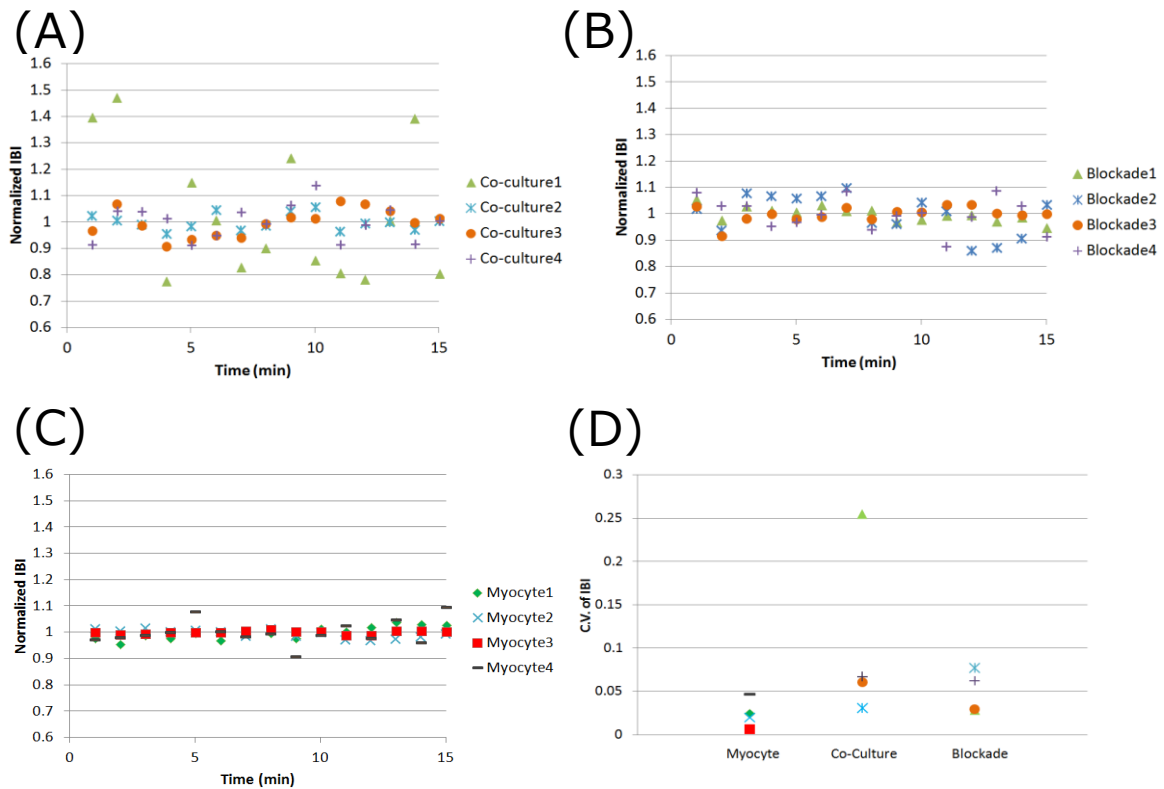


Fig. 3-14 定常状態における心房筋細胞の IBI の遷移と C.V.. SCG 神経細胞, ICG 神経細胞及び心房筋細胞を共培養した試料 (Co-culture 群) では, β AR と mAChR を遮断した条件 (Blockade 群), 及び心房筋細胞のみを培養した条件 (Myocyte 群) に比べて, IBI のバラツキが大きい傾向が観察された.

Table 3-1 各試料における IBI の平均値と標準偏差及び C.V. (N=15 minutes)

#	Co-culture				Blockade				Myocyte			
	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4
平均値 (ms)	6627	3580	3901	4060	2390	2546	1915	3949	2284	904	1177	2207
標準偏差 (ms)	1687	110.7	236.2	272	67.7	196.2	56.9	245.9	56	18	7.4	102.9
C. V.	0.254	0.031	0.061	0.067	0.028	0.077	0.03	0.062	0.025	0.02	0.006	0.047

3-3-2-3 自律神経細胞群に対する電気刺激

自律神経細胞による心房筋細胞に対する機能支配が形成されたことを確認した。最初に、刺激の強度及び頻度を決定するための予備実験について述べる。次に、自律神経細胞に対する電気刺激による心房筋細胞の拍動リズムの制御について述べる。

刺激強度の選定

様々な強度で刺激した際の、SCG 神経細胞及び ICG 神経細胞の誘発応答を、それぞれ Fig.3-15 及び Fig.3-16 に示す。刺激強度を 1 V に設定した場合、どちらの神経細胞群からも誘発応答は観測されなかった。2 V の場合、数個の試料において誘発応答が観測された。3 V に設定した場合、全ての試料において誘発応答が観測された。また、3 V で刺激した際の、心房筋細胞の活動の一例を Fig.3-17 に示す。いずれの神経細胞群を刺激した場合でも、心房筋細胞の収縮は誘起されなかった。以上から、以降の電気刺激実験では自律神経細胞群に対する電気刺激強度を 3 V とした。

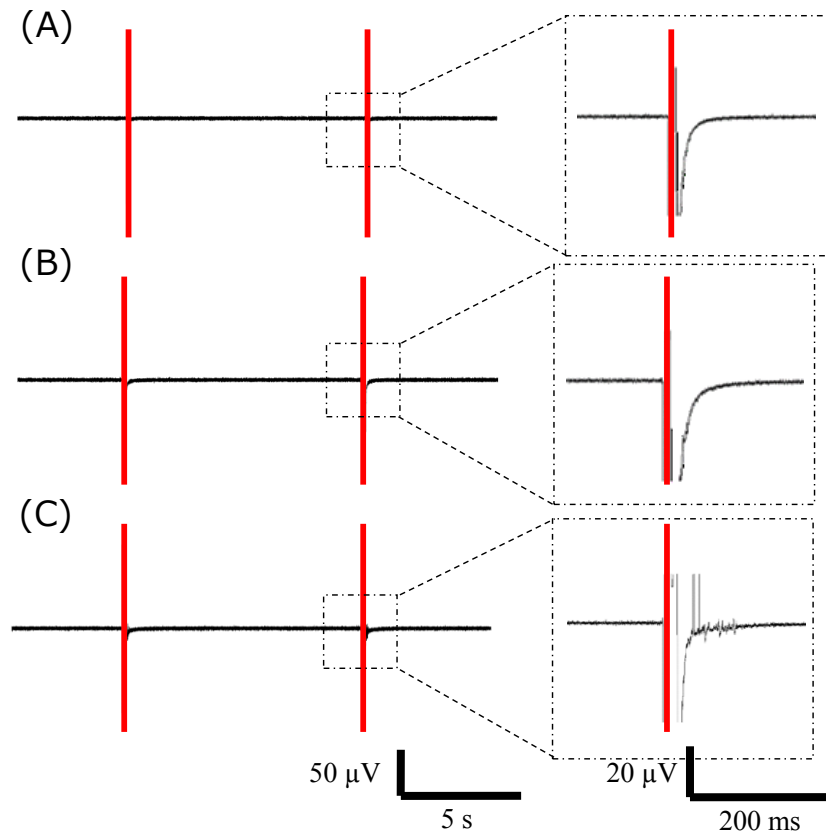


Fig.3-15 SCG 神経細胞の誘発応答. 刺激強度は, 1 V (A), 2 V (B), 3 V (C).

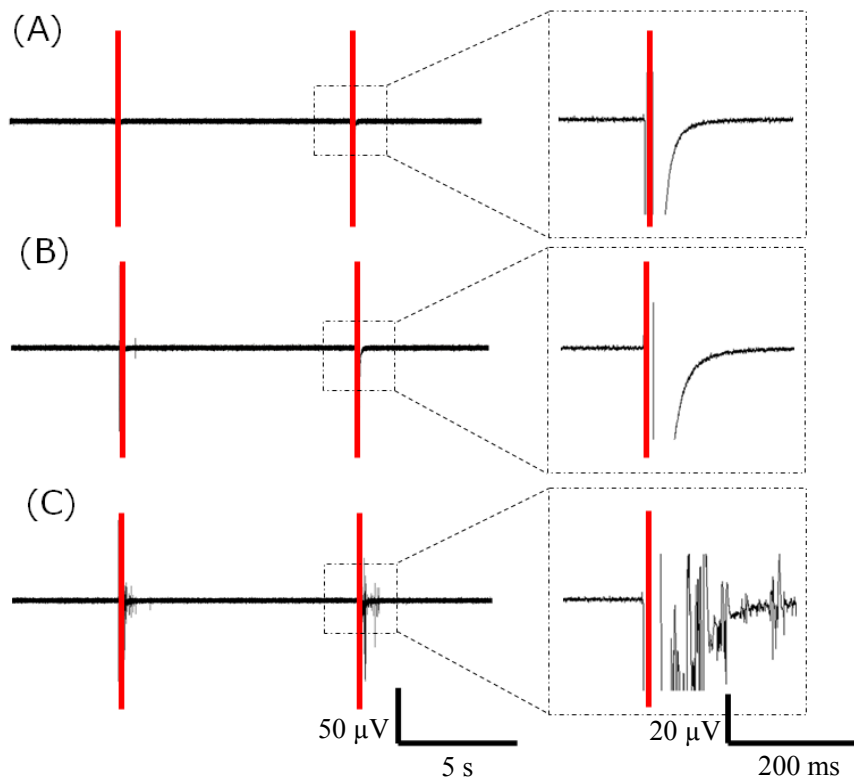


Fig.3-16 ICG 神経細胞の誘発応答. 刺激強度は, 1 V (A), 2 V (B), 及び 3 V (C).

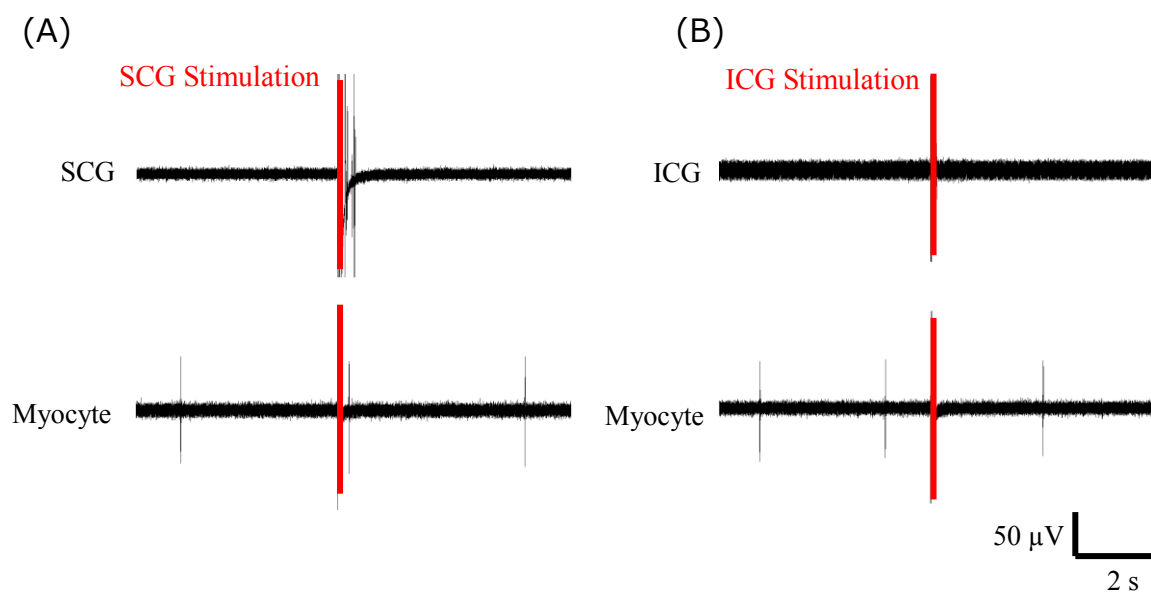
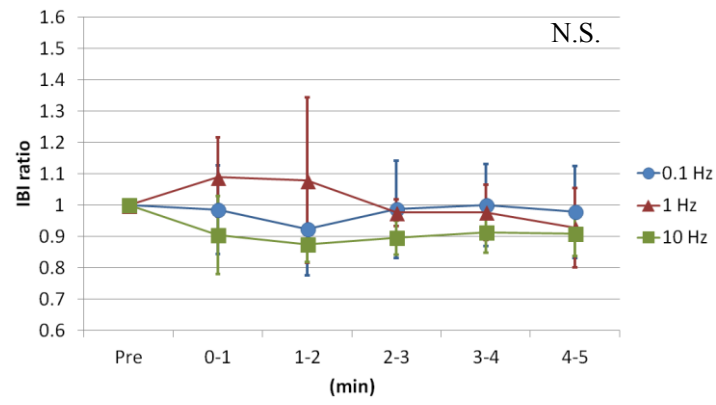


Fig.3-17 SCG (A) 及び ICG 神経細胞 (B) に刺激した際の、心房筋細胞の活動. 神経細胞は誘発応答を示したが、心房筋細胞は応答を示さなかった.

刺激頻度の選定

SCG 神経細胞及び ICG 神経細胞に対して、0.1 Hz, 1 Hz, 及び 10 Hz で電気刺激を印加した. 刺激後の IBI ratio の遷移を Fig.3-18 に示す. どちらの神経細胞に刺激を行なった場合でも、刺激頻度の条件間及び経過時間において有意な差は確認できなかった (二元配置分散分析及び Bonferroni 補正付き paired t-test). しかし、SCG 神経細胞および ICG 神経細胞の両方で、10 Hz で刺激した際に、実験に用いた 5 試料全てで IBI ratio が変化する傾向が見られたため、以降の実験では 10 Hz の頻度を用いた.

(A)



(B)

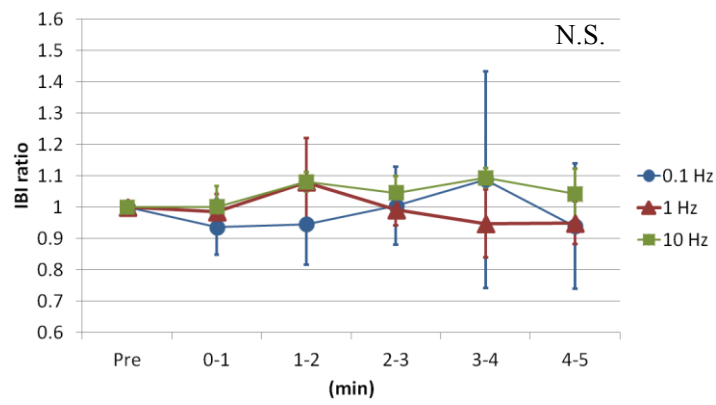


Fig.3-18 刺激頻度による IBI ratio への影響. SCG 神経細胞 (A) および ICG 神経細胞 (B) のどちらに刺激した場合でも, 刺激頻度による優位な違いは観察されなかった. N.S., $p > 0.05$; paired t-test with Bonferroni correction. A, $n = 5$; B, $n = 5$.

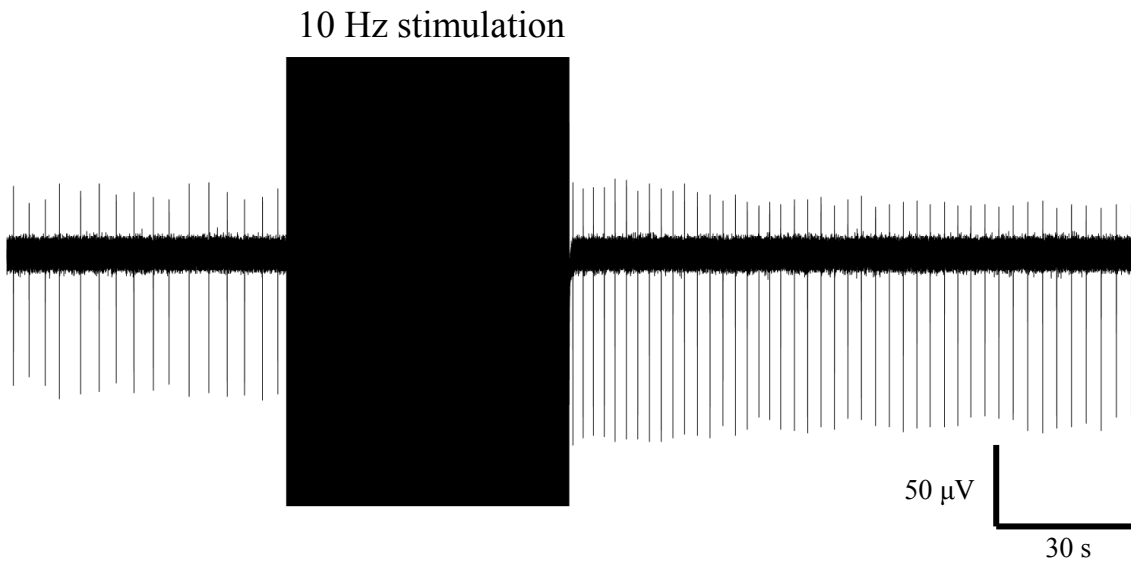
神経支配の確認

刺激後の IBI ratio の遷移を評価した。3-3-4-1 で述べた通り、刺激後 5 分間計測した試料と、10 分間計測した試料があるため、刺激 5 分後までで試料数が変化する。

Fig. 3-19 に、SCG 神経細胞もしくは ICG 神経細胞を刺激する前後での心房筋細胞の電気活動を示し、Fig. 3-20 に、SCG 神経細胞もしくは ICG 神経細胞を刺激した後の、IBI ratio の変化を示す。Fig. 3-20 では、各試料の IBI ratio の変化を線で示し、平均値及び標準偏差をプロットした。SCG 神経細胞を刺激した場合、IBI ratio が低下した。IBI ratio の遷移は、刺激 2 分後までが低く、刺激 5 分後までにかけて上昇傾向を示した。特に、刺激 0-1 分後、及び 1-2 分後の IBI ratio は、刺激前と比較して有意に低かった ($p < 0.05$, Wilcoxon signed rank test with Bonferroni correction)。一方、ICG 神経細胞を刺激した場合、IBI ratio が上昇した。遷移は、刺激 4 分後までにかけて上昇した後、刺激 7 分後までにかけて低下傾向を示した。刺激 1-2 分後と、刺激 3-4 分後の IBI ratio は、刺激前と比較して有意に高かった ($p < 0.05$, Wilcoxon signed rank test with Bonferroni correction)。

次に、 β AR 及び mAChR を遮断した条件 (Blockade) でも、同様の実験を行なった。Fig. 3-21 に Blockade 条件における SCG 神経細胞もしくは ICG 神経細胞を刺激する前後での心房筋細胞の電気活動を示し、Fig. 3-22 に、遮断していない条件 (Control) と Blockade 間での刺激後の IBI の平均値の比較を示す。SCG 神経細胞を刺激した場合、IBI ratio の平均値は control で 0.91 ± 0.08 、blockade で 0.99 ± 0.05 であり、有意な差が確認された ($p < 0.05$, Welch's t test)。一方、ICG 神経細胞を刺激した場合、Control で 1.15 ± 0.14 、Blockade で 0.95 ± 0.13 であり、両者に有意な差が確認された ($p < 0.01$, Welch's t test)。

(A)



(B)

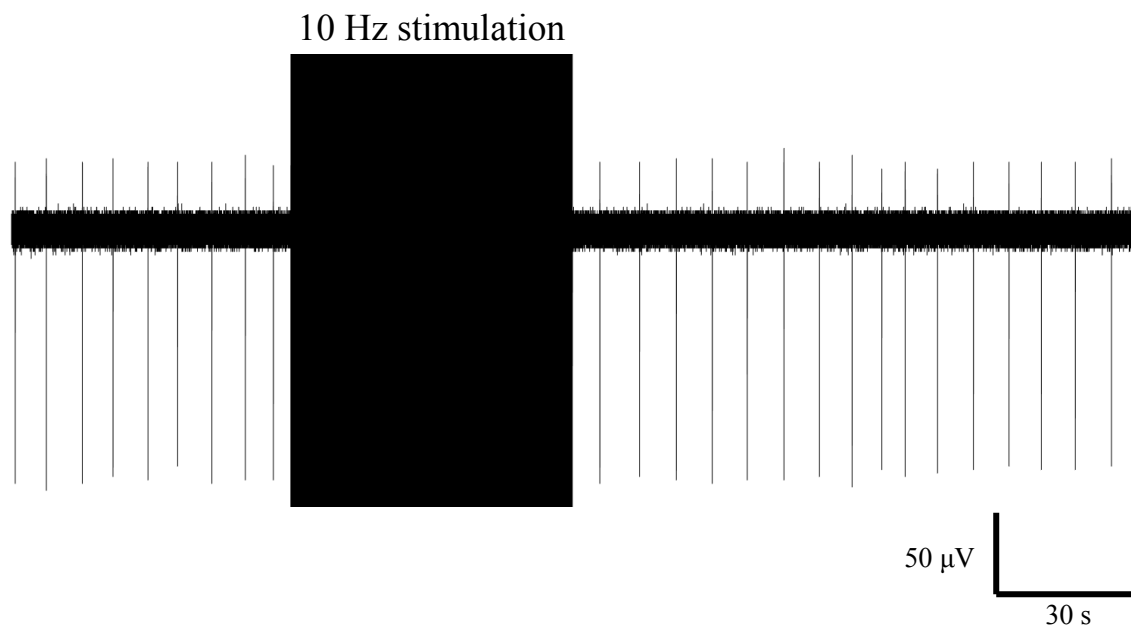


Fig. 3-19 刺激前後での心房筋細胞の電気活動. SCG 神経細胞(A)及び ICG 神経細胞(B)への刺激において, 刺激開始1分前から刺激終了2分後までの活動波形を計測したデータを示す.

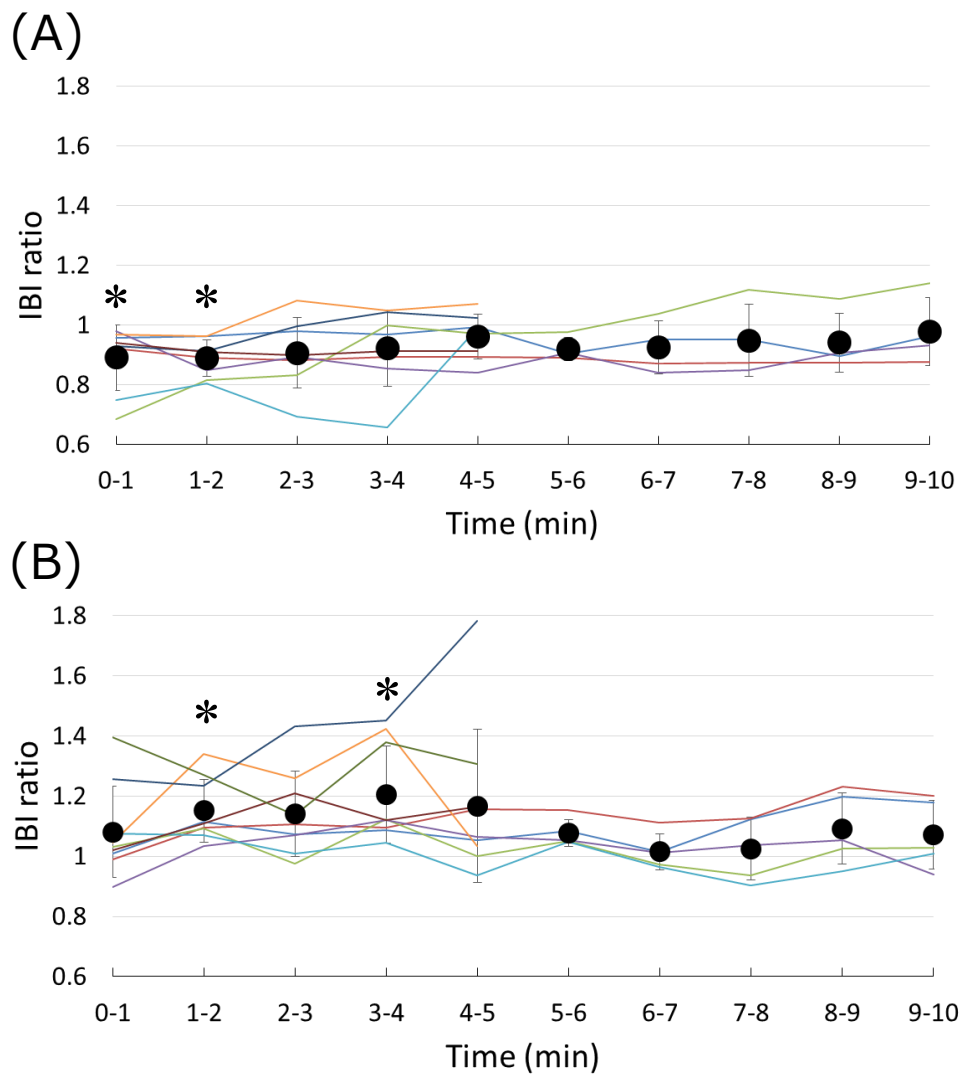


Fig. 3-20 刺激後のIBIの遷移. SCG神経細胞(A)及びICG神経細胞(B)に対する刺激後の, IBI ratio の変化を示す. それぞれの線は各試料を示し, 黒丸は各時点における平均値を示す. SCG神経細胞を刺激した後は, IBI ratioが低下した. 一方, ICG神経細胞に対する刺激後, IBI ratioが上昇した. *, $p < 0.05$ versus pre; Wilcoxon signed rank test with Bonferroni correction. A, $n = 8$ during 0-5 min, $n = 4$ during 5-10 min; B, $n = 9$ during 0-5 min, $n = 5$ during 5-10 min.

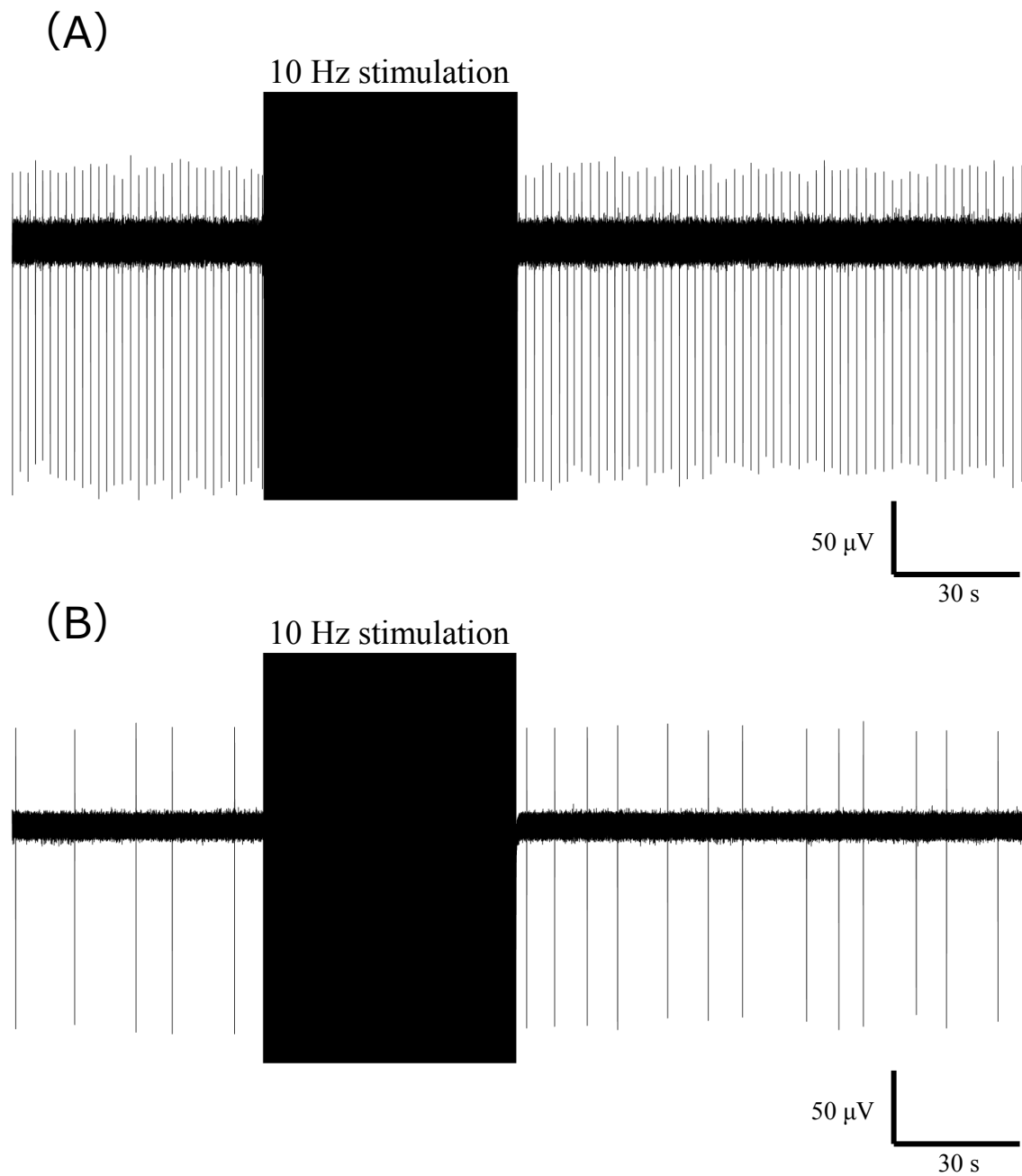


Fig. 3-21 薬理遮断した条件における刺激前後での心房筋細胞の電気活動. SCG 神経細胞(A) 及び ICG 神経細胞(B)への刺激において, 刺激開始1分前から刺激終了2分後までの活動波形を計測したデータを示す.

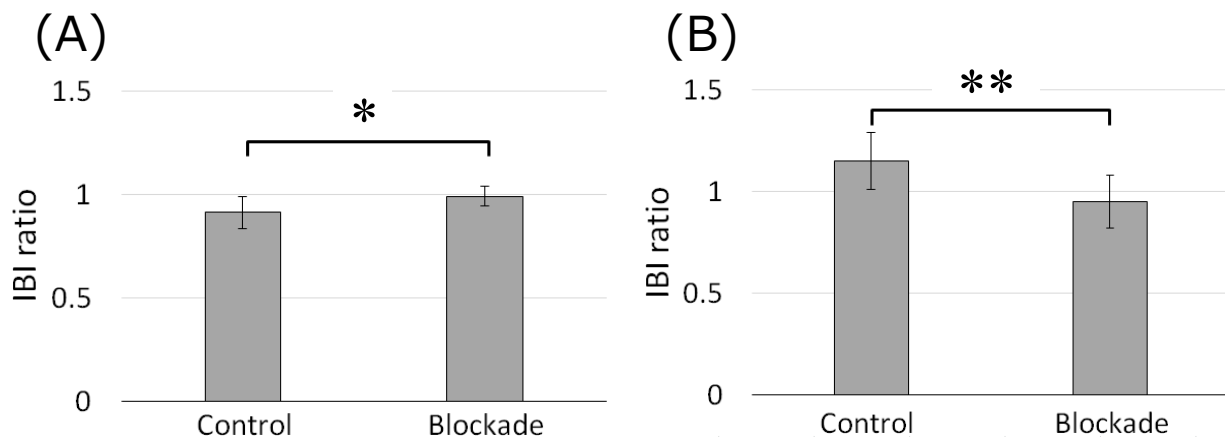


Fig. 3-22 薬理遮断によるシナプス形成の確認. SCG 神経細胞 (A) 及び ICG 神経細胞 (B) を刺激する際, β AR 及び mAChR を遮断した (Blockade 群). Blockade 群と Control 群では, 刺激後の IBI ratio に有意な差が見られた. 刺激後 5 分間の IBI を使用した. **, $p < 0.01$; *, $p < 0.05$; Welch's t test; (A) $n = 8$ for control, $n = 8$ for blockade; (B) $n = 9$ for control, $n = 10$ for blockade.

3-3-3 心房細動モデルとしての共培養システムの評価

SCG 神経細胞に対して電気刺激を 1 時間行ない, IBI ratio の時間遷移を評価した. 結果を Fig. 3-23 に示す. 刺激終了後に 2 試料全てにおいて IBI が短縮し, 60 分経過後も刺激前と比較して短い値となった. また, Sample A では, 刺激終了後 13-15 分において, IBI が一時的に短縮した様子が見られた. Sample B については, 刺激後 3 時間まで活動計測を継続したが, IBI ratio は刺激前と比較して短い値で推移した. 刺激終了 1 日後には, Sample B の IBI が刺激前の IBI に近い値まで回復した. 次に, 変動係数を指標として, 刺激前後の IBI のバラツキを評価した. 結果を Fig. 3-24 に示す. 刺激前と比較して, 刺激後の方が C.V. が大きい傾向が見られた.

次に, Sample A から計測された, 刺激前後における心房筋細胞の活動の波形を Fig. 3-25, Compartment C 内の電極から計測された心房筋細胞の IBI ratio のカラーマップを Fig. 3-26, 刺激後における心房筋細胞の活動のラスタープロットを Fig. 3-27 に示す. 刺激前の IBI はほぼ一定であった. 一方, 刺激終了後は IBI が短縮し, 刺激終了後 13-15 分において, 60 分間の計測中で 30 秒間程度の 30 秒程度の頻脈現象が多くの電極において同期したタイミングで観測された.

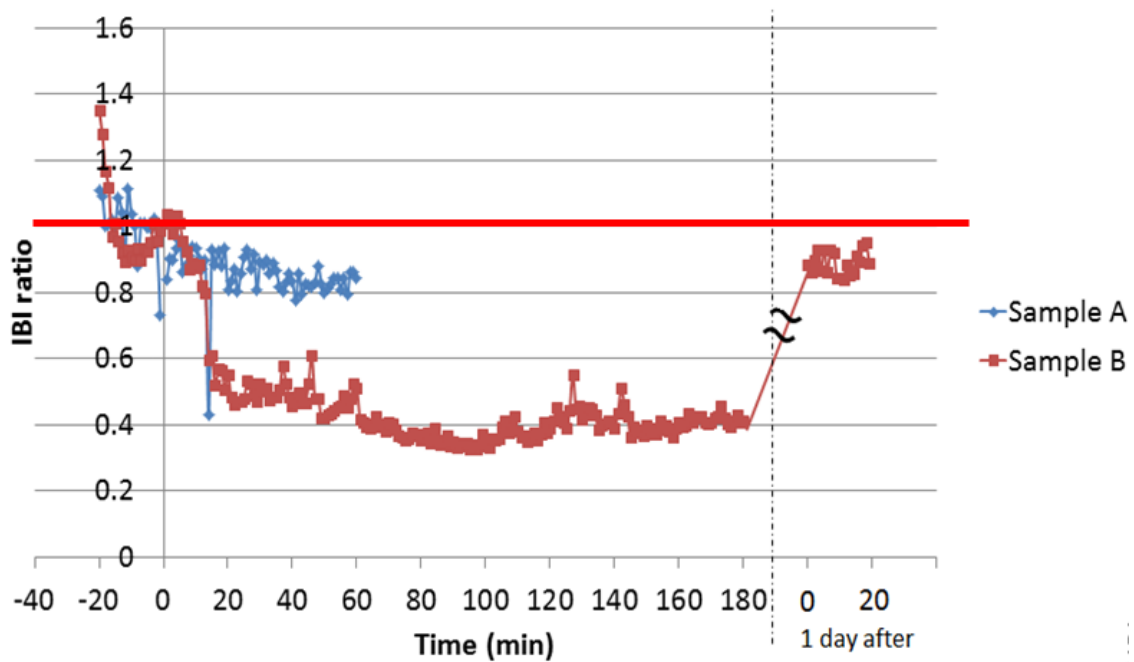


Fig. 3-23 SCG 神経細胞に対する慢性刺激前後の, IBI ratio の時間遷移. SCG 神経細胞を 1 時間刺激した後, 心房筋細胞の活動を計測した. IBI ratio は, 刺激前の値で正規化して表示した. Sample A では, 刺激終了 13-15 分後に一過性の IBI の短縮(頻脈現象)が観察された. 一方, Sample B では, 刺激後に IBI ratio が急激に短縮した.

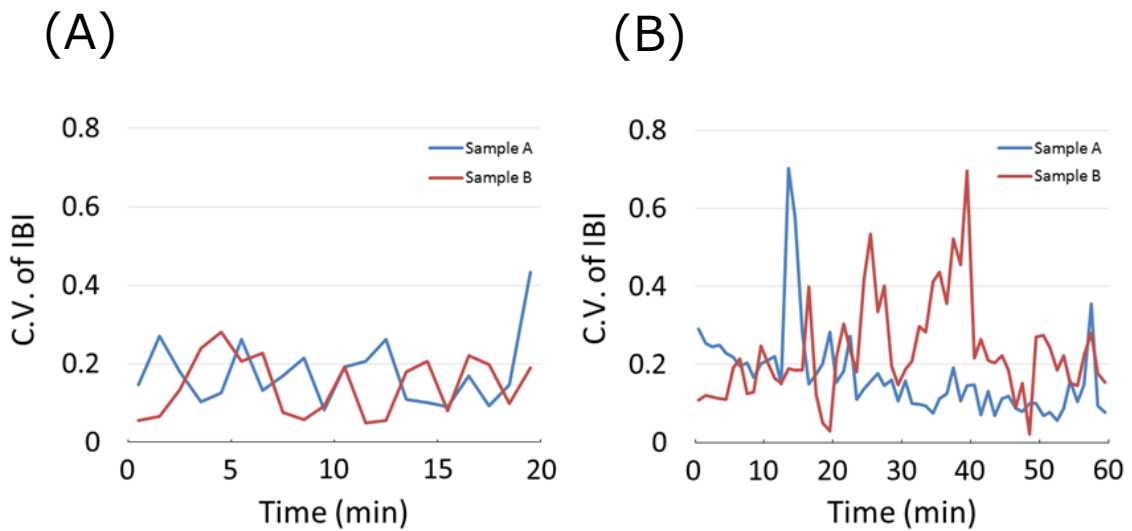


Fig. 3-24 刺激前後の IBI の C.V.. 電気刺激前 20 分間(A)と刺激終了から 60 分間(B)の IBI の C.V.を示す. 刺激前と比較して, 刺激後の方が C.V.が大きい傾向が見られた.

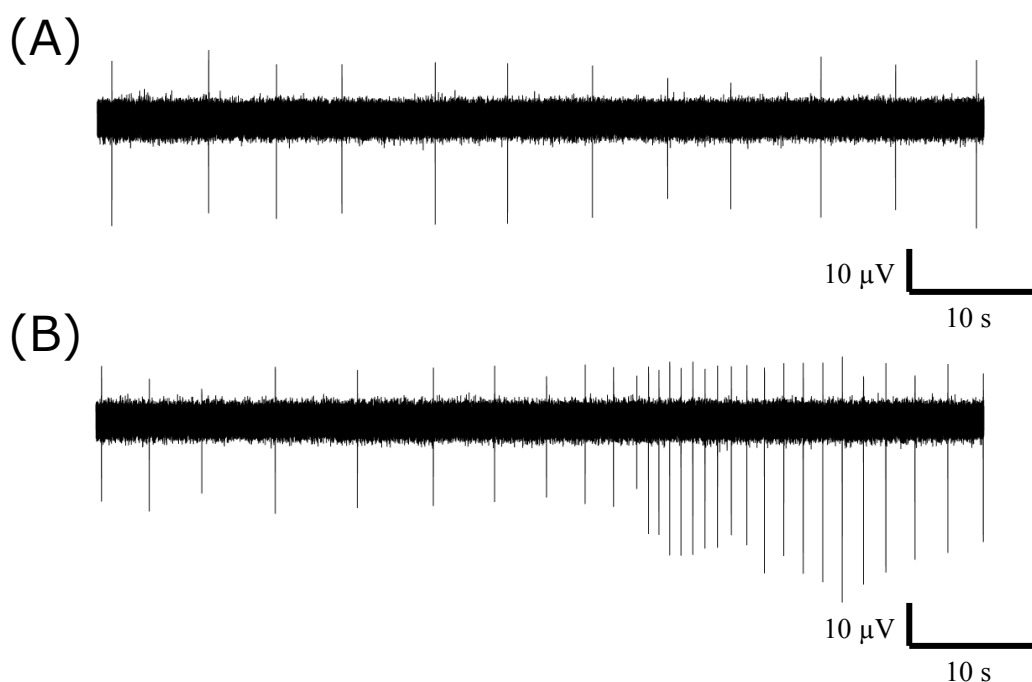


Fig. 3-25 Sample A から計測された刺激前及び刺激後 13-14 分後の活動の波形. 電気刺激前 (A)と比較して, 電気刺激後 (B)では, IBI が短縮した. また, 刺激後に 30 秒程度の頻脈現象が認められた.

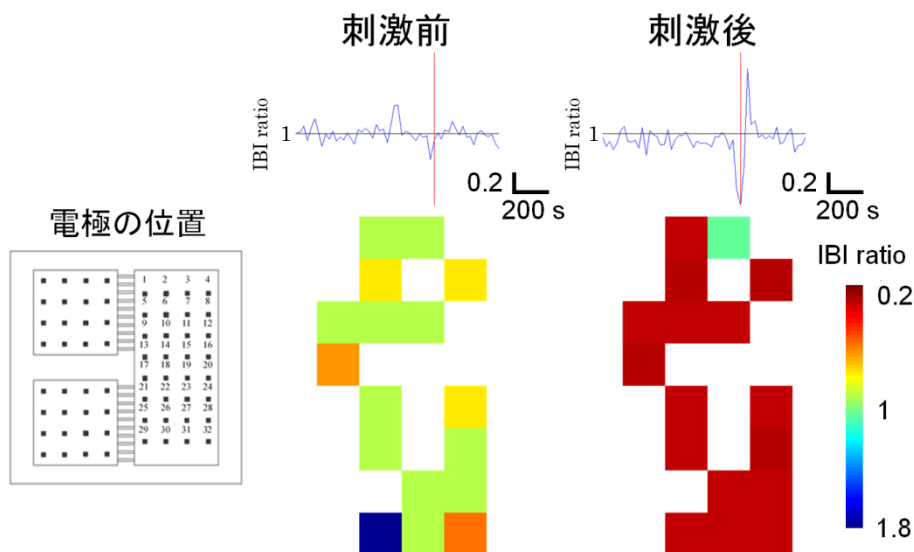


Fig. 3-26 Sample A の Compartment C 内の電極から計測された心房筋細胞の IBI ratio のカラーマップ. 上部の波形は, 刺激前及び刺激後の IBI の時間変化を示し, 横線は IBI が 1 である部位, 縦線はカラーマップに対応する時間を示す. カラーマップ内の白色で示された部位は, ノイズにより細胞の電気活動が検出できなかった電極を示す. ここでは, 刺激前では測定開始 13-14 分後, 刺激後では刺激終了 13-14 分後の結果を示している.

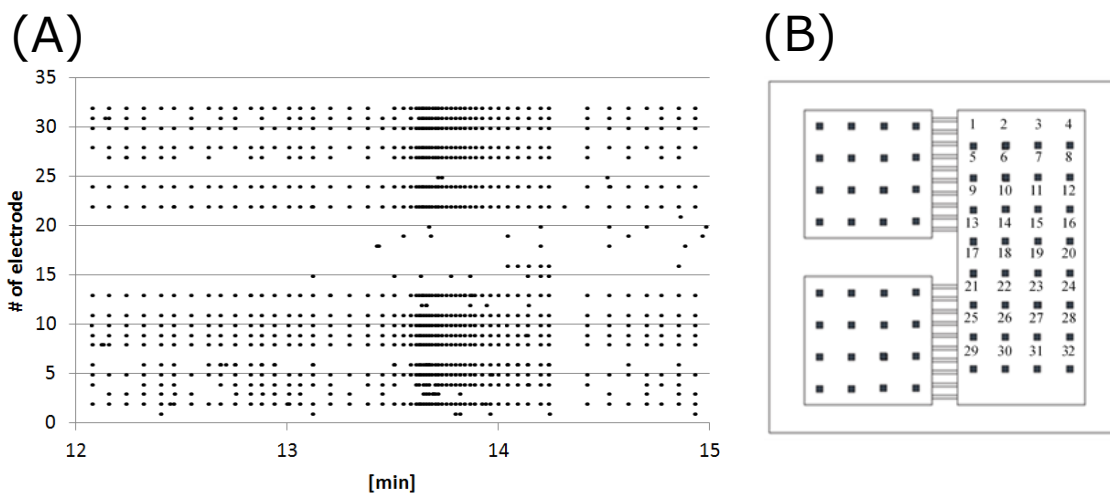


Fig. 3-27 Sample A の刺激後 12-15 分後の心房筋細胞の活動. ラスタープロット(A)と電極位置(B)を示す. 心房筋細胞の頻脈現象は, 多くの電極において同期したタイミングで観測された.

3-4 考察

3-4-1 共培養システムの機能評価

本章では、共培養システムについて 4 点の要求事項を設定した。本項では、開発した共培養システムが要求事項を満たしたかについて考察する。

(1) 交感・副交感神経細胞および心筋細胞をそれぞれ独立した状態で培養できること

本要求事項を満たすため、マイクロ加工技術を用いて共培養デバイスを構築した。蛍光染色法による観察の結果、播種 12 時間後において SCG 神経細胞、及び ICG 神経細胞が、それぞれの培養区画内に生着したことが確認できた。それ以降は蛍光染色による観察を行っていないが、以下の理由からそれぞれの細胞が培養区画内にとどまったと考えられる。先行研究では、各自律神経細胞の細胞体の直径は、SCG 神経細胞では 15-30 μm [Jobling and Gibbins 1999; Cortez et al. 2003], ICG 神経細胞では 20-35 μm [Hassel and Burnstock 1986; Fieber and Adams 1991]であることが報告されている。また、心房筋細胞に関しても幅 15-20 μm 、長さ 100 μm 程度であることが報告されている [Mackenzie et al. 2001]。以上から、いずれの細胞も高さ 5 μm の微小通路を通過することは考えにくい。したがって、共培養デバイス内で交感・副交感神経細胞と心筋細胞をそれぞれ独立した状態で培養できたことが示唆され、本要求事項を満足したと考えられる。

(2) 交感神経細胞及び副交感神経細胞が、心筋細胞に対して機能的支配を形成できること

機能的支配が形成されたことを確認するためには、交感・副交感神経細胞の軸索が心筋細胞の培養区画まで伸長したこと、及び活動を誘発した際に心筋細胞の拍動リズムが変わることを評価する必要がある。

軸索の伸長については、免疫組織化学染色法による観察の結果、SCG 神経細胞及び ICG 神経細胞の軸索が微小通路を通過し心房筋細胞上まで伸長したことが示された。SCG 神経細胞の軸索が微小通路を通過することについては、Takeuchi らが報告している [Takeuchi et al. 2011]。一方、ICG 神経細胞を本研究のような培養デバイス内で培養した研究は存在しない。第 2 章で示したように、本研究では採取及び単離手法の工夫により、先行研究 [Hoard et al. 2007] と比較して ICG 神経細胞の存在比率が向上した。存在比率向上により、ICG 神経細胞の軸索を微小通路内に伸長させることができたと考えられる。しかし、SCG 神経細胞と ICG 神経細胞では、心房筋細胞まで到達した軸索の数に差があった。軸索の数により、自律神経細胞と心房筋細胞の間に形成されるシナプス数が変化し、心筋細胞拍動リズムに与える効果に違いが見られる可能性がある。今後は、両神経細胞の軸索伸長の度合いを制御することが重要である。

拍動リズムの制御については、SCG 神経細胞を刺激した際は IBI ratio の低下が見られ、ICG 神経細胞を刺激した際は IBI ratio の上昇が見られた。また、拮抗薬によりシナプスを阻害した条件では、刺激前後で IBI に顕著な差は認められなかった。したがって、SCG 神経細胞及び ICG 神経細胞が心房筋細胞に対して機能的なシナプスを形成したことが示された。

以上から、要求事項である、「交感神経細胞及び副交感神経細胞が、心筋細胞に対して機能的支配を形成できること」が満たされたと考えられる。

(3) それぞれの細胞集団の活動を計測できること

共培養デバイスの底面に配置した微小電極より、それぞれの細胞集団において複数の電極から活動が計測できた。SCG 神経細胞については、スパイク及びバースト発火が確認でき、スパイク幅は多くの活動で 1 ms 以内であった。Luther らは、パッチクランプ法を用いてラット培養 SCG 神経細胞の活動を計測し、SCG 神経細胞の細胞集団内においてシナプス伝達が存在したことを示した [Luther 2013]。本研究で得られたバースト発火は、先行研究と同様に、SCG 神経細胞同士の神経伝達により発生したと考えられる。ICG 神経細胞についても、スパイク状の自発活動が確認できた。Seabrook らは、パッチクランプ法を用いてラット新生児から採取した ICG 神経細胞の活動を計測し、ほとんど活動が計測されなかったことを報告している [Seabrook et al. 1990]。本研究と先行研究では周囲の温度などの条件が異なるため、結果について一概に比較は出来ない。今後、同様の条件で実験したうえで比較を行ない、第 2 章で見られたような細胞集団としての同期活動を示す可能性も含めて検討していくことが必要である。心房筋細胞については、多くの電極で同期した活動が計測された。また、自発活動と収縮のタイミングが同じであることから、計測ができたことが示された。以上から、要求事項である「それぞれの細胞集団の活動を計測できること」が満たされたと考えられる。

(4) 交感もしくは副交感神経細胞のみに対して任意のパターンの電気刺激を印加できること

複数の強度で刺激した実験から、自律神経細胞を刺激した際に、刺激が心房筋細胞を直接興奮させないことを示した。また、刺激頻度を変更すると、IBI ratio が変化すること、及び実験に用いた中では最も高い頻度である 10 Hz で刺激した場合に全試料で同様の変化を示す様子が見られた。以上から、本デバイスを用いることで、どちらかの神経細胞集団に対して任意のパターンで刺激できることが示された。したがって、要求事項である「交感神経細胞のみ、もしくは副交感神経細胞のみに対して任意のパターンの電気刺激を印加できること」が満たされたと考えられる。

3-4-2 自律神経細胞の自発活動による心房筋細胞拍動リズムの変動

自律神経活動の亢進と拍動リズムの関係の理解を目指し、自律神経支配を有する心房筋細胞の拍動リズムを評価した。結果、 β AR 及び mAChR を阻害した条件や心房筋細胞のみを培養した条件と比較して、共培養した群では IBI のバラツキが大きい傾向が見られた。以上は、心房筋細胞の拍動リズムが、共培養した SCG 神経細胞及び ICG 神経細胞の自発活動の影響を受けることを示唆している。先行研究では、*in vivo* の実験ではあるが、交感・副交感神経細胞の活動を同時賦活した際に拍動間隔が短縮することが示されており [Tan et al. 2008]、両自律神経細胞の活動リズムと心拍リズムの関係は不整脈の研究において意義深い研究分野である。今回の実験では、共培養デバイスから 2 種類以上の細胞種の活動を同時計測できなかったため、自律神経細胞の活動リズムと拍動リズムの関係は評価できなかった。今後、さらに計測を増やして議論する必要がある。また、今回は β AR 及び mAChR を両方同時に阻害したが、それぞれを阻害した際の拍動リズムを評価することで、交感及び副交感神経細胞の活動リズムと拍動リズムの関係が評価できると考えられる。

3-4-3 心房細動モデルとしての可能性

生体のストレス応答は、視床下部-下垂体-副腎軸 (HPA 軸) と交感神経-副腎軸 (SAM 軸) の活性化により誘発される [Chen and Miller 1997]。本研究では、SAM 軸の活性化による心臓への影響に焦点を当て、交感神経の亢進状態を共培養システム内で再現するために、交感神経細胞である SCG 神経細胞の慢性刺激実験を行なった。SCG 神経細胞を 1 時間刺激した場合、刺激 3 時間後においても IBI は回復せず、1 日後に 90% 程度の値まで回復したことが示された。また、1 つの試料では、IBI が急激に短縮する頻脈現象が見られた。1 分間刺激した際の影響は数分で回復することから、 β AR に結合した Gs タンパク質を介した反応であると考えられる。一方、1 時間刺激した際の影響はより長い時間持続したことから、短時間の刺激による影響とは別の機序による変化の可能性もある。想定される機序としては、NPY の寄与及び遺伝子発現の変化が挙げられる。第 2 章で述べた通り、交感神経に対する高頻度・長時間の刺激で NPY が放出されることが報告されている [Warner et al. 1991]。NPY は Y_1 受容体を介して細胞内 Ca^{2+} 濃度を変化させるため [Heredia et al. 2005]、NPY の作用により拍動のリズムが変化すると考えられる。また、より持続時間が長い変化として、関連する受容体の発現量の変化が挙げられる。先行研究では、ラットの培養心房筋細胞に対して 24 時間 NA を作用させた場合、 β 1AR の発現量が減少し、 β 3AR の発現量が増加したことが示されている [Germack and Dickenson 2006]。本研究で刺激を印加し続けた時間は、先行研究で NA を作用させた時間と比較して短いものの、長期的な NA の暴露による影響が出る可能性があると考えられる。今後、上記の機構の関与を検証するため、薬理実験や遺伝子発現量の評価を行なうことが重要であると考えられる。また、 β 1AR の発現量の変化は心疾患の進行に関連が強いと考えられており [Triposkiadis et al. 2009]、心疾患の発症機序の理解という側面からも意義深いと考えられる。

SCG 神経細胞を1時間刺激した条件で3時間以上の IBI の短縮と一過性の頻脈現象が見られた。SCG 神経細胞の亢進状態がさらに長期間継続することで、不可逆な変化が誘導されることが想定されるため、SCG 神経細胞に対する数時間または数日間の長期的な電気刺激を行なうことで、不可逆な変化を誘導する条件を導出できると考えられる。交感神経慢性刺激により誘導された不可逆な変化状態において、心筋細胞の形態的变化や遺伝子発現を評価することで、自律神経系の活動異常における心房細動の発症メカニズムの解明に繋がると期待される。さらに、副交感神経刺激を行ない交感／副交感のバランスをとることで、心房細動に対する治療の効果を評価することができると期待される。

3-5 結論

本章では、交感神経細胞、副交感神経細胞、心筋細胞の3要素からなる共培養システムの構築を行なった。

マイクロ加工技術の利用により MEA 基板上に3つの細胞培養区画を集積化したデバイスを設計・製作し、交感神経細胞、副交感神経細胞、心筋細胞の3要素からなる共培養システムを構築した。心筋細胞の拍動時系列につき評価した結果、自律神経細胞群の自発活動に基づく心筋拍動リズムの変動、交感神経細胞群に対する電気刺激に対応した心筋細胞拍動間隔の短縮、副交感神経細胞群に対する電気刺激に対応した心筋細胞拍動間隔の延長が観測され、アンタゴニスト投与によりこれら全ての変化がブロックされたことから、交感・副交感神経支配を受ける心筋細胞群という *in vitro* 系が構築されたことが確認できた。

この系で交感神経細胞群に対して慢性電気刺激を印加、人為的に誘起した活動亢進状態に対する心筋拍動リズムの経時変化を観測した。短時間の刺激と慢性刺激とで刺激終了後の心拍リズム回復傾向が異なり、また慢性刺激後には心筋細胞の拍動間隔の急激な短縮(心房細動に似た状態)が見られたことから、自律神経系の変調に起因する心房細動発生メカニズムの解明に向けて有効なモデルシステムであることが示された。

第 4 章

自律神経細胞に対する マイクロ磁気刺激システムの構築

本章では、マイクロ磁気刺激システムの設計及び刺激条件の最適化に向けた検討結果を示す。自律神経系に対する磁気刺激を想定して、高い空間分解能を実現する条件を求める立場から、自律神経線維束を模擬するために一方向に誘導させた自律神経軸索に対して微小コイルを配置して、局所的な刺激を行なう系においてシミュレーション及び実験の両面から検討した結果を示した。

4-1 磁気刺激法

4-1-1 磁気刺激法の誕生とその応用

近年、生体外部から時間的に変動する磁界により生体内に誘導電流を発生させ、誘導電流による生体組織や神経系に対する刺激を行なう磁気刺激法が開発され、応用が広がりつつある。1985年に Barker らがヒトの脳皮質に対して刺激を行なう経頭蓋磁気刺激 (Transcranial Magnetic Stimulation; TMS) に成功したことが磁気刺激に関する初めての報告である [Barker et al. 1985]。その後、磁気刺激に関する研究が進められ、運動皮質や前頭前皮質に対する磁気刺激の安全性評価 [Benninger et al. 2011] や、反復経頭蓋磁気刺激 (Repetitive Transcranial Magnetic Stimulation; rTMS) によるパーキンソン病 [Randhawa et al. 2013] やうつ病 [George et al. 2010; McGirr et al. 2015] の症状の抑制などが報告されている。

しかし、誘導電流が広範囲に分布する性質から刺激の空間分解能が低いことが問題点として挙げられる。誘導電流分布はコイルの形状やその配置に依存するため、これらを最適化することによる刺激の空間分解能向上が課題となる。

4-1-2 磁気刺激の空間分解能向上に向けた研究の現状

1988年に、Ueno らが8の字形コイルを開発したことが、磁気刺激の空間分解能向上を目指した初めての研究である [Ueno et al. 1988]。8の字形コイルは、円形のコイルを2つ組み合わせた構造をしており、8の字の交点に向かって電流を流すことで、交点直下で高密度の誘導電流を発生させる。その後、同じ研究グループにより8の字形コイルにより5 mmの空間分解能で脳皮質の特定部位を選択的に刺激することができることが報告された [Ueno et al. 1990]。それ以来、8の字形コイルは高い刺激の空間分解能を実現するコイルとして、多くの磁気刺激の研究や治療に使用されるようになった。

近年では、コイルの配置を工夫することでも刺激の空間分解能向上を目指す研究が行なわれている。コンピュータシミュレーションを使用した先行研究が多く、神経線維の走方向に対するコイルの配置を変化させることで神経線維の興奮閾値が変化するという報告 [Hiwaki and Kuwano 2002]、脳溝に対するコイルの配置による刺激領域推定 [Thielscher et al. 2011; Jassen et al. 2015]、空間分解能の高い刺激や深部刺激を実現するコイル設計 [Deng et al. 2013] などが行なわれている。コンピュータシミュレーションだけではなく、実験動物の組織片などを使用した研究も行なわれている。2012年に、Bonmassar らは、通常電子部品に使用されるサブミリメートルのチップコイルを用いた微小コイルを開発し、ウサギの網膜組織に対して局所的な磁気刺激を行なうことに成功した [Bonmassar et al. 2012]。それ以降、ゴールデンハムスターの背側蝸牛神経核 [Park et al. 2013] やマウスの脳スライス内の視床下核 [Lee and Fried 2015] に対して微小コイルを使用した刺激実験を行なっている。

4-1-3 自律神経系に対する磁気刺激の可能性

磁気刺激の適応対象は主に脳であり、自律神経系や末梢神経系に対する磁気刺激の研究報告例はない。自律神経系に対する磁気刺激が実現すれば、自律神経系の活動異常による心房細動の非侵襲的な治療技術の確立に繋がるのが期待できる。しかし、現在用いられている磁気刺激システムの空間分解能は低く、自律神経系、特に交感神経や副交感神経に対する選択的、局所的な刺激は困難である。

4-2 実験方法

本章では、自律神経系に対する磁気刺激の可能性を検討するとともに、自律神経系に対する磁気刺激の空間分解能の定量化及び評価を行なうための *in vitro* モデルであるマイクロ磁気刺激システムの構築と評価を行なう。

本節では、最初にシステムの設計及び作製手順を示し、次に、実験方法を示す。

4-2-1 マイクロ磁気刺激システム

自律神経に対する磁気刺激の効果を検証するためのマイクロ磁気刺激システムを作製した。システムが備えるべき設計要求事項は以下の通りとした。

- (1) 自律神経軸索を一方向に誘導した環境を実現することができること。
- (2) 自律神経軸索に対する局所的な磁気刺激を実現することができること。
- (3) 自律神経軸索に対する磁気刺激印加と同時に神経軸索の活動を計測することができること。
- (4) 自律神経軸索に対する磁気刺激の空間分解能の定量化を行なうことができること。

(1)は、システム内に自律神経線維束を模擬することを目的とする。(1)を満足するためには、神経軸索の伸長方向を制御できる微小通路を有した培養デバイスの使用が有用である。(2)は、微小コイルを作製し、システム内に伸長した自律神経軸索付近に配置することで局所的な磁気刺激を試みる。(3)は、神経軸索に対して実効的な刺激が印加されているか評価するために、MEA 基板を組み込むことで、磁気刺激中あるいは刺激前後における神経電気活動計測を行なうことができる環境とする。さらには、イメージングによる細胞内 Ca^{2+} 濃度変動の評価も行なうことができる環境とする。(4)は、コイルー神経軸索間の距離とその軸索の電気活動を指標とした刺激の空間分解能の評価を行なうことができる環境とする。

システムは、マイクロ加工技術により作製した培養チャンバとMEA基板及び微小コイルから構成される。培養チャンバは2つの自律神経細胞培養区画(縦 3 mm×横 3 mm×高さ 1 mm)と、各培養区画間の8本の微小通路(幅 50 μm , 長さ 2 mm, 高さ 5 μm)から構成される。微小通路は、

神経軸索を一方向に伸長させることで、システム内にて神経線維束を模擬する役割を持つ。

本システム内で末梢神経刺激閾値とされる 10 A/m^2 [国際非電離放射線防護委員会 2010] を超える誘導電流密度を発生させるために、微小コイル(Fig. 4-1)の形状、配置及びコイル電流値を決定した。コイルの形状は 8 の字形として、神経軸索の直上に配置した。コイルに 10 Hz の頻度で単極性方形波の電流を 1 分間印加した場合のコイルの温度上昇を 1°C 以内とする条件を満足することを考慮し、コイルは直径 $900 \mu\text{m}$ 、10 回巻きとして、 0.69 A の電流を流すと、コイルの交点から 1 mm の地点で刺激閾値を超える 12.3 A/m^2 の誘導電流を発生することがコンピュータシミュレーションにより示された。そのため、システム内のコイル径、巻き数、配置と電流値は以上のパラメータとした(Fig. 4-2)。

コイルは、耐熱温度が 130°C である $150 \mu\text{m}$ 径ポリウレタン皮膜銅線(サンコー電商株式会社)を $600 \mu\text{m}$ 径エナメル線(サンコー電商株式会社)に巻きつけることで構築した。構築したコイルをシステム内に安定して配置させるために、コイルをチャンバ上に固定した。固定法を Fig. 4-3 に示す。最初に、コイルをシリコンウエハ上に固定し、PDMS 及び硬化剤を重量比 10:1 の割合で混合させた混合物を流し込み、 80°C のホットプレート上で 1 時間静置させることで、PDMS を硬化させた。その後、シリコンウエハからコイルが埋め込まれた PDMS を剥離し、培養チャンバ内の培養区画に相当する PDMS を、手術用メスを使用して切り出した。切り出した後の PDMS に付着したホコリやカビなどを除去するために、70%エタノール及び超純水により洗浄を行なった後、30-40 分間紫外線を照射した。その後、3-2-1-3 項に示した手順にて作製を行なった培養チャンバ上にコイルの中心が微小通路の直上に配置されるように載せることで、コイルが固定された培養チャンバを構築した(Fig. 4-4)。さらに、誘導電流の向きと神経軸索の走方向間の関係性にも着目するために、コイルの向きをコイル中心直下における誘導電流の向きが神経軸索の走方向に対し垂直方向(0 deg)及び平行方向(90 deg)に印加される配置の 2 パターンとした。ただし、コイルの配置に関して、コイル固定を行なう前にコイルの向きを決定し、それぞれ 0 deg のデバイスと 90 deg のデバイスを構築した。

MEA 基板は、基板上に増幅器との接続のための回路末端部と培養部分内の底面における 64 点の微小電極を構成した(Fig. 4-5)。MEA 基板上的微小電極のパターンは、全 64 点の電極が 8×8 の正方形に配置したパターンとして、微小電極は $50 \mu\text{m} \times 50 \mu\text{m}$ の正方形とした。また、パターン内の微小電極の中心間隔は $250 \mu\text{m}$ に設定した。微小コイルを埋め込んだ培養チャンバを MEA 基板上に載せる際、微小通路内に MEA 上の微小電極が配置されるように顕微鏡下で行なった。構築したマイクロ磁気刺激デバイスの概要図を Fig. 4-6 に示す。



Fig. 4-1 微小コイル. Scale bar, 5 mm.

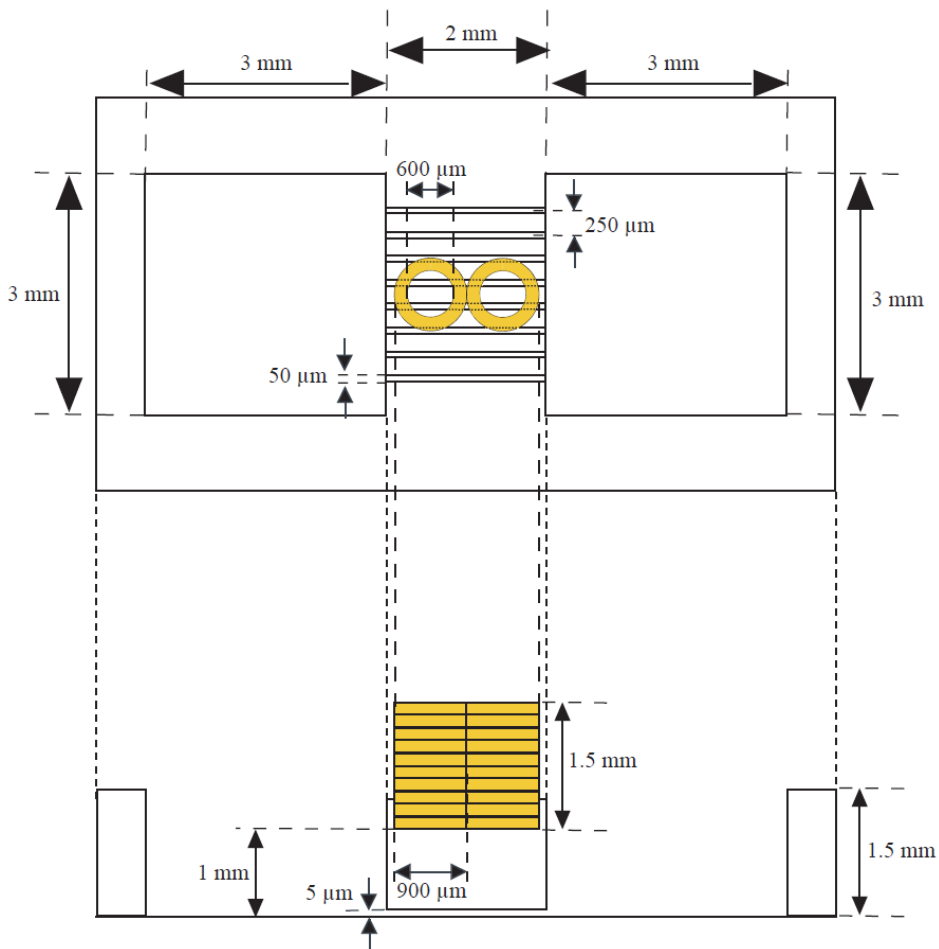


Fig. 4-2 微小コイルを埋め込んだ培養チャンバのデザイン. 培養チャンバは、自律神経細胞を培養するための2つの培養区画と神経軸索を一方方向に神経軸索を一方方向に誘導した環境を構築するための微小通路から構成される. 微小コイルは、神経軸索に対して局所的に刺激を行なうために8の字形の形状として、培養チャンバ内の微小通路の直上に配置した.

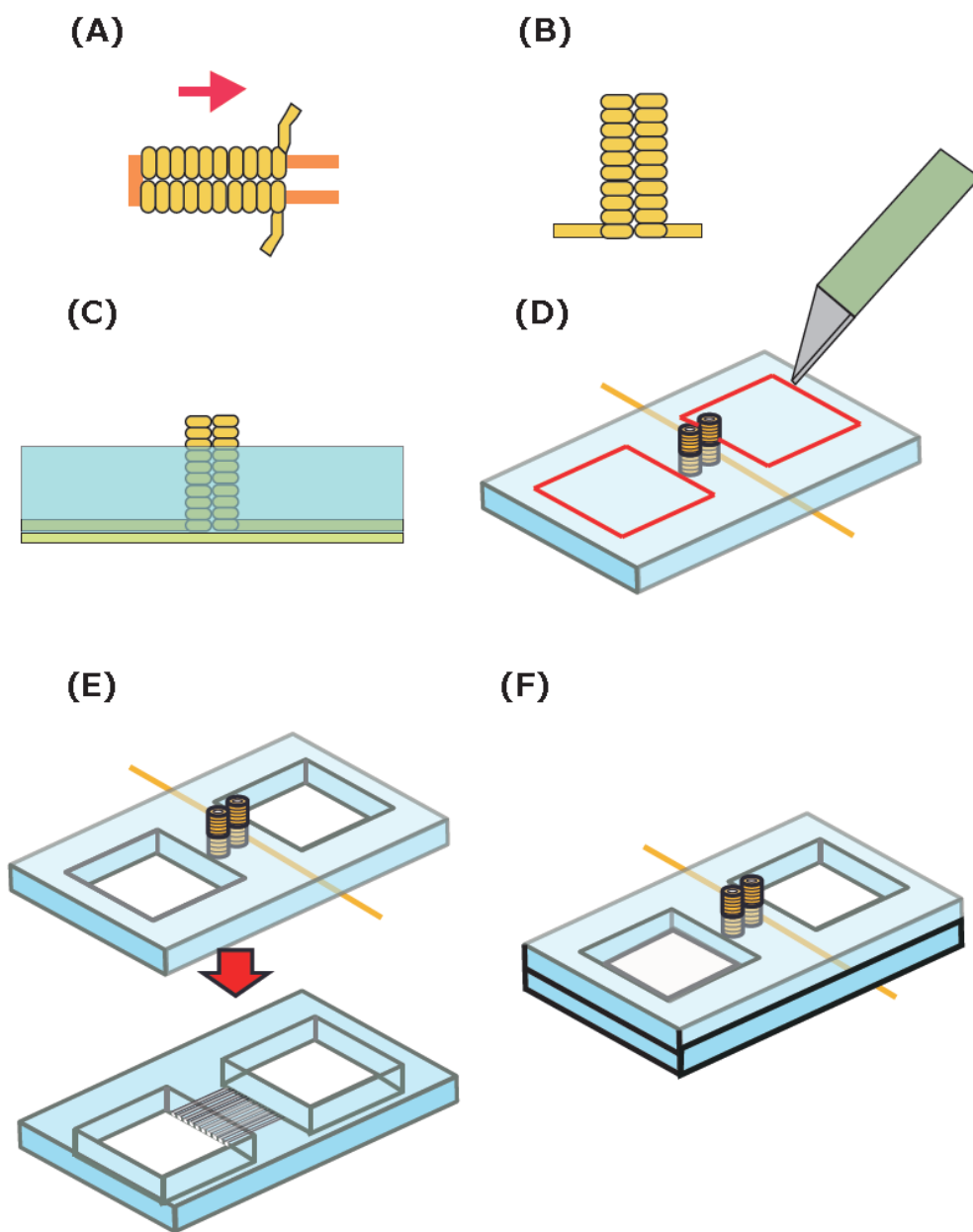
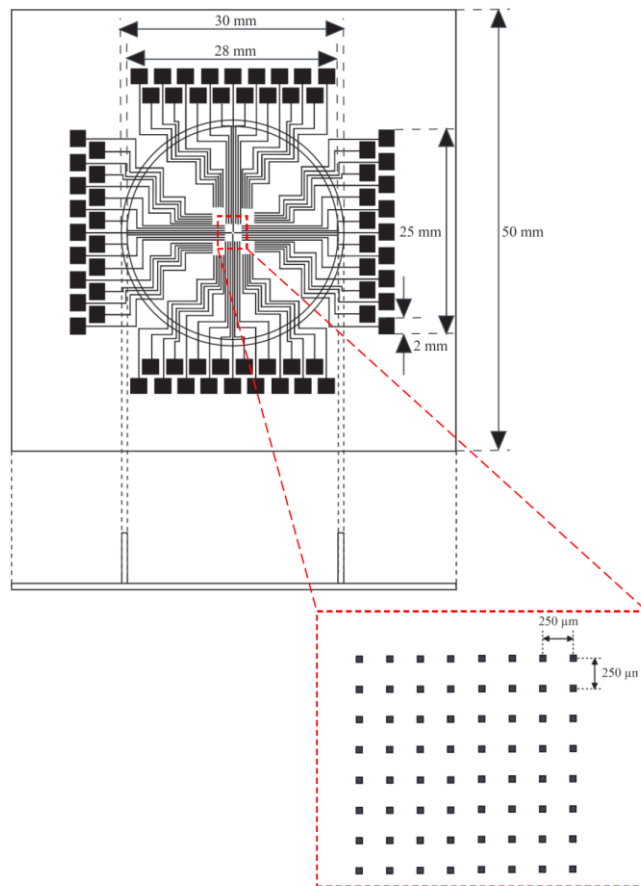


Fig. 4-3 微小コイルの固定法. 150 μm 径ポリウレタン皮膜銅線を 600 μm 径エナメル線に巻きつけることで直径 900 μm , 高さ 1.5 mm, 巻き数 10 の円筒コイルを構築して, 構築した円筒コイルを 2 つ組み合わせることで微小コイルを構築した (A, B). シリコンウエハ上に固定する時点でコイルの配置 (0 deg あるいは 90 deg) を決定した後, PDMS と硬化剤の混合物を流し込み, 80°C のホットプレート上で 1 時間静置させることで, PDMS を硬化させた (C). 硬化した PDMS をシリコンウエハから剥離して, 培養区画に相当する部位の PDMS を切り出し (D), 培養区画と微小通路を有する培養チャンバ上に載せることで, 微小コイルを埋め込んだ培養チャンバを構築した (E, F).



Fig. 4-4 微小コイルを埋め込んだ培養チャンバ. Scale bar, 5 mm.



(■:微小電極 50 μm×50 μm)

Fig. 4-5 MEA のサイズ及び微小電極の配置.

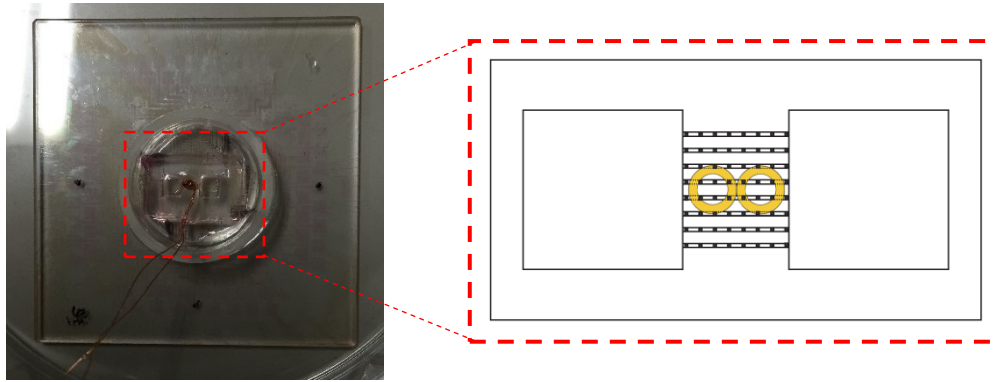


Fig. 4-6 構築したマイクロ磁気刺激デバイス. MEA 基板上の微小電極が培養チャンバの微小通路内に配置されるように, MEA 基板上に培養チャンバを配置した.

4-2-2 コンピュータシミュレーションによるコイル温度上昇, 磁界分布及び誘導電流分布の推定

本項では, マイクロ磁気刺激システム設計に必要なコンピュータシミュレーション手法を述べる. コンピュータシミュレーションにより, コイル内電流によるコイル温度上昇と, コイルによって発生する磁界及び誘導電流分布を推定する.

最初に, 微小コイルに電流を流すことによる温度上昇を以下の式(1) [Ruohonen et al. 1997]により推定した.

$$\Delta T = \eta(c\sigma S^2)^{-1} \int_0^{\Delta t} I^2(t) dt \quad (1)$$

(ただし, ΔT : 1 パルス電流毎の温度上昇[°C], η : 銅の抵抗率(= $1.68 \times 10^{-8} \Omega m$), c : 銅の比熱(= $3.87 \times 10^2 J/kg^\circ C$), σ : 銅の密度(= $8.70 \times 10^3 kg/m^3$), S : 銅線の断面積[m²], Δt : 電流パルス幅(s), $I(t)$: パルス電流値 [A])

次に, 磁界分布及び誘導電流分布を, Bio-Savart の法則, Gauss の法則及び Maxwell 方程式 [Miranda et al. 2003] により推定した. 推定に必要な数値計算は MATLAB 2015a (MathWorks) を使用することで行なった. 以下に, 磁界分布及び誘導電流分布の計算手順を示す.

はじめに, 円形コイルによって発生する磁束密度を Biot-Savart の法則 (Fig. 4-7) に基づき計算を行なった. Biot-Savart の法則式は, 式 (2)にて表される.

$$\mathbf{B} = \frac{\mu_0 I(t)}{4\pi} \oint \frac{d\mathbf{l} \times (\mathbf{r} - \mathbf{r}_0)}{|\mathbf{r} - \mathbf{r}_0|^3} \quad (2)$$

(ただし, \mathbf{B} : 磁束密度ベクトル, μ_0 : 真空透磁率(= $4\pi \times 10^{-7} H/m$), I : コイル電流, $d\mathbf{l}$: 微小電流要素ベクトル, \mathbf{r} : 計算点の位置ベクトル, \mathbf{r}_0 : 微小電流要素の位置ベクトル)

次に, 磁束密度によるベクトル・ポテンシャルを以下の Gauss の法則 (式 (3))によって導出した.

$$\mathbf{B} = \nabla \times \mathbf{A} \quad (3)$$

$$\mathbf{A} = \frac{\mu_0 I(t)}{4\pi} \oint \frac{d\mathbf{l}}{|\mathbf{r} - \mathbf{r}_0|} \quad (4)$$

(ただし, \mathbf{A} :ベクトル・ポテンシャル)

次に, 誘導電界を式 (4)及び Maxwell の方程式(式 (5))により計算した.

$$\nabla \times \mathbf{E} = -\frac{\partial \mathbf{B}}{\partial t} = -\frac{\partial(\nabla \times \mathbf{A})}{\partial t} \quad (5)$$

$$\mathbf{E} = -\frac{\partial \mathbf{A}}{\partial t} = \frac{\mu_0}{4\pi} \frac{dI(t)}{dt} \oint \frac{d\mathbf{l}}{|\mathbf{r} - \mathbf{r}_0|} \quad (6)$$

(ただし, \mathbf{E} :誘導電界ベクトル)

さらに, 誘導電界分布の推定を行なう際には, 被刺激導体の電氣的性質も考慮する必要がある. 特に, 電氣的性質の異なる物質間の境界面に対して垂直な方向の誘導電界は, 境界表面上に電荷を発生させる. 境界表面上の電荷は, 2 次的な電界を発生させることから, 境界面が存在することで, 誘導電界分布が変化する. 以下に, 境界面表面上の電荷による 2 次電界の発生に関する概念図を Fig.4-8 に示す. ここでは, 電氣的性質の異なる 2 つの物質から構成される境界面を考慮する. コイルから発生する変動磁界による 1 次電界が, 電気伝導率の大きい物質から電気伝導率の小さい物質の方向へ印加された場合, 境界表面上には正電荷が蓄積される. 逆に, コイルから発生する変動磁界による 1 次電界が, 電気伝導率の小さい物質から電気伝導率の大きい物質の方向へ印加された場合, 境界表面上には負電荷が蓄積される. ここで, 各境界面において蓄積する電荷による 2 次電界の計算方法を以下に示す.

はじめに, 境界条件を考慮した誘導電界は以下の式で表される.

$$\mathbf{E} = -\frac{\partial \mathbf{A}}{\partial t} - \nabla \Phi \quad (7)$$

(ただし, Φ :スカラーポテンシャル)

さらに, 変動磁界による誘導電流は, オームの法則によって以下の式で表される.

$$\mathbf{J} = \sigma \mathbf{E} \quad (8)$$

(ただし, \mathbf{J} :誘導電流, σ :導電率)

ここで, 境界面における電流は連続するために, 式 (8)は以下のように表される.

$$\mathbf{J}_1 \cdot \mathbf{n} = \mathbf{J}_2 \cdot \mathbf{n} \quad (9)$$

(ただし, \mathbf{J}_1 :領域1内における誘導電流ベクトル, \mathbf{J}_2 :領域2内における誘導電流ベクトル, \mathbf{n} :境界面に対する単位法線ベクトル)

式(8), (9)より, 境界面に蓄積する電荷に起因する2次電界成分は, 以下のように表される.

$$\nabla\Phi = \left(\frac{\sigma_1 - \sigma_2}{\sigma_1 + \sigma_2} \right) \frac{\partial A}{\partial t} \quad (10)$$

(ただし, σ_1 :領域1における導電率, σ_2 :領域2における導電率, さらに, $\sigma_1 > \sigma_2$ とする)

式(10)より, 領域1及び領域2における, 境界面に対し垂直方向の誘導電流密度はそれぞれ以下のように表される.

$$\mathbf{J}_1 \cdot \mathbf{n} = -\sigma_1 \left(\frac{2\sigma_2}{\sigma_1 + \sigma_2} \right) \frac{\partial A}{\partial t} \cdot \mathbf{n} \quad (11)$$

$$\mathbf{J}_2 \cdot \mathbf{n} = -\sigma_2 \left(\frac{2\sigma_1}{\sigma_1 + \sigma_2} \right) \frac{\partial A}{\partial t} \cdot \mathbf{n} \quad (12)$$

ここで, システムを模擬したシミュレーションモデルを Fig. 4-9 に示し, システム内の培養液, PDMS, 銅線の物性値を Table 4-1 にまとめる. さらに, コイル電流波形を単極方形波と設定し, コイル入力電流値, コイル入力電流パルス幅, コイル入力電流の立ち上がり時間を Table 4-2 にまとめる. 誘導電流の時間変化は, コイル電流を時間微分した関数となるために双極性となる.

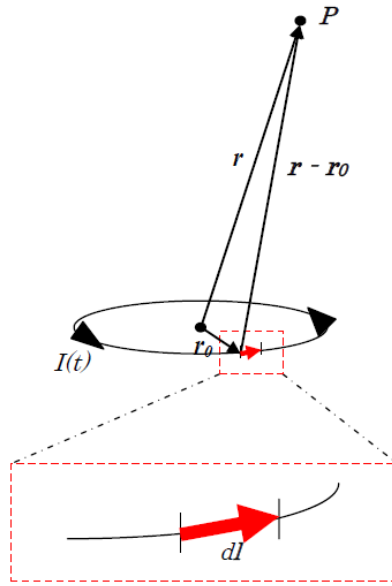


Fig. 4-7 Biot-Savart の法則の概念図

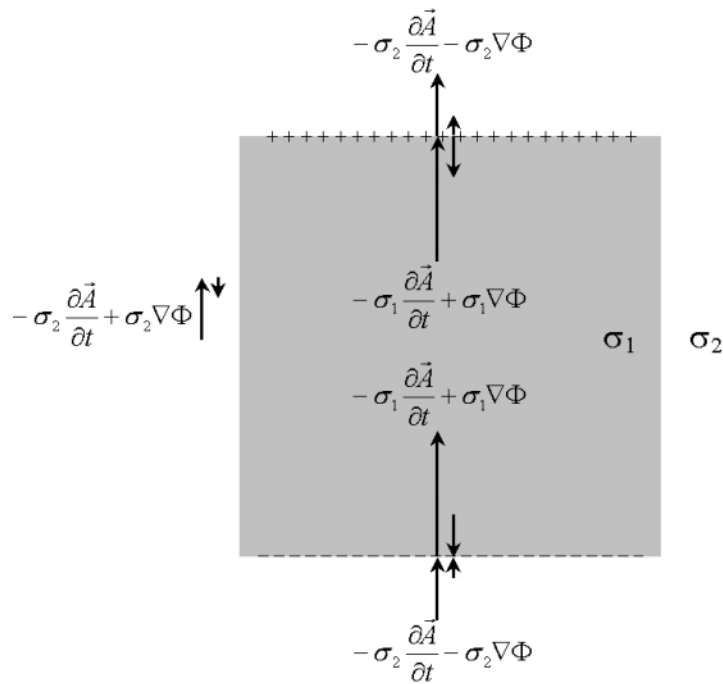


Fig. 4-8 境界表面上に蓄積した電荷分布を影響を考慮した誘導電流計算 [Miranda et al. 2003]. 灰色で示す部分, 導電率が高い領域; 白色で示す部分, 導電率が低い領域. 誘導電界が, 導電率が高い領域から低い領域を貫通すると正電荷が境界面に帯電し, 逆の場合であると負電荷が蓄積する.

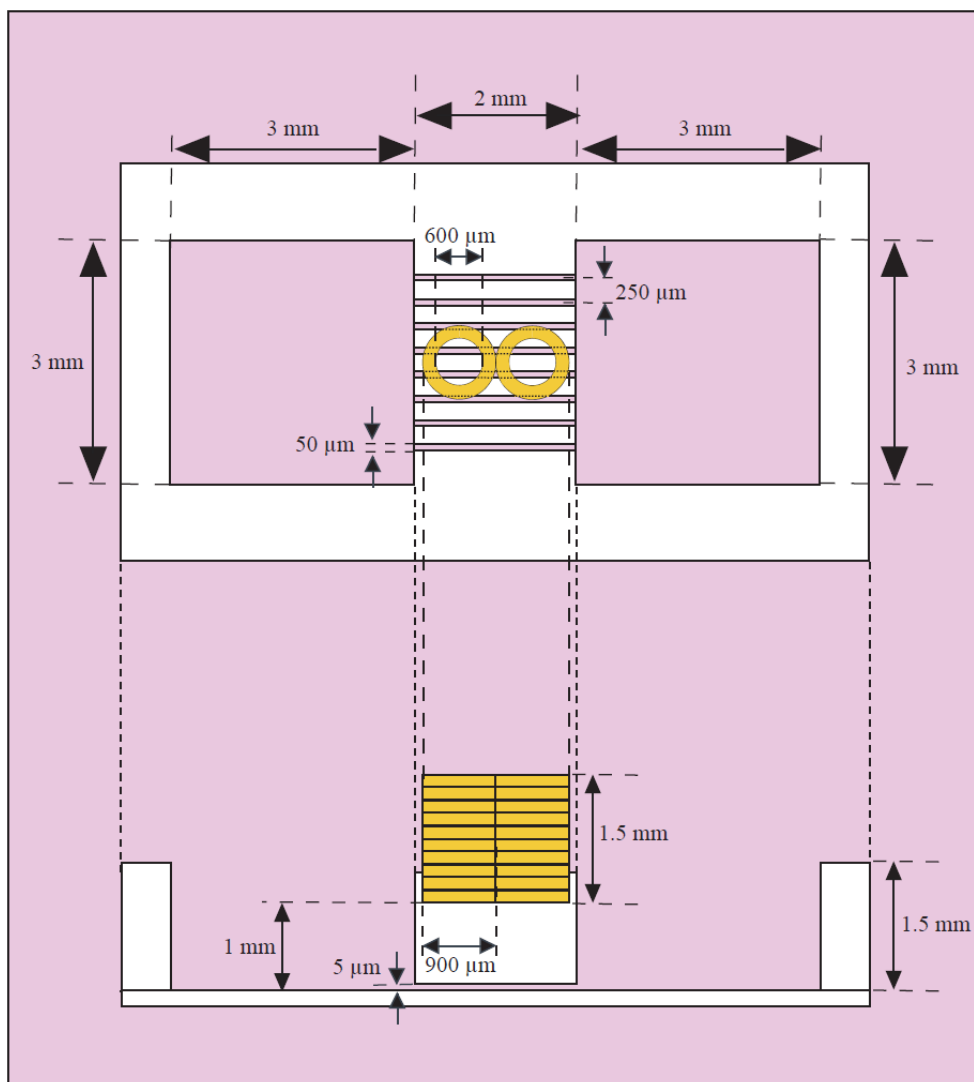


Fig. 4-9 マイクロ磁気刺激システムの計算モデル. 実験で使用するシステムと同じ条件下でモデルを構築した.

Table 4-1 培養液, PDMS チャンバ及び銅線の物性値

	導電率 (S/m)	比透磁率
培養液	1.984	1
PDMS チャンバ	2.5×10^{-14}	1
銅線	5.8×10^7	0.991

Table 4-2 磁気刺激パラメータ

コイル入力電流値 (A)	コイル入力電流パルス幅(ms)	コイル入力電流の立ち上がり時間 (ns)
0.69	1	10

4-2-3 細胞培養

本章では、自律神経細胞として培養手法が安定している SCG 神経細胞を使用した。SCG 神経細胞は、1-3 日齢の Wistar Rat 新生児(チャールズリバー)の SCG より採取した。SCG 神経細胞は 2-3-1-1 項に示す手順で採取及び単離を行なった。2-2-1 項に示す手順で Type I-C Collagen (新田ゼラチン)を使用したコーティングを行なった後に SCG 神経細胞を 1000 cells/mm² で培養チャンバの培養区画に均一に播種した。

4-2-4 マイクロ磁気刺激システムの形態的評価

本章では、マイクロ磁気刺激システムの形態的評価を免疫組織化学染色法による培養細胞の観察により行なった。免疫組織化学染色法は、2-2-1 項に示した手順で行ない、1 次抗体は、神経細胞マーカーである Anti-B3T antibody (Abcam) を 400 倍の希釈率で使用し、2 次抗体は Alexa fluor 488 anti-mouse IgG (Molecular probes) を 500 倍の希釈率で使用した。さらに、細胞核の染色を行なうために、DAPI を使用した蛍光染色も行なった。

4-2-5 磁気刺激印加システム

マイクロ磁気刺激システム内の微小コイルにパルス電流を入力するための磁気刺激印加システムを設計した。磁気刺激印加システムのシステム図を Fig.4-10 に示す。微小コイルへ入力する信号の出力は、ファンクションジェネレータ(33521A; Agilent)にて行なった。神経刺激に必要な誘導電流を発生させるパルス電流を生成するために、ファンクションジェネレータから出力された信号を高速バイポーラ電源(BWS 40-7.5; 高砂製作所)により増幅することで、神経刺激を行なうことができる程度の誘導電流を発生させるために要する電流を生成した。

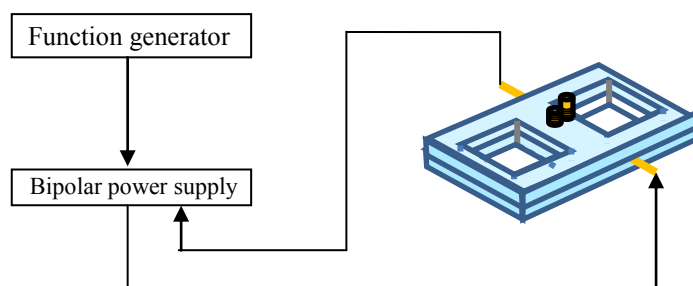


Fig. 4-10 磁気刺激印加システムとマイクロ磁気刺激デバイス. 磁気刺激印加システムはファンクションジェネレータ, 高速バイポーラ電源から構成される.

4-2-6 神経細胞の活動評価

本章では, SCG 神経軸索に対する磁気刺激中における自律神経細胞の活動評価を行なうために, 細胞内 Ca^{2+} 濃度計測及び細胞外電位計測を行なった. 細胞内 Ca^{2+} 濃度計測は, 2-2-2-2 項に示した Ca^{2+} イメージング法により行ない, 蛍光画像は, 解像度を 500×500 pixel, フレームレートを 10 frames/s に設定して取得した. 一方, 細胞外電位は, 2-2-2-1 項に示した細胞外電位記録システムを使用して計測した.

4-2-7 自律神経軸索に対する磁気刺激実験プロトコル

本章では, 自律神経軸索に対する磁気刺激実験のプロトコルに関して述べる.

細胞内 Ca^{2+} 濃度計測では, 神経軸索に対する磁気刺激前30秒間及び磁気刺激中30秒間計測した. 細胞内 Ca^{2+} 濃度計測時における磁気刺激の頻度は10 Hzとして, コイル電流のパラメータは Table 4-2に示す値とした.

一方, 細胞外電位計測では, 磁気刺激時間を1分間として, 磁気刺激前後5分間及び磁気刺激中における神経細胞の電気活動を計測し, 刺激前後の神経活動を比較することで磁気刺激の効果の検証を行なった. 細胞外電位計測により得られたデータの解析は, 2-2-2-1項に示す手順で行ない, 評価指標は, 磁気刺激前後の自発活動スパイク数とした.

4-2-8 生体外からの自律神経刺激を想定したコンピュータシミュレーション

生体外から自律神経線維束に対する磁気刺激を想定して, 神経線維束に対する局所的な刺激を行なうことができる条件の導出を試みた. 導出には, コンピュータシミュレーションによる誘導電流分布推定により行なった.

最初に, 計算モデルに関して述べる. 計算モデルを Fig. 4-11 に示す. 刺激対象は左頸部迷走神経線維束として, 線維束の直径は 4.5 mm, 皮膚表面から線維束までの距離は 1.5 cm とした [Hammer et al. 2015]. コンピュータ上に単純な生体モデルとして無限導体を構築した. 導体の導電率は生理食塩水の導電率である 2 S/m [Bonmassar et al. 2012]に設定した. コイルの形状は8の

字形として、コイル底面は導体上面に接するように配置した。コイル配置は、神経束に対して垂直方向に誘導電流が流れる配置とした。

評価指標は、モデル表面から 4.5 cm の平面における刺激領域とした (Fig. 4-12)。ただし、刺激領域は末梢神経刺激閾値である 10 A/m^2 を超えた誘導電流が分布する領域と定義した。刺激領域の形状は楕円形であると仮定し、領域の長軸が神経束の直径である 4.5 mm と一致するための条件を導出した。

次に、パラメータにつき述べる。本実験では、コイル径と巻き数をパラメータとして、コイル電流の大きさを考慮することで刺激の条件を導出した。ただしコイル径は、神経束の直径を勘案して最大 6 mm とした。巻き数は、5, 10, 15, 20 回巻きとした。

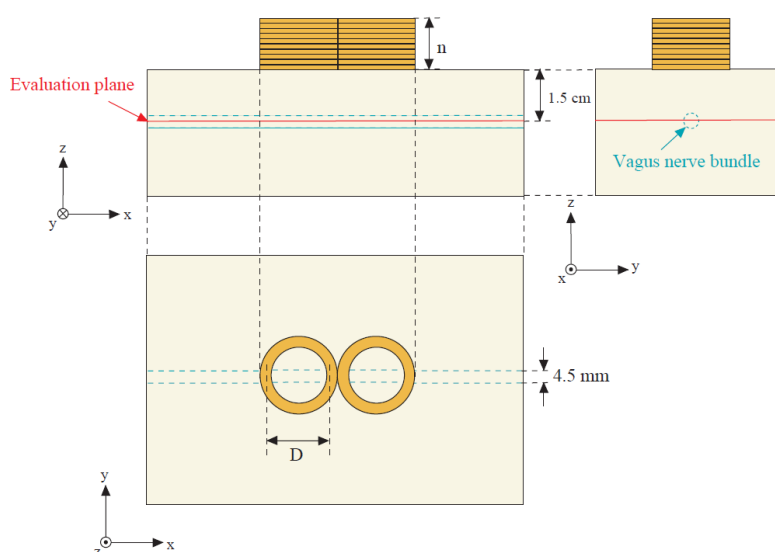


Fig. 4-11 生体外からの自律神経刺激を想定した計算モデル. D, コイル径; n, コイル巻き数; Evaluation plate, 評価平面; Vagus nerve bundle, 迷走神経線維束.

Table 4-3 計算モデルの物性値

	導電率 (S/m)	比透磁率
導体	2.0	1
銅線	5.8×10^7	0.991

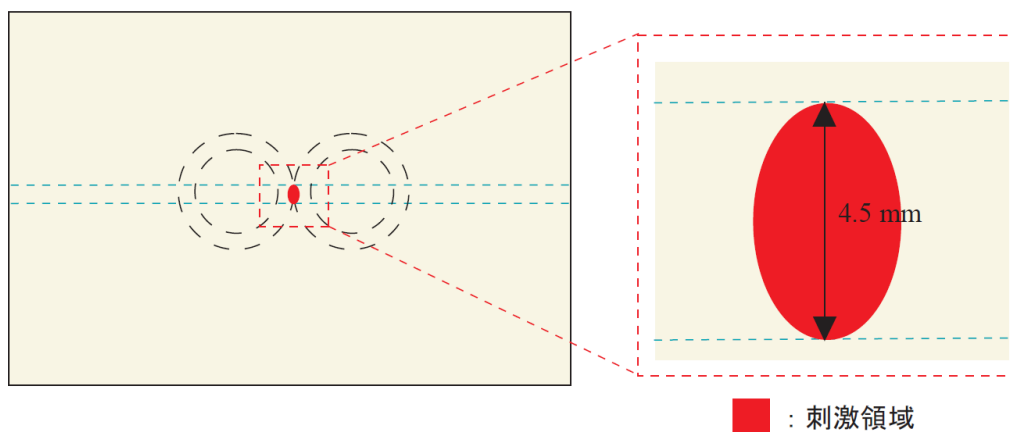


Fig. 4-12 評価手法の概念図. 刺激領域の長軸の長さが線維束の直径 4.5 mm と一致する条件を導出する.

4-3 実験結果

4-3-1 コンピュータシミュレーションによるコイル温度上昇, 磁界分布及び誘導電流分布評価

はじめに, 微小コイルにパルス幅 1 ms パルス電流を 10 Hz の頻度で 1 分間流した際の銅線の温度上昇を Fig. 4-13 に示す. コイル入力電流が 4.3 A を超えると, 銅線の耐熱温度である 130°C を超えることが計算結果より明らかとなる.

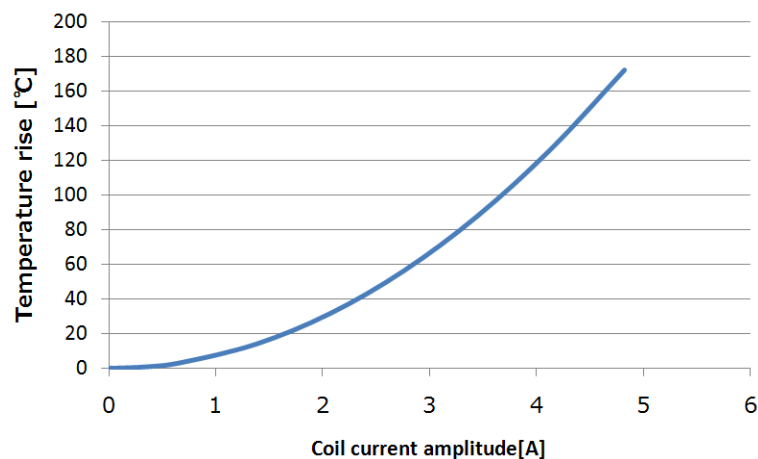


Fig. 4-13 (1) 式より導出したコイル入力電流値に対する銅線の温度上昇.

次に, コンピュータシミュレーションによる磁界分布及び誘導電界分布の推定によりコイル径の最適化を行なった. コイル径を 400 μm , 600 μm , 800 μm , 900 μm , 1 mm とした際の, コイルの交点から最も近い微小通路内に見られる最大誘導電流密度を Fig. 4-14 に示す. ただし, コイルの入力電流はコイルの温度上昇が大きく見られない値である 0.69 A としている. さらに, コイルの重みに

よるたわみにより培養底面からコイル底面までの距離は 1 mm としている。末梢神経刺激閾値とされる 10 A/m^2 [国際非電離放射線防護委員会 2010] を勘案すると、コイル径が $800 \mu\text{m}$ 未満である場合の最大誘導電流密度は刺激電流密度閾値を超えないことが示される。電流による発熱と、コイル径を大きくすることによる刺激の空間分解能の低下を考慮して、システム内のコイル径は刺激誘導電流密度に近い誘導電流を生じる条件である $900 \mu\text{m}$ と設定した。

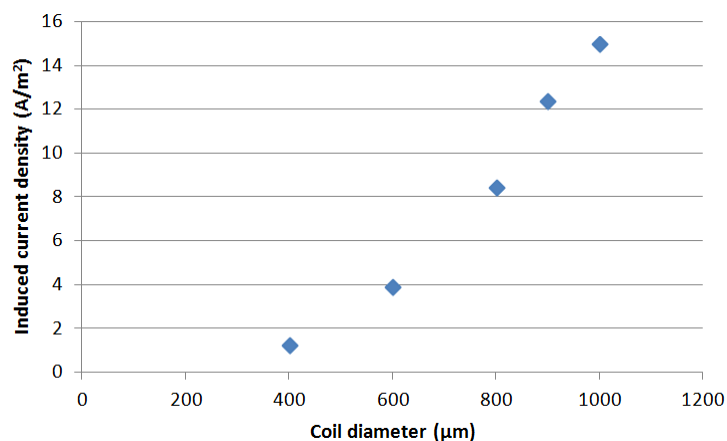


Fig. 4-14 コイル径による最大誘導電流密度. コイル電流 0.69 A , 電流パルス幅 1 ms , 電流の立ち上がり時間 10 ns .

次に、 0 deg の配置における磁界分布及び誘導電流分布を Fig. 4-15 に示す。磁界強度は最大で $150 \mu\text{T}$ 程度、誘導電流は最大 12.3 A/m^2 であることが示された。

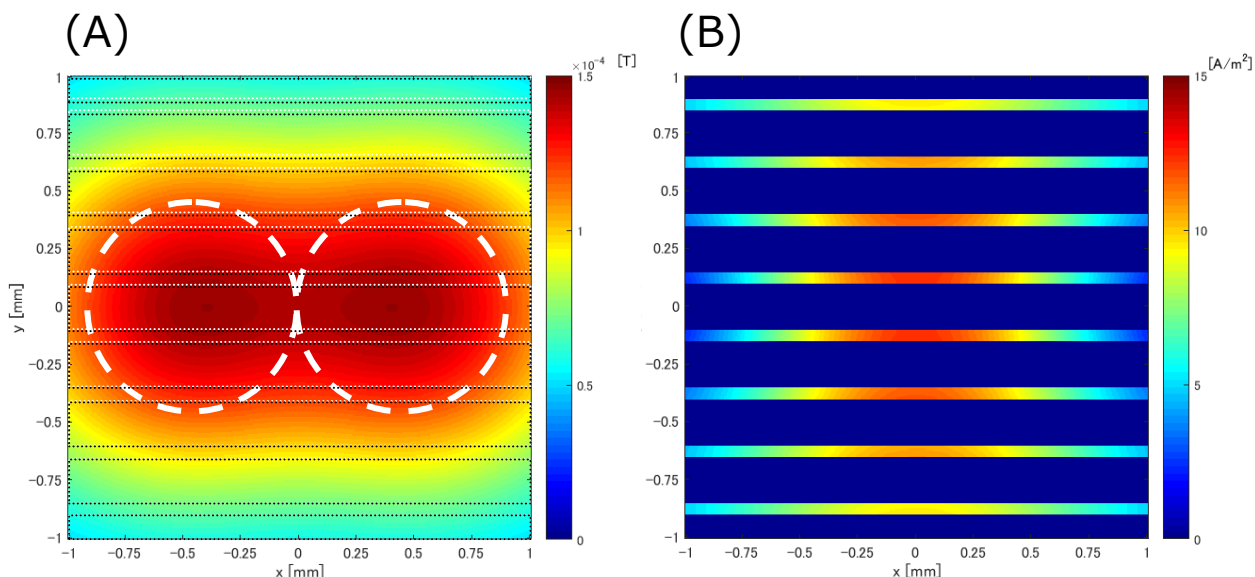


Fig. 4-15 0 deg のコイル配置とした際の磁界分布 (A) 及び誘導電流分布 (B). コイル電流 0.69 A , 電流パルス幅 1 ms , 電流の立ち上がり時間 10 ns .

4-3-2 マイクロ磁気刺激システムの形態的評価

20 DIV における培養細胞の蛍光染色画像を Fig.4-16 に示す. SCG 神経細胞および ICG 神経細胞は Anti-B3T antibody を使用することで染色を行なった. DAPI による細胞核染色の結果から, 微小通路内のみならず, チャンバ底面と MEA 基板表面間にまで細胞が侵入していることが確認されたものの, SCG 神経軸索は, 微小通路内を伸長していることが確認された.

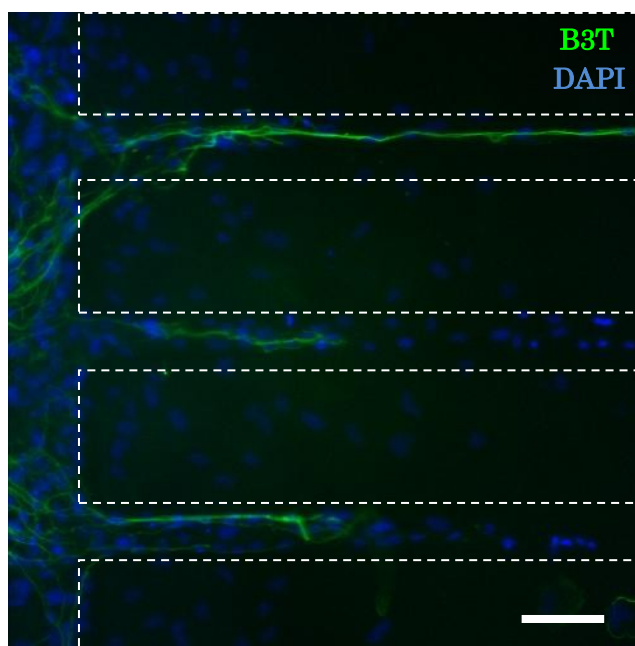


Fig. 4-16 微小通路内の SCG 神経細胞の軸索 (20 DIV; Scale bar, 100 μm)

4-3-3 磁気刺激における神経細胞の活動評価

4-3-3-1 刺激頻度による神経細胞の活動変化

本実験では, 刺激頻度による神経軸索の興奮につき検討を行なうために, 刺激頻度を変化させた場合における神経細胞の活動変化を評価した. 神経細胞の活動評価は細胞外電位計測により行なった. はじめに, 磁気刺激に対する神経軸索の誘発応答を計測した. 刺激頻度を 0.1Hz とした場合の神経軸索の電気活動を Fig. 4-17 に示す. 刺激終了後において誘発応答が観測され, 磁気刺激により神経軸索が刺激されていることが分かる.

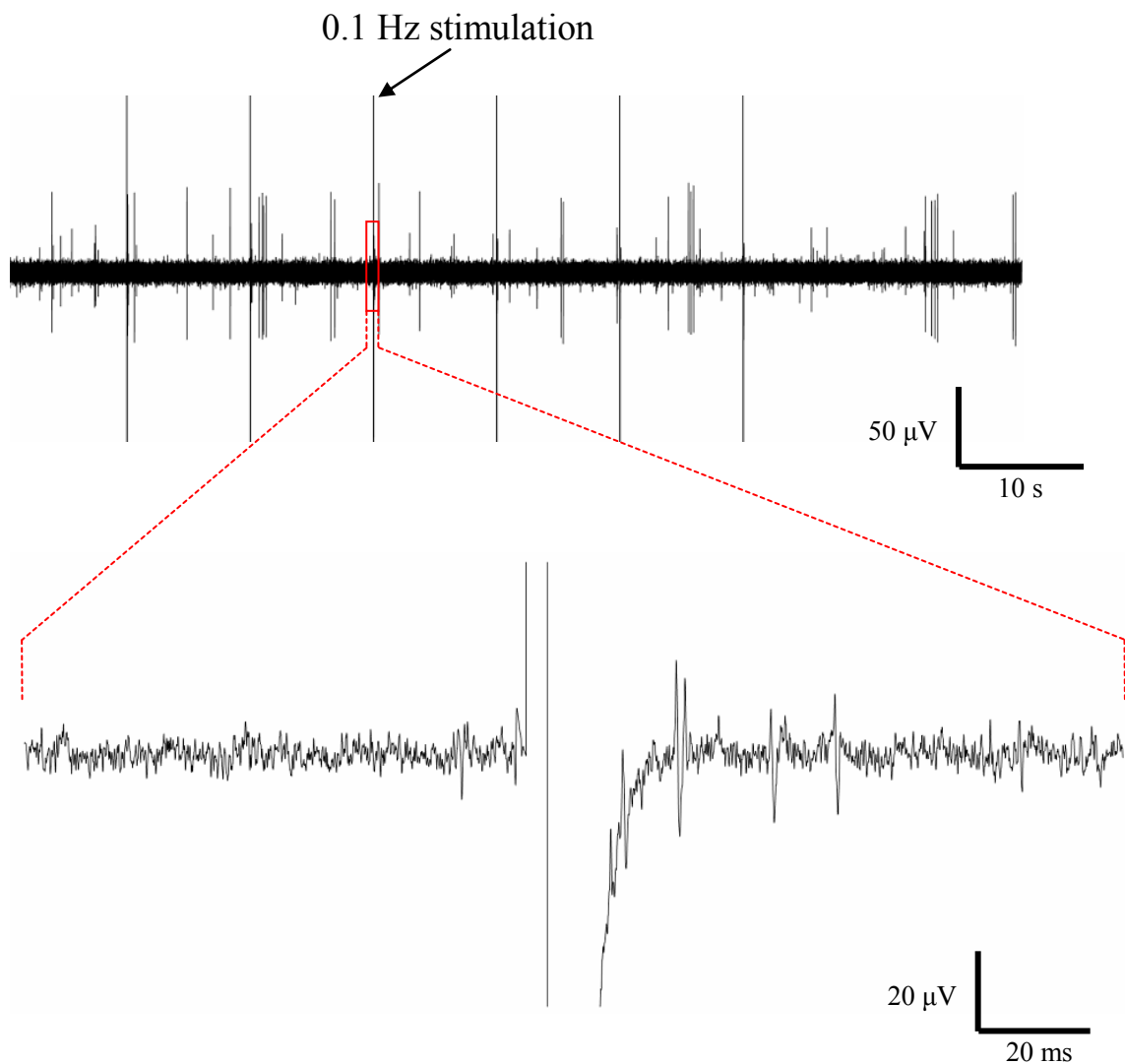
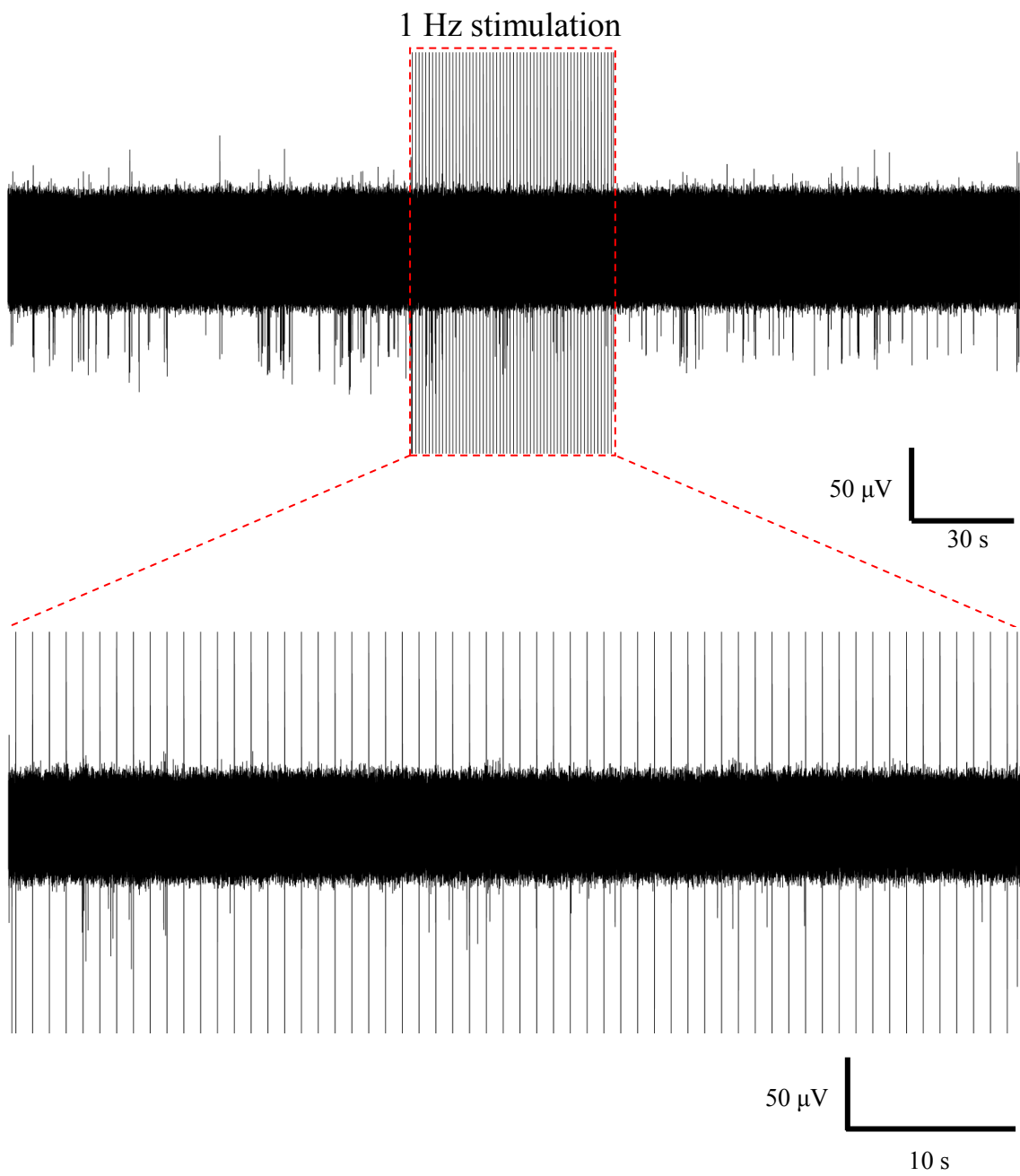


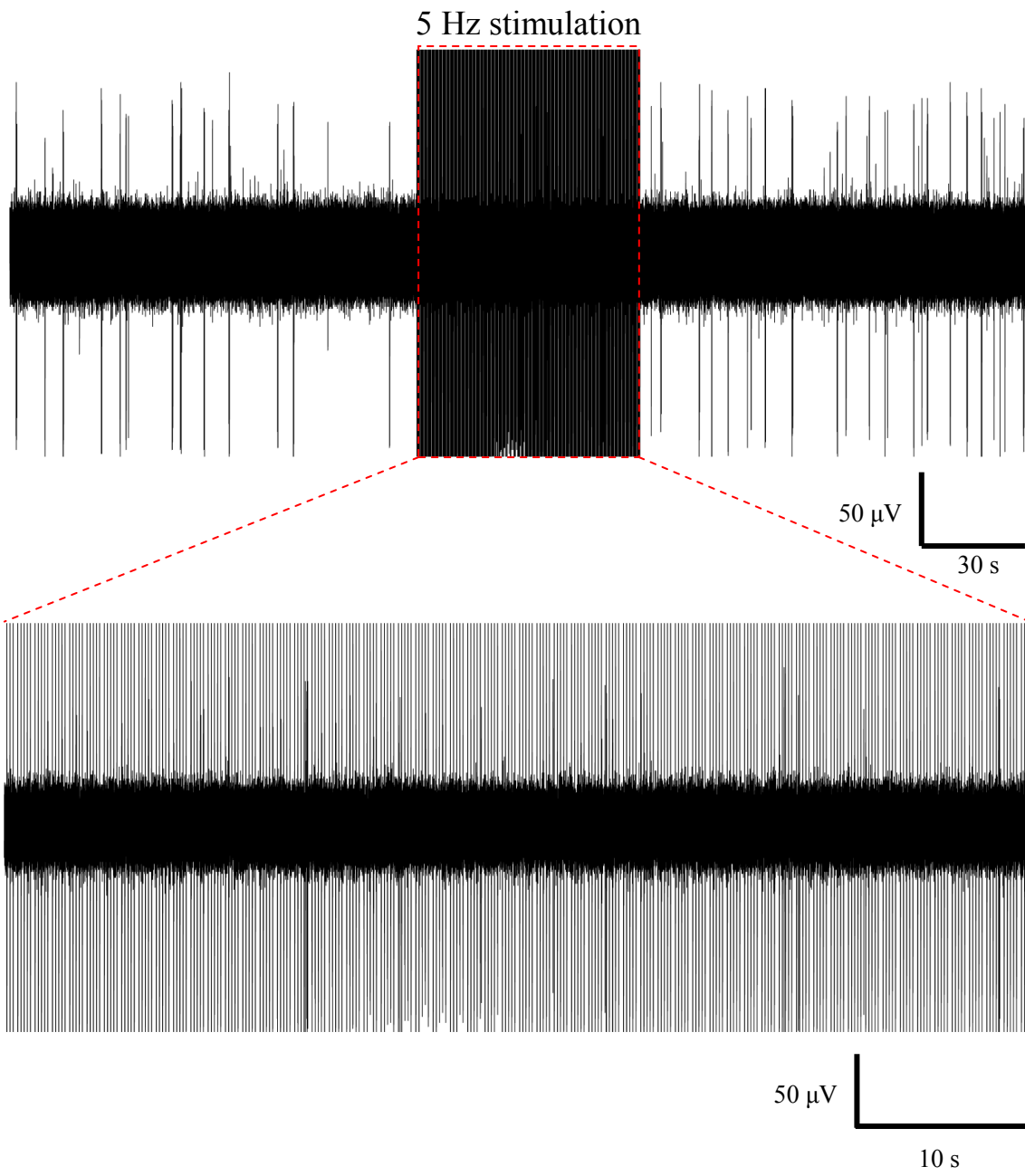
Fig. 4-17 刺激頻度 0.1 Hz における SCG 神経軸索の電気活動波形. 刺激開始 10 秒前から刺激終了 20 秒後までの活動波形を計測したデータである. 刺激直後に誘発応答が観測された.

次に, 1 Hz, 5 Hz, 10 Hz の各条件での神経軸索の電気活動を Fig. 4-18 に, 刺激前後のスパイク数の時間遷移を Fig. 4-19 に示す. 10 Hz で刺激を行なった場合で, スパイク数の顕著な上昇が見られた.

(A)



(B)



(C)

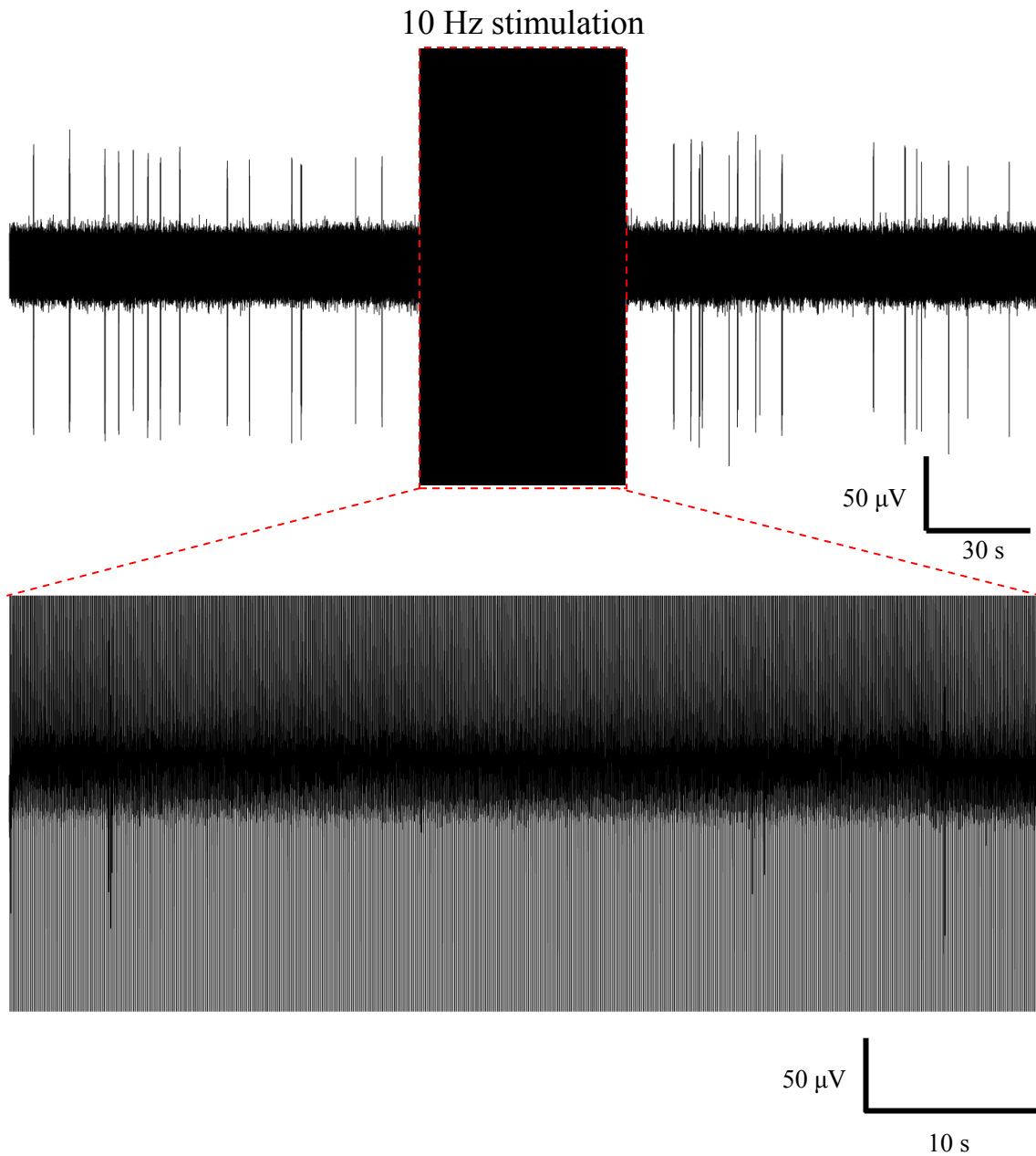


Fig. 4-18 刺激前後での神経軸索の電気活動. 刺激頻度 1 Hz(A), 5 Hz(B), 10 Hz(C) の条件における, 刺激開始 2 分前から刺激終了 2 分後までの活動波形を計測したデータを示す.

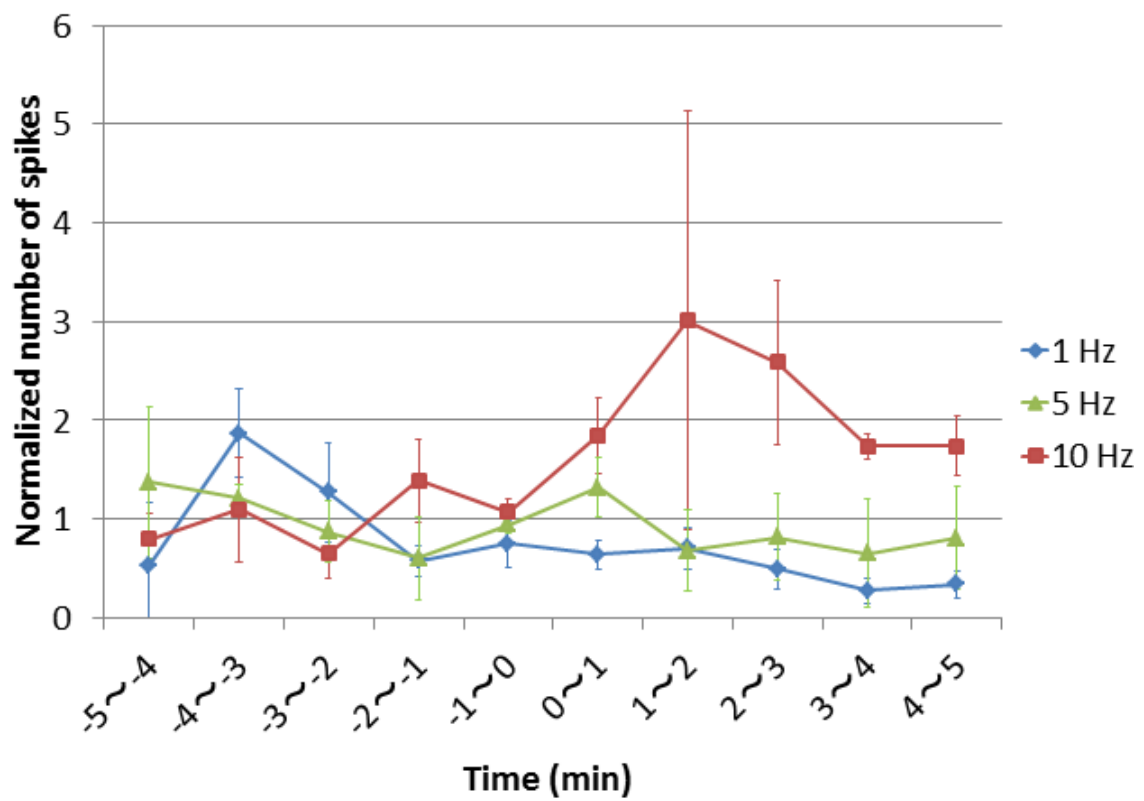


Fig.4-19 刺激前後の神経軸索の活動電位スパイク数の時間遷移. 20 DIV に計測したデータより作成した. n=3 samples.

4-3-3-2 微小コイルの配置による神経細胞の活動変化

本実験では、神経軸索の走方向に対する誘導電流の向きによる神経軸索の興奮につき検討を行なうために、微小コイルの向きを 0 deg 及び 90 deg とした際の SCG 神経細胞の活動評価を行なった。神経細胞の活動評価手法として、細胞内 Ca^{2+} 濃度計測と細胞外電位計測を行なった。

最初に、微小コイルの向きを 0 deg 及び 90 deg とした際の SCG 神経細胞群の Ca^{2+} 濃度変化を Fig. 4-20, 21 に示す。結果、微小コイルの向きが 0 deg の場合、刺激中に細胞内 Ca^{2+} 濃度の変動が見られたのに対し、90 deg の場合、変動が見られなかった。

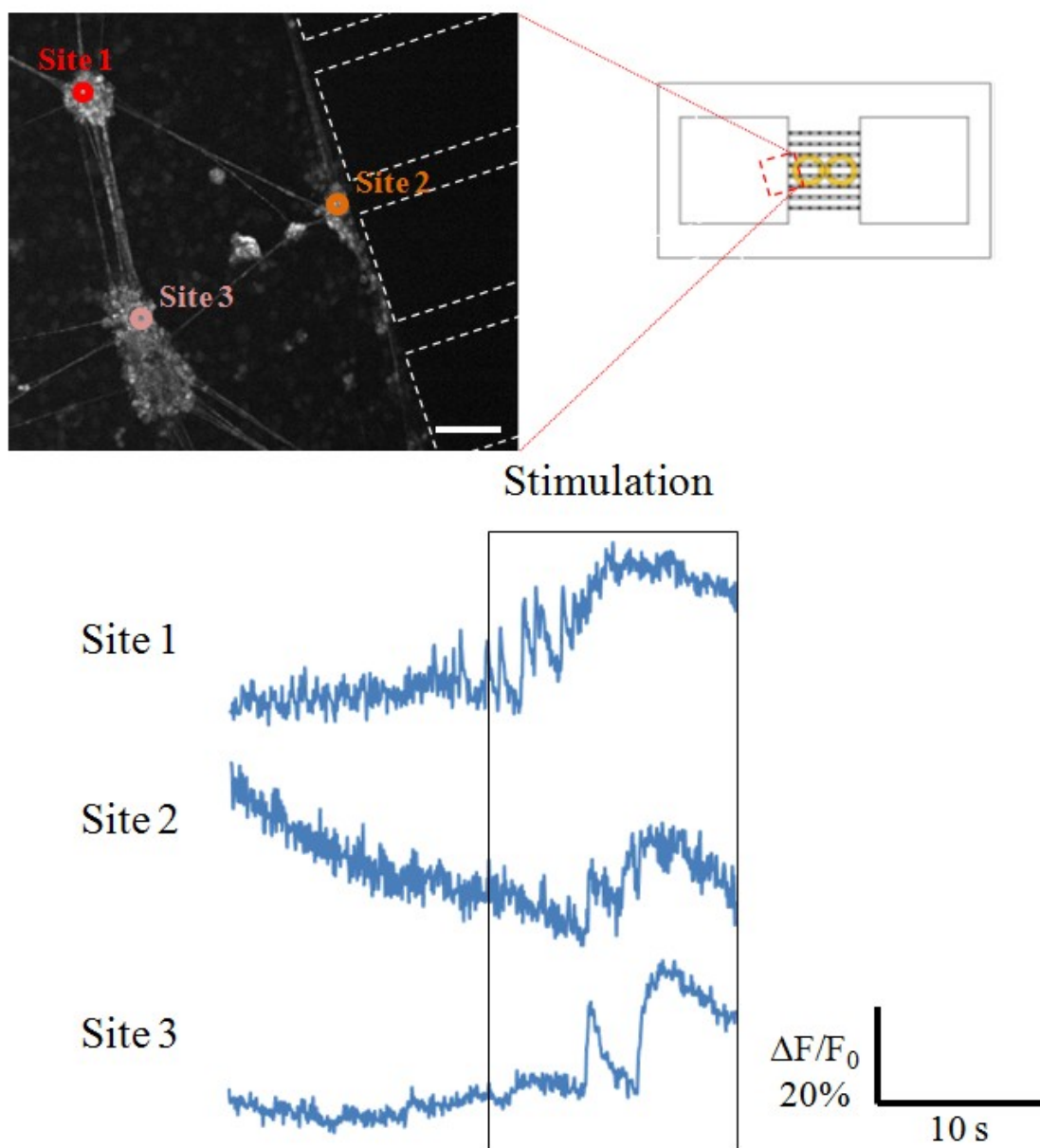


Fig.4-20 微小コイルの向きを 0 deg とした際の SCG 神経細胞内 Ca^{2+} 濃度変化. 20 DIV に計測したデータである. Scale bar, 100 μm .

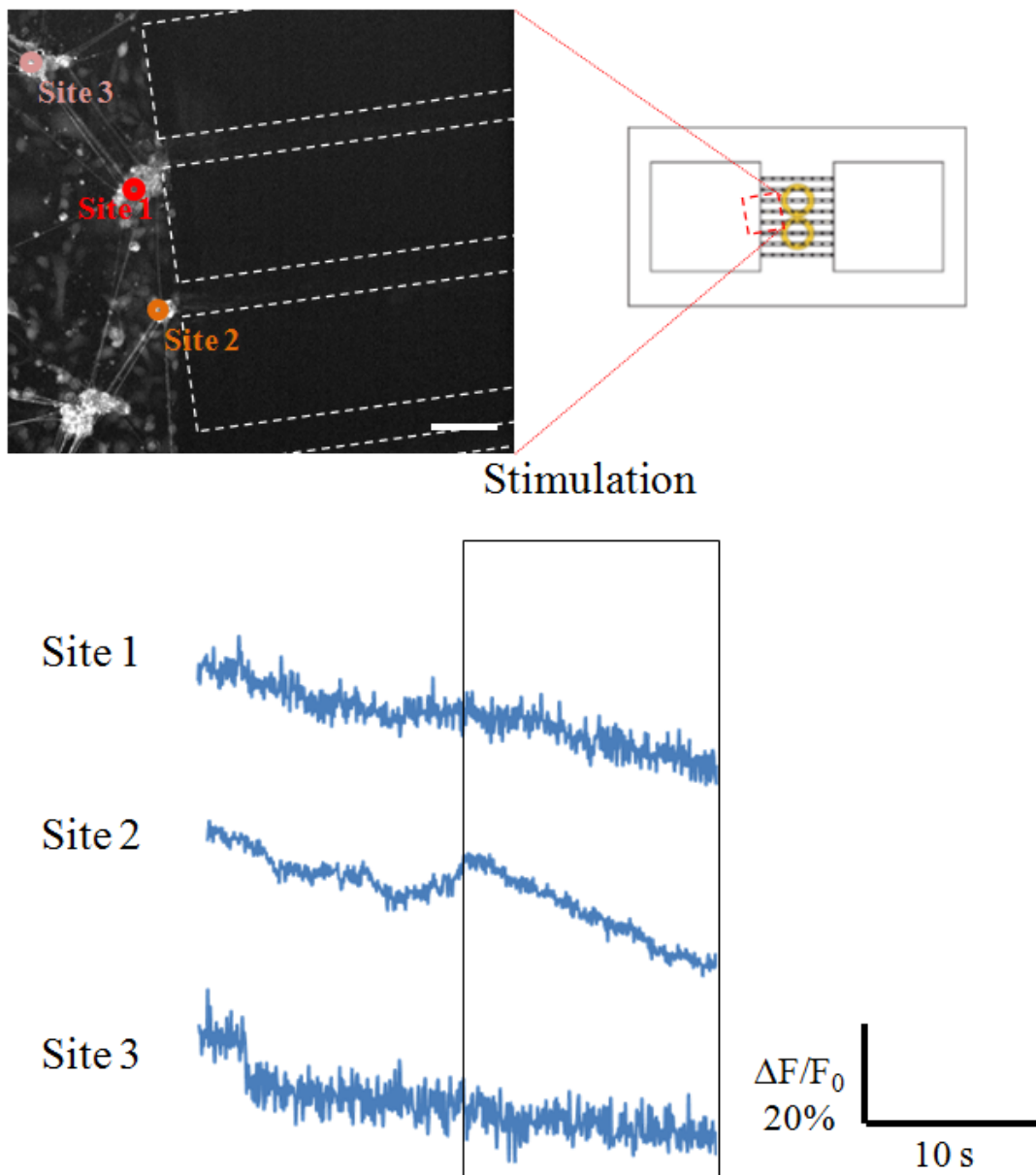


Fig.4-21 微小コイルの向きを 90 deg とした際の SCG 神経細胞内 Ca^{2+} 濃度変化. 20 DIV に計測したデータである. Scale bar, 100 μm .

さらに, 微小コイルの向きを 0 deg 及び 90 deg とした際の神経軸索の活動電位スパイク数の変化を Fig. 4-22 に示す. Fig. 4-22 内に示す結果は, 各試料において磁気刺激前 5 分間のスパイク数の平均値を 1 として規格化を行なっている. 微小コイルの向きが 0 deg の場合, 活動電位スパイク数の増加が認められた.

以上の実験結果より, 神経軸索走方向に対して垂直方向に誘導電流が流れた場合に神経軸索が刺激されることが示された.

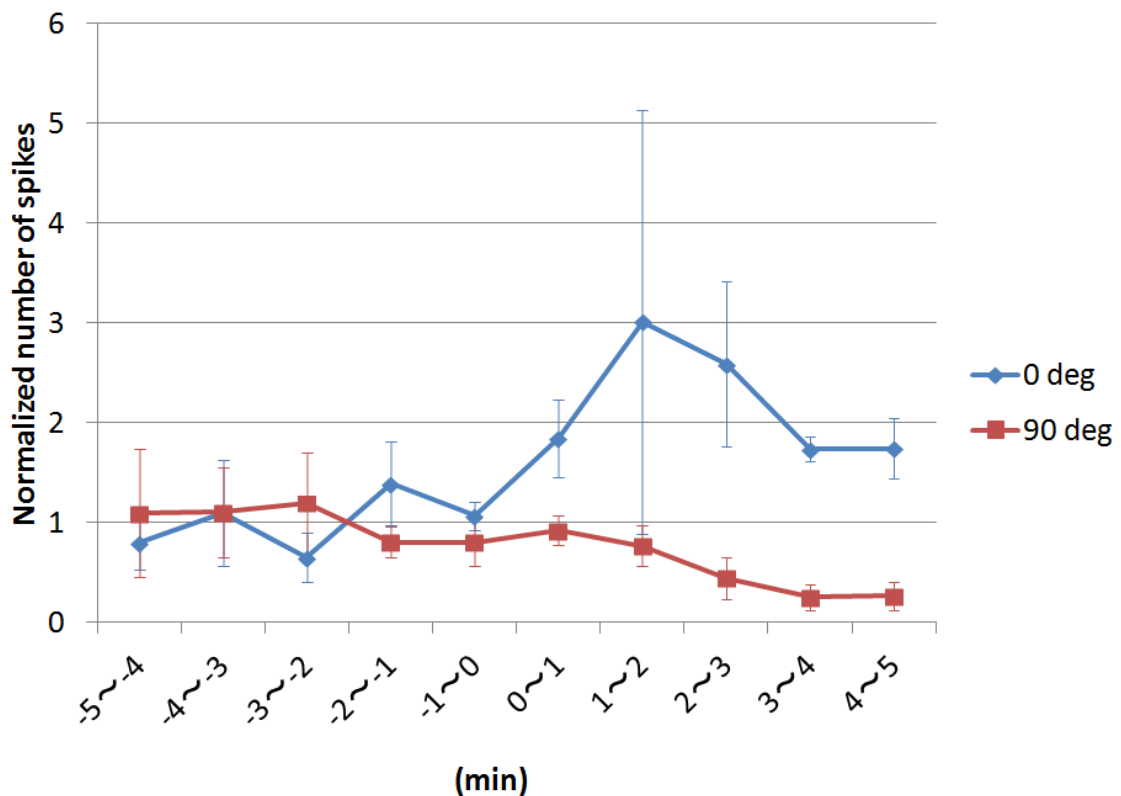


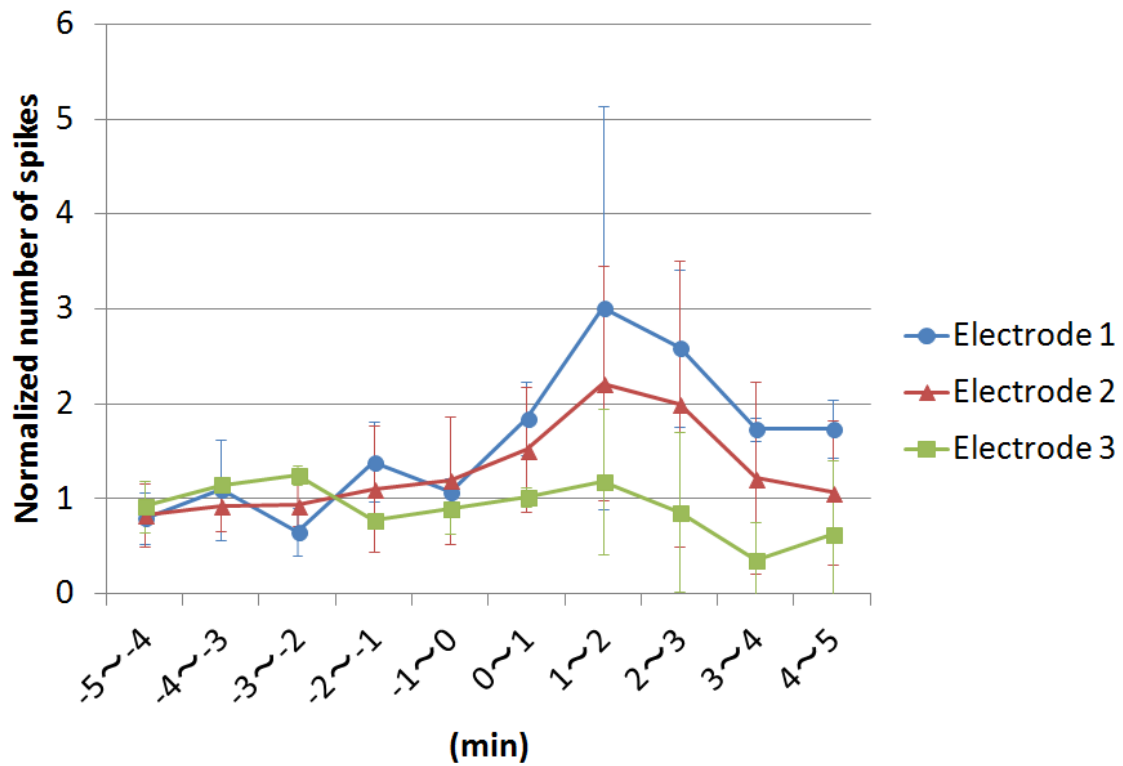
Fig.4-22 微小コイルの配置間でのスパイク数の時間遷移の比較. 20 DIV に計測したデータより作成した. n=3 samples.

4-3-4 磁気刺激の空間分解能評価

異なる微小通路を伸長する神経軸索の活動電位スパイク数の変化を Fig. 4-23 に示す. 刺激終了後のスパイク数の増加率が, コイル交点から最も近い Electrode 1 で最も増加率が高く, 交点から離れるにつれて増加率が低下する傾向が見られた.

システム設計で行なったコンピュータシミュレーションの結果, 誘導電流密度は Electrode 1 上では 12.2 A/m^2 , Electrode 2 上では 11.7 A/m^2 , Electrode 3 上では 9.5 A/m^2 であり, 刺激閾値に相当する 10 A/m^2 の誘導電流密度は, Electrode 2-Electrode 3 間の部位で見られることが推定された (Fig. 4-15). 一方, 実験における各電極上における神経軸索のスパイク数の増加率から, Electrode 1 及び Electrode 2 上の SCG 神経軸索は誘導電流により刺激され, Electrode 3 上の SCG 神経軸索は誘導電流により刺激されていないと考え, 実験結果からも Electrode 2-Electrode 3 間の部位で刺激閾値に相当する 10 A/m^2 の誘導電流密度が見られると推定できることから, 実験結果とシミュレーション結果で一致することが示された. 刺激の空間分解能に関して, コイル交点から Electrode 2 上の微小通路までの距離である $375 \mu\text{m}$ と, コイル交点から Electrode 3 上の微小通路までの距離である $875 \mu\text{m}$ を考慮すると, 刺激の空間分解能は 1 mm であることが示された.

(A)



(B)

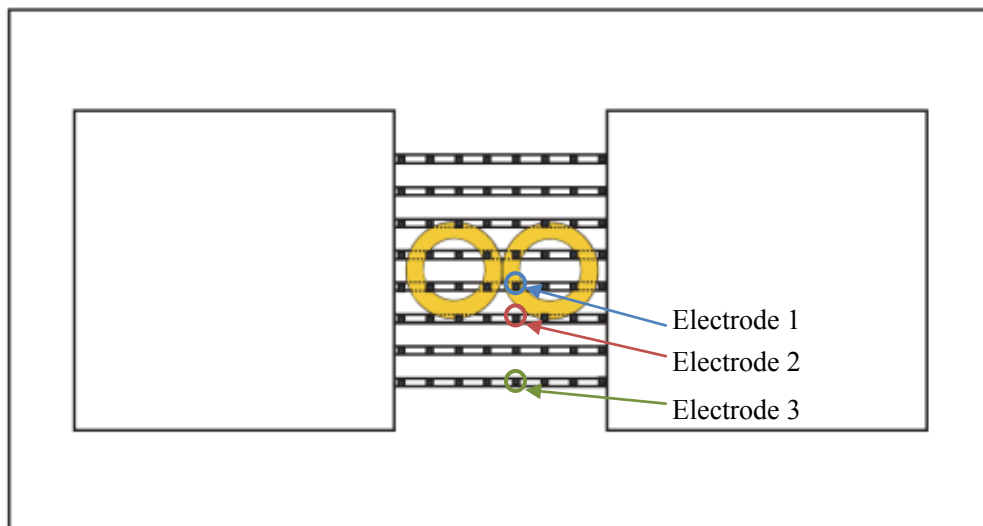


Fig. 4-23 異なる微小通路を伸長する神経軸索間でのスパイク数の時間遷移の比較. 20 DIV に計測したデータより作成した. (A):各微小電極より計測した刺激前後における神経軸索の活動電位スパイク数. (B):神経軸索の活動電位を計測した電極の位置関係. n=3 samples.

4-3-5 生体外からの自律神経刺激を想定したコンピュータシミュレーション

刺激領域の長軸が神経束の直径である4.5 mmと一致するための条件を Fig. 4-24 に、導出した条件の1つである、コイル径4 mm, 10 回巻き, 電流0.62 Aとしたときの誘導電流分布を Fig. 4-25 に示す. 誘導電流密度は, 刺激の標的部-コイル間の距離に反比例するために, 実験で設定した1 mm の条件と比べ誘導電流密度は15分の1に減衰する. そのため, 900 μm 径のコイルで深さ1.5cm の部位に閾値を超えた誘導電流密度を発生するには, 実験で設定した電流の15倍の電流を流す必要があるが, 温度上昇や許容電流を勘案すると, コイル電流には制限がある. 誘導電流密度はコイル径の2乗に比例することを考えると, コイル電流を変えずに深さ1.5cm の領域に閾値を超えた誘導電流密度を発生させるには, コイル径を4倍にする必要がある (Fig. 4-25). Fig.4-25 の条件と, マイクロ磁気刺激システムによる実験条件間での誘導電流分布の比較を Fig.4-26 に示す. 結果から, Fig.4-25 の条件での空間分解能は5 mm であり, 実験条件における刺激の標的部-コイル間の距離が1 mm の場合の空間分解能に比べ5倍低下する. 刺激の標的部-コイル間の距離が大きくなると, 誘導電流分布の変化が緩やかとなり, 局所的な刺激は困難となることが示された. さらに, コイル巻き数に関しては, 5回巻きと10回巻き間で差が見られるが, 巻き数を多くするにつれて抵抗値も大きくなるため, 条件間に差が見られなくなることが予想できる.

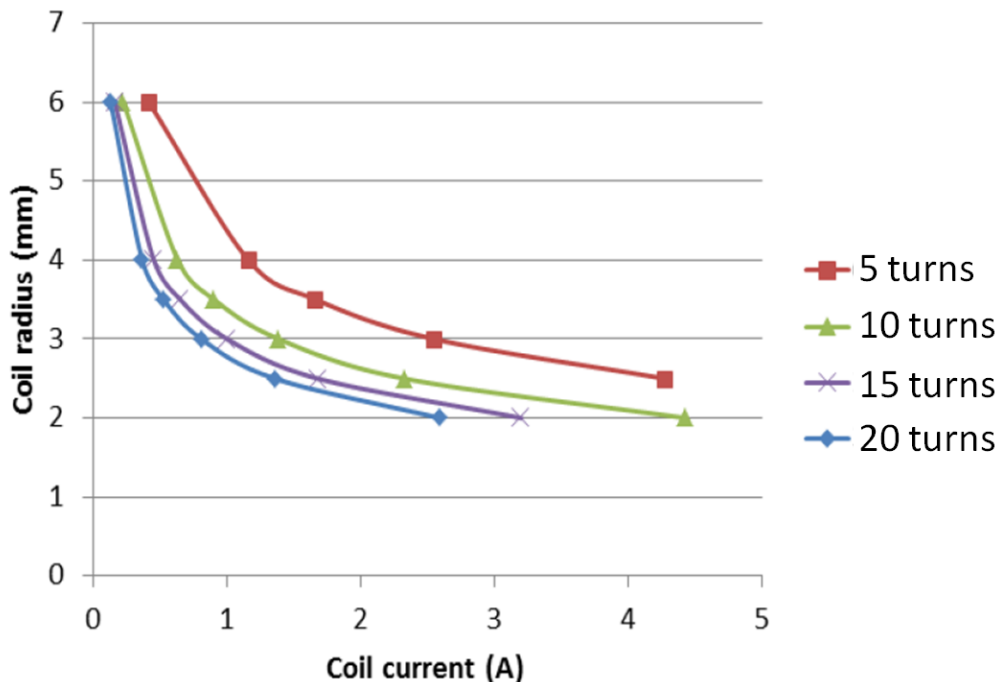


Fig. 4-24 刺激領域の長軸の長さが線維束の直径4.5 mmと一致する条件. 図中の曲線が神経線維束に対して刺激を行なうための条件となる. コイル径や巻き数により, 刺激条件が異なってくることも分かる.

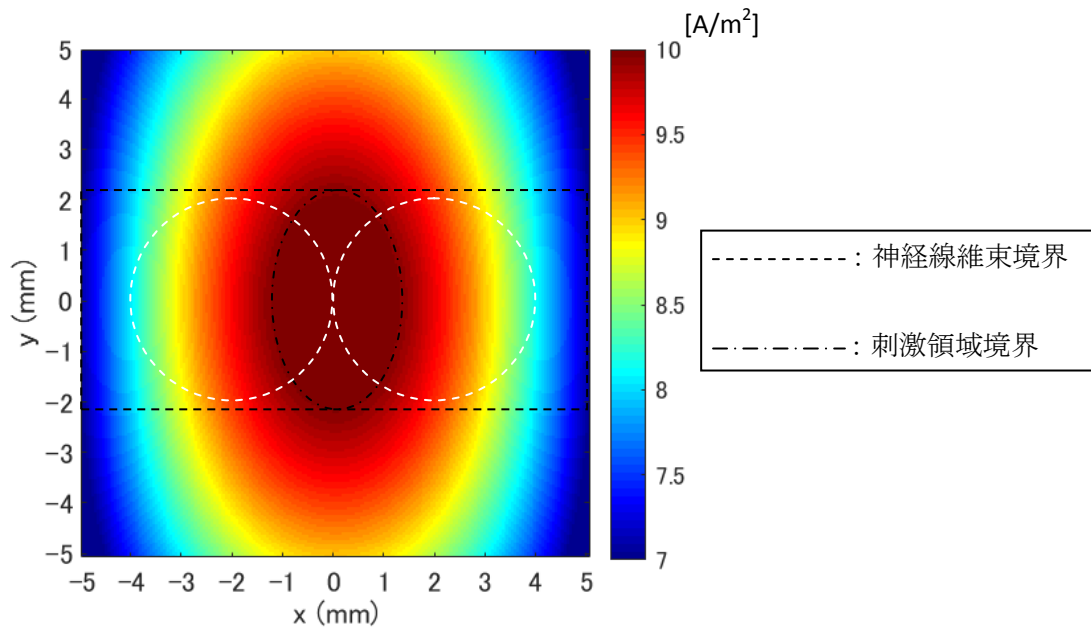


Fig. 4-25 刺激領域の長軸の長さが線維束の直径 4.5 mm と一致する条件下で刺激を行なった時の誘導電流分布 (コイル径 4 mm, 10 回巻き, 電流 0.62 A).

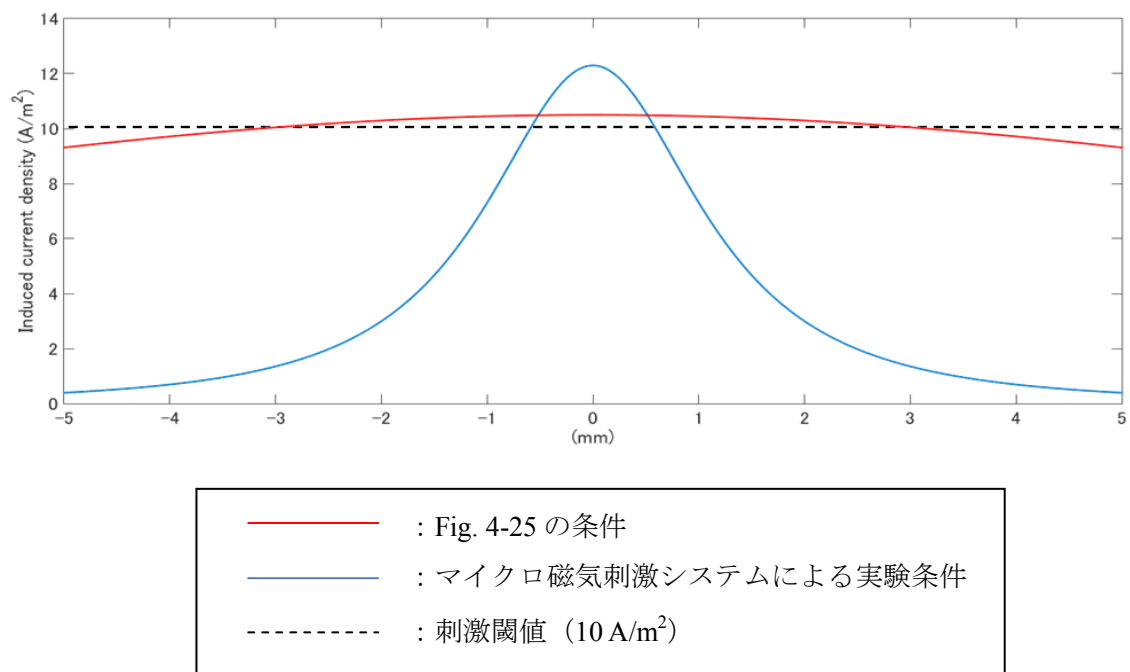


Fig. 4-26 $x=0$ mm に沿った誘導電流分布. マイクロ磁気刺激システムによる実験条件 (コイル径 900 μm , 10 回巻き, 電流 0.69 A, 刺激の標的部 ーコイル間の距離 1 mm) と, Fig. 4-25 の条件 (コイル径 4 mm, 10 回巻き, 電流 0.62 A, 刺激の標的部 ーコイル間の距離 1.5cm) での空間分解能を比較すると, Fig.4-25 の条件では, 実験条件と比べ空間分解能が 5 倍低下する.

Fig. 4-25 の条件での、刺激の標的部一コイル間の距離と刺激領域の長軸の長さの関係を図. 4-27 に示す。深部領域への磁気刺激を考慮した場合、刺激の標的部よりも浅い部位で刺激閾値以上の誘導電流密度が見られるため、距離が近い程、刺激領域が広範囲になることが示される。

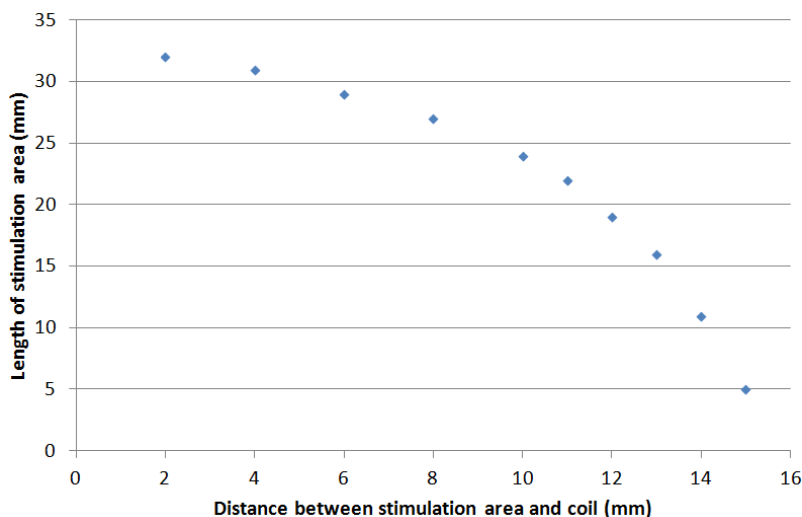


Fig. 4-27 Fig. 4-25 (コイル径 4 mm, 10 回巻き, 電流 0.62 A, 刺激の標的部一コイル間の距離 1.5cm) の条件における、刺激対象一コイル間の距離と刺激領域の長軸の長さの関係。深部領域への磁気刺激を考慮した場合、刺激の標的部よりも浅い部位で刺激閾値以上の誘導電流密度が見られるため、距離が近い程、刺激領域が広範囲になる。

4-4 考察

4-4-1 磁気刺激頻度による神経細胞の活動変化

結果より、磁気刺激終了後の電気活動スパイク数が 10 Hz で刺激を行なった際には増加する傾向があり、1 Hz で刺激を行なった際には大きな変化が見られないことが示され、刺激終了後の電気活動スパイク数の増加率が刺激周波数に依存する結果が示された。Lee らは、マウスの脳スライス内の視床下核に対する微小コイルを使用した磁気刺激を行ない、刺激頻度に依存して神経細胞の電気活動スパイク数が変化することを示した [Lee and Fried 2015]。

刺激周波数を高くするにつれてコイルの温度が上昇するが、本実験では 10 Hz 刺激時において温度上昇 1°C 以内という条件でコイル電流値を設定しているために、温度上昇によるスパイク数の増加の可能性は低い。一方、印加される刺激の時間的加算を考慮すると、10 Hz の条件の方が刺激の積算量が多くなるため、刺激の積算量と刺激効果に相関があることが示唆される。以上の相関関係を明確にするために、1, 5, 10 Hz 以外の刺激周波数による刺激効果を実験により検証する必要がある。

4-4-2 微小コイルの配置による神経細胞の活動変化

誘導電流を神経の走方向に対して垂直方向に印加する 0 deg のコイル配置では刺激中の細胞内 Ca^{2+} 濃度の変動が見られるとともに、刺激終了後のスパイク数が増加する一方、誘導電流を神経の走方向に対して平行方向に印加する 90 deg のコイル配置では刺激終了後の細胞内 Ca^{2+} 濃度の変動が見られず、刺激終了後の電気活動スパイク数が変動しない傾向が見られた。In vivo 研究による先行研究では、ヒトの脳皮質に対する磁気刺激において、刺激コイルの配置を変化させることで、腓腹筋で見られる誘発電位の振幅が変化することが示され [Rotem et al. 2014], in vitro 研究では、ウサギの網膜組織 [Bonmassar et al. 2012]やマウスの脳スライス内の視床下核 [Lee and Fried 2015]に対する磁気刺激においてコイルの配置を変化させた際に、神経細胞の誘発応答数が変化することが示された。

先行研究及び本研究の結果から、神経の走方向に対するコイルの配置は、磁気刺激の効率を変化させる重要なパラメータであることが明らかとなった。本研究で構築したマイクロ磁気刺激システムはコイルの配置による神経活動変化を評価することができるため、今後は、神経軸索の走方向に対しコイルの配置を細かく変化させた際の神経細胞の活動変化を計測するとともに、コンピュータシミュレーションによる誘導電流分布の推定と併せて、最も効率よく刺激ができるコイル配置に関する検討を行なう必要がある。

4-4-3 微小コイルによる磁気刺激の空間分解能評価

培養チャンバ内の異なる微小通路を伸長する神経軸索間で、刺激前後における電気活動の変化を比較した結果、コイル交点から最も近い微小通路内を伸長する神経軸索のスパイク数の増加率が最も高いことが示され、交点から離れるにつれてスパイク数の増加率が低下することが示された。

マイクロ磁気システムによる実験とコンピュータシミュレーションによる理論的な手法により、神経刺激閾値や刺激の空間分解能の推定を行なう点で有用であることが示された。さらに、応用としてコイルの形状や配置の最適化を行なう点でも有用であると考えられる。

システム内における微小通路数が 8 本と限られているために、微小通路間の間隔である 250 μm 毎の大まかな空間分解能の評価しか行なうことができない。正確な空間分解能の評価を行なうために、微小通路数を増加するなどの工夫を行なう必要がある。

4-4-4 生体外からの自律神経刺激の可能性

生体外から自律神経線維束に対する磁気刺激を想定して、深さ 1.5cm を走行する迷走神経刺激への局所的な磁気刺激の可能性をコンピュータシミュレーションにより検討した。

誘導電流密度と刺激の空間分解能は、コイル径及びコイル-刺激部位間の距離に依存することが示された。深部組織に対する局所的な磁気刺激を行う際には、コンピュータシミュレーションによる刺激パラメータの最適化が重要な鍵となる。本実験では、生体モデルとして電氣的性質が均一

な導体を考慮したが、生体組織では形状が複雑で電氣的性質が不均一である。電氣的性質が異なる境界面で電荷が蓄積して、その電荷により2次的な誘導電流成分が生じることから、生体組織内における誘導電流分布は複雑になることが考えられる[Miranda et al. 2003]。そのため、生体外からの磁気刺激を考慮する際には、生体組織に近似したモデルによるシミュレーションを行なうことが必要となる。

4-5 結論

本章では、自律神経系に対する磁気刺激を想定し、高い空間分解能を実現する条件を求める立場から、自律神経線維束を模擬して一方向に伸長させた神経軸索に対して微小コイルを配置、局所的な刺激を行なうマイクロ磁気刺激システムについて、シミュレーションと実験を行なった。実験により、神経軸索に対し垂直方向に誘導電流が流れるコイルの配置が効率的な刺激条件であることが示された。刺激の空間分解能は、コイル径 900 μm 、距離が 1 mm の場合では 1 mm であることが示された。さらに生体外からの自律神経刺激の可能性につき検討し、局所的な刺激を実現する条件を導出した。迷走神経刺激を考慮し、距離が 1.5 cm の領域における空間分解能を評価した。刺激閾値を超える誘導電流密度を発生させるには、コイル径を 4 mm にする必要があり、その時の空間分解能は 5 mm となることから、深部領域における局所的な刺激は難しくなることが示された。

第5章

結論

本章では, 本論文の結論と展望についてまとめた.

5-1 結論

本論文では、自律神経系の活動異常に起因する心房細動に焦点を当て、その発症メカニズム解明と、非侵襲的な心房細動治療技術の確立を目指して必要な要素技術を開発、基礎的な知見を得ることを目的として、以下の3つの課題を設定した。

- (1) 自律神経細胞培養手法の確立と神経回路網としての活動観測
- (2) 交感神経細胞、副交感神経細胞、心筋細胞の3要素から構成される共培養システムの構築
- (3) 自律神経系に対する磁気刺激を想定したマイクロ磁気刺激の設計及び刺激条件の検討

上記3課題について得られた成果は以下の通りである。

(1) 自律神経細胞培養手法の確立と神経回路網としての活動観測

従来採取が技術的に困難とされ、心房表面組織から単離した細胞の72時間の培養が報告されるにとどまっていた副交感神経細胞につき、採取手技、単離プロセス、培養環境の改良により、これまでの4倍以上の副交感神経細胞を含む培養系を3週間維持する技術を確立した。交感神経細胞を含めて免疫組織化学染色を適用し、系に含まれる細胞種を同定した。培養系に維持した交感神経細胞のうちの95%以上がアドレナリン作動性を示し、また副交感神経細胞についても約85%がコリン作動性を示すことが確かめられ、共培養系の構築に向けた要素技術であることが示された。

これまで単一細胞記録にとどまっていた自律神経細胞につき、MEAを用いた細胞外電位計測、蛍光イメージングによる細胞内 Ca^{2+} 濃度計測を適用し、ネットワークとしての活動を観測した。交感神経系、副交感神経系とも節後細胞のみからなる細胞集団が神経回路を形成しており、その自発活動が発達段階に応じて変化することが明らかになった。またシナプス伝達に関与する受容体がnAChRであることを示唆する結果を得た。

(2) 交感神経細胞、副交感神経細胞、心筋細胞の3要素から構成される共培養システムの構築

マイクロ加工技術の利用によりMEA基板上に3つの細胞培養区画を集積化したデバイスを設計・製作し、交感神経細胞、副交感神経細胞、心筋細胞の3要素からなる共培養システムを構築した。心筋細胞の拍動時系列につき評価した結果、自律神経細胞群の自発活動に基づく心筋拍動リズムの変動、交感神経細胞群に対する電気刺激に対応した心筋細胞拍動間隔の短縮、副交感神経細胞群に対する電気刺激に対応した心筋細胞拍動間隔の延長が観測され、アンタゴニスト投与によりこれら全ての変化がブロックされたことから、交感・副交感神経支配を受ける心筋細胞群という*in vitro*系が構築されたことが確認できた。

この系で交感神経細胞群に対して慢性電気刺激を印加、人為的に誘起した活動亢進状態に対する心筋拍動リズムの経時変化を観測した。短時間の刺激と慢性刺激とで刺激終了後の心拍リズム

ム回復傾向が異なり、また慢性刺激後には 60 分間の計測中に 30 秒程度の拍動間隔の急激な短縮（頻脈状態）が見られたことから、自律神経系の変調に起因する心房細動発生メカニズムの解明に向けて有効なモデルシステムであることが示された。

(3) 自律神経系に対する磁気刺激を想定したマイクロ磁気刺激の設計及び刺激条件の検討

自律神経系に対する磁気刺激を想定し、高い空間分解能を実現する条件を求める立場から、自律神経線維束を模擬して一方向に伸長させた神経軸索に対して微小コイルを配置、局所的な刺激を行なうマイクロ磁気刺激システムについて、モデル解析と実験を行なった。神経軸索に対し垂直方向に誘導電流が流れるコイルの配置が効率的な刺激条件であることが示された。刺激の空間分解能は、コイル径 900 μm 、距離が 1 mm の場合では 1 mm であることが示された。

さらに生体外からの自律神経刺激の可能性につき検討し、局所的な刺激を実現する条件を導出した。迷走神経刺激を考慮し、距離が 1.5 cm の領域における空間分解能を評価した。刺激閾値を超える誘導電流密度を発生させるには、コイル径を 4 mm にする必要がある、その時の空間分解能は 5 mm となることから、深部領域における局所的な刺激は難しくなることが示された。

以上から、自律神経系の活動異常に起因する心房細動の発症メカニズム解明に向けて必要な要素技術を開発し、基礎的な知見を得るという研究目的が達成されたと結論する。

5-2 今後の展望

交感神経細胞, 副交感神経細胞, 心筋細胞の3要素から構成される共培養システムが構築されたことから, 今後はこれを利用して自律神経系の活動異常に起因する心房細動の発症メカニズム解明を進めることが第1の課題となる.

今回, 交感神経系の活動亢進状態を1分間誘導した場合と1時間維持した場合では初期状態に復帰する時間経過が異なるという結果が得られた. この活動亢進状態をさらに長時間印加することにより, 最終的には不可逆な変化が誘導されることが想定され, これが永続性の心房細動に関係すると考えられる. 不可逆な変化が誘導される条件を明らかにし, その際に生じる細胞内代謝過程, 受容体などの変化, さらに組織としての器質的な変化につき理解することが心房細動発症メカニズム解明につながると考える. 得られた知見は新たな薬理治療につながることも期待できる.

自律神経系については現時点で未解明の事項が多い. 今回の研究により, 交感神経節, 副交感神経節ともに内部に神経回路を形成しており, 可塑性も含めて情報処理機能を有すること, その変化が心疾患につながる可能性を示唆するデータが得られた. 自律神経系が構成する局所神経経路の構造と役割, 細胞種や伝達物質, 受容体の全容解明に向けて基礎的な検討を続ける必要がある.

さらに長期的な課題として, ストレス応答の結果として生じる自律神経系の変調に焦点を当てた研究, すなわち上位中枢を含めたモデル系の構築によるアプローチがあり得る. 今回構築したシステムは自律神経の構成要素のうち節後細胞のみを扱っている. 節後神経に入力を送る節前神経, その動作を制御するさらに上位の中枢という階層構造からなるのが生体制御システムである. 具体的にはストレス反応において重要な役割を果たすとされる視床下部等を含めた *in vitro* モデルの構築が想定できる.

マイクロ磁気刺激系の利用による有効な神経刺激条件の検討に基づき, 交感神経細胞, 副交感神経細胞, 心筋細胞の3要素から構成される共培養システムにこれを適用した実験も可能になる. 神経線維の配向に対してコイルの配置を最適化し, 侵襲性を生じない範囲で有効な刺激効果を生じかつ実用的な空間分解能を得る条件を明らかにし, これを適用した実験を行なうことにより, 磁気刺激による自律神経機能調節という新たな心疾患治療の可能性が開かれる.

上記各項目の検討を通じて, 日常生活におけるストレスや不規則な生活習慣を通じた自律神経活動の変調に起因する心疾患の発生機序解明, 新たな治療手法開発に向けた研究の発展が期待できる.

謝辞

本研究を進めるにあたり、多くの方々にご指導、ご協力を頂きました。

はじめに、指導教員であり、このような研究の機会を与えていただきました

東京大学大学院 新領域創成科学研究科 人間環境学専攻 神保泰彦 教授

に厚く御礼を申し上げます。

大学院博士課程在籍の3年間におきまして、筆者に対し日々有益なご指導及びご助言を頂き、さらに研究者としての心構えなど、本当に多くのことを学ばせて頂きました。

学位論文の審査にあたり、多くのご助言及びご指導を頂きました

東京大学大学院 新領域創成科学研究科 人間環境学専攻 鳥居徹 教授

東京大学大学院 生産技術研究所 金範俊 教授

東京大学大学院 工学系研究科 精密工学専攻 小林英津子 准教授

東京大学 先端科学技術研究センター 小谷潔 准教授

に厚く御礼申し上げます。

学部及び大学院修士課程在籍時に、研究の進め方や学術論文執筆におきまして多くのご助言を頂きました

鹿児島大学大学院 理工学研究科 情報生体システム工学専攻 湯ノ口万友 教授

に厚く御礼申し上げます。

本研究を進めるにあたり、多くの実験技術をご指導頂き、研究の相談にも快く引き受けて下さりました

独立行政法人 医薬品医療機器総合機構 武内彬正 氏

一般財団法人 電力中央研究所 齋藤淳史 氏

株式会社 日立製作所 沼田崇志 氏

に厚く御礼申し上げます。

また、神保・小谷研究室の先輩、同輩、後輩の皆様には、多くの場面におきましてご協力を頂きました。特に、同輩である榛葉健太君には、筆者が研究室に参加する以前から生活面や研究面において多くの助言を頂きました。

最後に、筆者の研究生活及び学生生活を、遠くから支えてくれた筆者の家族に心より感謝致します。

2016年2月10日

大岩 孝輔

参考文献

[Agarwal et al. 2013]

Agarwal A, Goss JA, Cho A, McCain ML and Parker KK, “Microfluidic heart on a chip for higher throughput pharmacological studies”, *Lab on a Chip*, 2013, **13**, 18, 3599-3608

[Amendola et al. 2015]

Amendola J, Boumedine N, Sangiardi M and El Far O, “Optimization of neuronal cultures from rat superior cervical ganglia for dual patch recording”, *Scientific Reports*, 2015, **5**, 14455

[Armour 2004]

Armour JA, ”Cardiac neuronal hierarchy in health and disease”, *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, 2004, **287**, 2, R262–R271

[Arsic et al. 2008]

Arsic N, Mamaeva D, Lamb NJ and Fernandez A, “Muscle-derived stem cells isolated as non-adherent population give rise to cardiac, skeletal muscle and neural lineages”, *Experimental Cell Research*, 2008, **314**, 6, 1266-1280

[Atwood et al. 1987]

Atwood JE, Sullivan M, Forbes S, Myers J, Pewen W, Olson HG and Froelicher, VF, “Effect of beta-adrenergic blockade on exercise performance in patients with chronic atrial fibrillation”, *Journal of the American College of Cardiology*, 1987, **10**, 2, 314-320

[Bamber et al. 1994]

Bamber BA, Masters BA, Hoyle GW, Brinster RL and Palmiter RD, “Leukemia inhibitory factor induces neurotransmitter switching in transgenic mice”, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 1994, **91**, 17, 7839-7843

[Barker et al. 1985]

Barker AT, Jalinous R and Freeston IL, “Non-invasive magnetic stimulation of human motor cortex”, *The Lancet*, 1985, **325**, 8437, 1106-1107

[Bénardeau et al. 2001]

Bénardeau A, Fareh S and Nattel S, “Effects of verapamil on atrial fibrillation and its electrophysiological determinants in dogs”, *Cardiovascular Research*, 2001, **50**, 1, 85-96

[Benninger et al. 2011]

Benninger DH, Berman BD, Houdayer E, Pal N, Luckenbaugh DA, Schneider L, Miranda S and Hallett M, "Intermittent theta-burst transcranial magnetic stimulation for treatment of Parkinson disease", *Neurology*, 2011, **76**, 7, 601-609

[Benjamin et al. 1998]

Benjamin EJ, Wolf PA, D'Agostino RB, Silbershatz H, Kannel WB and Levy D, "Impact of atrial fibrillation on the risk of death : the Framingham Heart Study", *Circulation*, 1998, **98**, 10, 946-952

[Binkley et al. 1991]

Binkley PF, Nunziata E, Haas GJ, Nelson SD and Cody RJ, "Parasympathetic withdrawal is an integral component of autonomic imbalance in congestive heart failure: demonstration in human subjects and verification in a paced canine model of ventricular failure", *Journal of the American College of Cardiology*, 1991, **18**, 2, 464-472

[Black et al. 1964]

Black JW, Crowther AF, Shanks RG, Smith LH and Dornhorst AC, "A new adrenergic: beta-receptor antagonist", *The Lancet*, 1964, **283**, 7342, 1080-1081

[Bonmassar et al. 2012]

Bonmassar G, Lee SW, Freeman DK, Polasek M, Fried SI and Gale JT, "Microscopic magnetic stimulation of neural tissue", *Nature Communications*, 2012, **3**, 921

[Bonner et al. 1987]

Bonner TI, Buckley NJ, Young AC and Brann MR, "Identification of a family of muscarinic acetylcholine receptor genes", *Science*, 1987, **237**, 4814, 527-532

[Bonner et al. 1988]

Bonner TI, Young AC, Bran MR and Buckley NJ, "Cloning and expression of the human and rat m5 muscarinic acetylcholine receptor genes", *Neuron*, 1988, **1**, 5, 403-410

[Braam et al. 2010]

Braam SR, Tertoolen L, van de Stolpe A, Meyer T, Passier R and Mummery CL, "Prediction of drug-induced cardiotoxicity using human embryonic stem cell-derived cardiomyocytes", *Stem Cell Research*, 2010, **4**, 2, 107-116

[Brodde 1991]

Brodde OE, "Beta 1- and beta 2-adrenoceptors in the human heart: properties,function, and alterations in chronic heart failure", *Pharmacological Reviews*, 1991, **43**, 2, 203-242

[Brodde 1993]

Brodde OE, "Beta-adrenoceptors in cardiac disease", *Pharmacology & Therapeutics*, 1993, **60**, 3, 405-430

[Brum et al. 2006]

Brum PC, Hurt CM, Shcherbakova OG, Kobilka B and Angelotti T, "Differential targeting and function of α 2A and α 2C adrenergic receptor subtypes in cultured sympathetic neurons", *Neuropharmacology*, 2006, **51**, 3, 397-413

[Buj-Bello et al. 1995]

Buj-Bello A, Buchman VL, Horton A, Rosenthal A and Davies A M, "GDNF is an age-specific survival factor for sensory and autonomic neurons", *Neuron*, 1995, **15**, 4, 821-828

[Chen and Miller 1997]

Chen E and Miller GE, "Stress and inflammation in exacerbations of asthma", *Brain, Behavior, and Immunity*, 2007, **21**, 8, 993-999

[Chiou et al. 1997]

Chiou CW, Eble JN and Zipes DP, "Efferent vagal innervation of the canine atria and sinus and atrioventricular nodes the third fat pad", *Circulation*, 1997, **95**, 11, 2573-2584

[Clarence et al. 1934]

Clarence E, Graef I and Rottino A, "Studies in rheumatic heart disease: An analysis of 119 hearts with special reference to the relationship of auricular fibrillation to mitral valvular deformity and certain rheumatic tissue changes", *American Heart Journal*, 1934, **10**, 1, 62-78

[Conen and Albert 2011]

Conen D and Albert CM, "Alcohol consumption and risk of atrial fibrillation", *Journal of the American College of Cardiology*, 2011, **57**, 25, 2545-2545

[Cortez et al. 2003]

Cortez C, Costa WS, Babinski MA and Chagas MA, “Morphometrical and Stereological Analysis of the Superior Cervical Glanglion of Rattus norvegicus submitted to Chronic treatment with Cortisol”, *International Journal of Morphology*, 2003, **21**, 211-226

[Coumel 1994]

Coumel P, “Autonomic arrhythmogenic factors in paroxysmal atrial fibrillation”, *Atrial Fibrillation: Mechanisms and Therapeutic Strategies*, 1994, 171-185

[de Luna et al. 1989]

de Luna AB, Coumel P and Leclercq JF, “Ambulatory sudden cardiac death: mechanisms of production of fatal arrhythmia on the basis of data from 157 cases”, *American Heart Journal*, 1989, **117**, 1, 151-159

[Deng et al. 2013]

Deng ZD, Lisanby SH and Peterchev AV, “Electric field depth-focality tradeoff in transcranial magnetic stimulation: simulation comparison of 50 coil designs”, *Brain stimulation*, 2013, **6**, 1, 1-13

[Dublin et al. 2006]

Dublin S, French B, Glazer NL, Wiggins KL, Lumley T, Psaty BM, Smith NL and Heckbert SR, “Risk of new-onset atrial fibrillation in relation to body mass index”, *Archives of Internal Medicine*, 2006, **166**, 21, 2322-2328

[Dvorakova et al. 2008]

Dvorakova MC, Wiegand S, Pesta M, Slavikova J, Grau V, Reischig J, Grau V, Reischig J, Kuncova J and Kummer W, “Expression of neuropeptide Y and its receptors Y1 and Y2 in the rat heart and its supplying autonomic and spinal sensory ganglia in experimentally induced diabetes”, *Neuroscience*, 2008, **151**, 4, 1016-1028

[Emorine et al. 1989]

Emorine LJ, Marullo S, Briend-Sutren MM, Patey G, Tate K, Delavier-Klutchko C and Strosberg AD, “Molecular characterization of the human beta 3-adrenergic receptor”, *Science*, 1989, **245**, 4922, 1118-1121

[Fernandez and Canty 2015]

Fernandez SF and Canty JM, “Adrenergic and Cholinergic Plasticity in Heart Failure”, *Circulation Research*, 2015, **116**, 10, 1639-1642

[Fieber and Adams 1991]

Fieber LA and Adams DJ, “Acetylcholine-evoked currents in cultured neurones dissociated from rat parasympathetic cardiac ganglia”, *The Journal of Physiology*, 1991, **434**, 215

[Fransson et al. 2015]

Fransson EI, Stadin M, Nordin M, Malm D, Knutsson A, Alfredsson L and Westerholm PJ, “The Association between Job Strain and Atrial Fibrillation: Results from the Swedish WOLF Study”, *BioMed Research International*, 2015, **2015**, 1-7

[Fried et al. 1978]

Fried G, Lagercrantz H and Ho T, “Improved isolation of small noradrenergic vesicles from rat seminal ducts following castration. A density gradient centrifugation and morphological study”, *Neuroscience*, 1978, **3**, 12, 1271-1291

[Frost et al. 2005]

Frost L, Hune LJ and Vestergaard P, “Overweight and obesity as risk factors for atrial fibrillation or flutter: the Danish Diet, Cancer, and Health Study”, *The American Journal of Medicine*, 2005, **118**, 5, 489-495

[Fukada 1980]

Fukada K, “Hormonal control of neurotransmitter choice in sympathetic neurone cultures”, *Nature*, 1980, **287**, 5782, 553-555

[Fuster et al. 2011]

Fuster V, Rydén LE., Cannom DS, Crijns HJ, Curtis AB, Ellenbogen KA., Halperin JL, Kay GN, Le Huezey JY, Lowe JE, Olsson SB, Prystowsky EN, Tamargo JL and Wann LS, “2011 ACCF/AHA/HRS focused updates incorporated into the ACC/AHA/ESC 2006 Guidelines for the management of patients with atrial fibrillation: a report of the American College of Cardiology Foundation/American Heart Association Task Force on Practice Guidelines developed in partnership with the European Society of Cardiology and in collaboration with the European Heart Rhythm Association and the Heart Rhythm Society”, *Journal of the American College of Cardiology*, 2011, **57**, 11, e101-e198

[George et al. 2010]

George MS, Lisanby SH, Avery D, McDonald WM, Durkalski V, Pavlicova M, Anderson B, Nahas Z, Bulow P, Zarkowski P, Holtzheimer PE Schwartz T and Sackeim HA, “Daily left prefrontal transcranial magnetic stimulation therapy for major depressive disorder: a sham-controlled randomized trial”, *Archives of General Psychiatry*, 2010, 67, 5, 507-516

[Germack and Dickenson 2006]

Germack R and Dickenson JM, “Induction of β 3-adrenergic receptor functional expression following chronic stimulation with noradrenaline in neonatal rat cardiomyocytes”, *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 2006, **316**, 1, 392-402

[Go et al. 2001]

Go AS, Hylek EM, Phillips KA, Chang Y, Henault LE, Selby JV and Singer DE, “Prevalence of diagnosed atrial fibrillation in adults: national implications for rhythm management and stroke prevention: the AnTicoagulation and Risk Factors in Atrial Fibrillation (ATRIA) Study”, *Jama*, 2001, **285**, 18, 2370-2375

[Goldhaber et al. 2005]

Goldhaber JI, Xie LH, Duong T, Motter C, Khuu K and Weiss JN, “Action potential duration restitution and alternans in rabbit ventricular myocytes the key role of intracellular calcium cycling”, *Circulation Research*, 2005, **96**, 4, 459-466

[Grosberg et al. 2011]

Grosberg A, Alford PW, McCain ML and Parker KK, “Ensembles of engineered cardiac tissues for physiological and pharmacological study: heart on a chip”, *Lab on a Chip*, 2011, **11**, 24, 4165-4173

[Haïssaguerre et al. 1998]

Haïssaguerre M, Jaïs P, Shah DC, Takahashi A, Hocini M, Quiniou G, Garrigue S, Mouroux AL, Métayer PL and Clémenty J, “Spontaneous initiation of atrial fibrillation by ectopic beats originating in the pulmonary veins”, *New England Journal of Medicine*, 1998, **339**, 10, 659-666

[Haïssaguerre et al. 2000]

Haïssaguerre M, Jaïs P, Shah DC, Garrigue S, Takahashi A, Lavergne T, Hocini M, Peng JT, Roudaut R and Clémenty J, “Electrophysiological end point for catheter ablation of atrial fibrillation initiated from multiple pulmonary venous foci”, *Circulation*, 2000, **101**, 12, 1409-1417

[Hammer et al. 2015]

Hammer N, Glätzner J, Feja C, Kühne C, Meixensberger J, Planitzer U, Schleifenbaum S, Tillmann BN and Winkler D, “Human vagus nerve branching in the cervical region”, *PloS One*, 2015, 10, 2, e0118006.

[Hammer et al. 1980]

Hammer R, Berrie CP, Birdsall NJM, Burgen ASV and Hulme EC, “Pirenzepine distinguishes between different subclasses of muscarinic receptors”, *Nature*, 1980, **293**, 90-92

[Hassall and Burnstock 1986]

Hassall CJS and Burnstock G, “Intrinsic neurones and associated cells of the guinea-pig heart in culture”, *Brain Research*, 1986, **364**, 1, 102-113

[Hassall et al. 1988]

Hassall CJS, Wharton J, Gulbenkian S, Anderson JV, Frater J, Bailey DJ, Merighi A, Bloom SR, Polak JM and Burnstock G, “Ventricular and atrial myocytes of newborn rats synthesise and secrete atrial natriuretic peptide in culture: Light-and electron-microscopical localisation and chromatographic examination of stored and secreted molecular forms”, *Cell and Tissue Research*, 1988, **251**, 1, 161-169

[He et al. 2013a]

He B, Lu Z, He W, Huang B and Jiang H, “Similar effects of vagus nerve stimulation and atrial ganglionated plexi stimulation on ventricular effective refractory period and action potential duration in canine”, *International Journal of Cardiology*, 2013, **168**, 5, 5116-5118

[He et al. 2013b]

He B, Lu Z, He W, Wu L, Cui B, Hu X, Yu L, Huang C and Jiang, H, “Effects of ganglionated plexi ablation on ventricular electrophysiological properties in normal hearts and after acute myocardial ischemia”, *International Journal of Cardiology*, 2013, **168**, 1, 86-93

[He et al. 2015]

He LL, Zhang QF, Wang LC, Dai JX, Wang CH, Zheng LH and Zhou Z, “Muscarinic inhibition of nicotinic transmission in rat sympathetic neurons and adrenal chromaffin cells”, *Philosophical Transactions of the Royal Society of London B: Biological Sciences*, 2015, **370**, 1672, 20140188

[Heredia et al. 2005]

Heredia MDP, Delgado C, Pereira L, Perrier R, Richard S, Vassort G, Bénitah JP and Gómez AM, “Neuropeptide Y rapidly enhances $[Ca^{2+}]_i$ transients and Ca^{2+} sparks in adult rat ventricular myocytes through Y_1 receptor and PLC activation”, *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, 2005, **38**, 1, 205-212

[Herring et al. 2012]

Herring N, Cranley J, Lokale MN, Li D, Shanks J, Alston EN, Girard BM, Carter E, Parsons RL, Habecker BA and Paterson DJ, “The cardiac sympathetic co-transmitter galanin reduces acetylcholine release and vagal bradycardia: implications for neural control of cardiac excitability”, *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, 2012, **52**, 3, 667–676

[Hirayama et al. 2015]

Hirayama M, Ogata M, Kawamata T and Ishibashi H, “Muscarinic receptor-mediated excitation of rat intracardiac ganglion neurons”, *Neuropharmacology*, 2015, **95**, 395-404

[Hirota et al. 2004]

Hirota H, Izumi M, Hamaguchi T, Sugiyama S, Murakami E, Kunisada K, Fujio Y, Oshima Y, Nakaoka Y and Yamauchi-Takahara K, “Circulating interleukin-6 family cytokines and their receptors in patients with congestive heart failure”, *Heart and Vessels*, 2004, **19**, 5, 237-241

[Hiwaki and Kuwano 2002]

Hiwaki O and Kuwano H, “Estimation of threshold for peripheral nerve excitation in respect of geometry of figure-of-eight coil in magnetic nerve stimulation”, *IEICE Transactions on Information and Systems*, 2002, **85**, 1, 184-189

[Hoard et al. 2007]

Hoard JL, Hoover DB and Wondergem R, “Phenotypic properties of adult mouse intrinsic cardiac neurons maintained in culture”, *American Journal of Physiology-Cell Physiology*, 2007, **293**, 6, C1875-C1883

[Hoover et al. 2009]

Hoover DB, Isaacs ER, Jacques F, Hoard JL, Page P and Armour JA, “Localization of multiple neurotransmitters in surgically derived specimens of human atrial ganglia”, *Neuroscience*, 2009, **164**, 3, 1170-1179

[Huang et al. 2014]

Huang J, Qian J, Yao W, Wang N, Zhang Z, Cao C, Song B and Zhang Z, “Vagus nerve stimulation reverses ventricular electrophysiological changes induced by hypersympathetic nerve activity”, *Experimental Physiology*, 2014, **6**, 239–248

[Hutter and Trautwein 1956]

Hutter OF and Trautwein W, “Vagal and sympathetic effects on the pacemaker fibers in the sinus venosus of the heart”, *The Journal of General Physiology*, 1956, **39**, 5, 715-733

[Jassen et al. 2015]

Janssen AM, Oostendorp TF and Stegeman DF, “The coil orientation dependency of the electric field induced by TMS for M1 and other brain areas”, *Journal of Neuroengineering and Rehabilitation*, 2015, **12**, 1, 47

[Jimbo et al. 2003]

Jimbo Y, Kasai N, Torimitsu K, Tateno T and Robinson HP, “A system for MEA-based multisite stimulation”, *IEEE Transactions on Biomedical Engineering*, 2003, **50**, 2, 241-248

[Jobling and Gibbins 1999]

Jobling P and Gibbins IL, “Electrophysiological and morphological diversity of mouse sympathetic neurons”, *Journal of Neurophysiology*, 1999, **82**, 5, 2747-2764

[Jonsson-Rylander et al. 2003]

Jonsson-Rylander AC, Nordlander M, Svindland A and Ilebekk A, “Distribution of neuropeptide Y Y1 and Y2 receptors in the postmortem human heart”, *Peptides*, 2003, **24**, 2, 255-262

[Kanazawa et al. 2010]

Kanazawa H, Ieda M, Kimura K, Arai T, Kawaguchi-Manabe H, Matsuhashi T, Endo J, Sano M, Kawakami T, Kimura T, Monkawa T, Hayashi M, Iwanami A, Okano H, Okada Y, Ishibashi-Ueda H, Ogawa S and Fukuda T, “Heart failure causes cholinergic transdifferentiation of cardiac sympathetic nerves via gp130-signaling cytokines in rodents”, *The Journal of Clinical Investigation*, 2010, **120**, 2, 408-421

[Kanitz et al. 1990]

Kanitz DD, Ebert TJ and Kampine JP, “Intraoperative use of bolus doses of esmolol to treat tachycardia”, *Journal of Clinical Anesthesia*, 1990, **2**, 4, 238-242

[Kaumann and Molenaar 1997]

Kaumann AJ and Molenaar P, "Modulation of human cardiac function through 4 beta-adrenoceptor populations", *Naunyn-Schmiedeberg's Archives Pharmacology*, 1997, **355**, 6, 667-681

[Kim et al. 1997]

Kim YH, Garfinkel A, Ikeda T, Wu TJ, Athill CA, Weiss JN, Karagueuzian HS and Chen PS, "Spatiotemporal complexity of ventricular fibrillation revealed by tissue mass reduction in isolated swine right ventricle. Further evidence for the quasiperiodic route to chaos hypothesis", *Journal of Clinical Investigation*, 1997, **100**, 10, 2486-2500

[Kummer 1987]

Kummer W, "Galanin-and neuropeptide Y-like immunoreactivities coexist in paravertebral sympathetic neurones of the cat", *Neuroscience Letters*, 1987, **78**, 2, 127-131

[Lai et al. 2012]

Lai Y, Cheng K and Kisaalita W, "Three dimensional neuronal cell cultures more accurately model voltage gated calcium channel functionality in freshly dissected nerve tissue", *PloS One*, 2012, **7**, 9, e45074

[Lands et al. 1967]

Lands AM, Arnold A, McAuliff JP, Ludaena FP and Brown TG "Differentiation of receptor systems activated by sympathomimetic amines", *Nature*, 1967, **214**: 597-598

[Langer 1974]

Langer SZ, "Presynaptic regulation of catecholamine release", *Biochemical Pharmacology*, 1974, **23**, 13, 1793-1800

[Langley 1898]

Langley JN, "On the union of cranial autonomic (visceral) fibres with the nerve cells of the superior cervical ganglion", *The Journal of Physiology*, 1898, **23**, 3, 240-270

[Larsson et al. 2014]

Larsson SC, Drea N and Wolk A, "Alcohol consumption and risk of atrial fibrillation: a prospective study and dose-response meta-analysis", *Journal of the American College of Cardiology*, 2014, **64**, 3, 281-289

[Lee and Fried 2015]

Lee SW and Fried S, “Suppression of Subthalamic Nucleus Activity by Micromagnetic Stimulation”, *IEEE Transactions on Neural Systems and Rehabilitation Engineering*, 2015, **23**, 1, 116-127

[Lee et al. 2001]

Lee MH, Qu Z, Fishbein GA, Lamp ST, Chang EH, Ohara T, Voroshilovsky O, Kil JR, Hamzei AR, Wang NC, Lin SF, Weiss JN, Garfinkel A, Karagueuzian HS and Chen PS, “Patterns of wave break during ventricular fibrillation in isolated swine right ventricle”, *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology*, 2001, **281**, 1, H253-H265

[Levy and Zieske 1969]

Levy MN and Zieske H, “Autonomic control of cardiac pacemaker activity and atrioventricular transmission”, *Journal of Applied Physiology*, 1969, **27**, 4, 465-470

[Luther et al. 2013]

Luther JA, Enes J and Birren SJ, “Neurotrophins regulate cholinergic synaptic transmission in cultured rat sympathetic neurons through a p75-dependent mechanism”, *Journal of Neurophysiology*, 2013, **109**, 2, 485-496

[Mackenzie et al. 2001]

Mackenzie L, Bootman, MD, Berridge MJ and Lipp P, “Predetermined recruitment of calcium release sites underlies excitation contraction coupling in rat atrial myocytes”, *The Journal of Physiology*, 2001, **530**, 3, 417-429

[Malliani et al. 1994]

Malliani A, Pagani M and Lombardi F, “Methods for assessment of sympatho-vagal balance: power spectral analysis”, *Vagal Control of the Heart: Experimental Basis and Clinical Implications*, 1994, **7**, 433-454

[McCully et al. 2013]

McCully BH, Hasan W, Streiff CT, Houle JC, Woodward WR, Giraud GD, Brooks VL and Habecker BA, “Sympathetic cardiac hyperinnervation and atrial autonomic imbalance in diet-induced obesity promote cardiac arrhythmias”, *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology*, 2013, **305**, 10, H1530-H1537

[McGirr et al. 2015]

McGirr A, Van den Eynde F, Tovar-Perdomo S, Fleck MP and Berlim MT, “Effectiveness and acceptability of accelerated repetitive transcranial magnetic stimulation (rTMS) for treatment-resistant major depressive disorder: An open label trial”, *Journal of Affective Disorders*, 2015, **173**, 216-220

[McMichael 1982]

McMichael J, “History of atrial fibrillation 1628-1819 Harvey-de Senac-Laennec”, *British Heart Journal*, 1982, **48**, 3, 193-197

[Miranda et al. 2003]

Miranda PC, Hallett M and Basser PJ, “The electric field induced in the brain by magnetic stimulation: a 3-D finite-element analysis of the effect of tissue heterogeneity and anisotropy”, *IEEE Transactions on Biomedical Engineering*, 2003, **50**, 9, 1074-1085

[Nagayama et al. 2015]

Nagayama T, Hirooka Y, Kishi T, Mukai Y, Inoue S, Takase S Takemoto M, Chishaki A and Sunagawa, K, “Blockade of Brain Angiotensin II Type 1 Receptor Inhibits the Development of Atrial Fibrillation in Hypertensive Rats”, *American Journal of Hypertension*, 2015, **28**, 4, 444-451

[Natarajan et al. 2011]

Natarajan A, Stancescu M, Dhir V, Armstrong C, Sommerhage F, Hickman JJ and Molnar P, “Patterned cardiomyocytes on microelectrode arrays as a functional, high information content drug screening platform”, *Biomaterials*, 2011, **32**, 18, 4267-4274

[Nelson et al. 1993]

Nelson PG, Fields RD, Yu C and Liu Y, “Synapse elimination from the mouse neuromuscular junction in vitro: A non-hebbian activity-dependent process”, *Journal of Neurobiology*, 1993, **24**, 11, 1517-1530

[Olshansky et al. 2008]

Olshansky B, Sabbah HN, Hauptman PJ and Colucci WS, “Parasympathetic nervous system and heart failure pathophysiology and potential implications for therapy”, *Circulation*, 2008, **118**, 8, 863-871.

[Omichi et al. 2004]

Omichi C, Lamp ST, Lin SF, Yang J, Baher A, Zhou S, Attin M, Lee MH, Karagueuzian HS, Kogan B, Qu Z, Garfinkel A, Chen PS and Weiss JN, “Intracellular Ca dynamics in ventricular fibrillation”, *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology*, 2004, **286**, 5, H1836-H1844

[Oral et al. 2002]

Oral H, Knight BP, Özaydın M, Chugh A, Lai SW, Scharf C, Hassan S, Greenstein R, Han JD, Pelosi FJ, Strickberger SA and Morady F, “Segmental ostial ablation to isolate the pulmonary veins during atrial fibrillation feasibility and mechanistic insights”, *Circulation*, 2002, **106**, 10, 1256-1262

[Pan et al. 2015]

Pan L, Alagapan S, Franca E, Leondopoulos SS, DeMarse TB, Brewer GJ and Wheeler BC, “An *in vitro* method to manipulate the direction and functional strength between neural populations”, *Frontiers in Neural Circuits*, 2015, **9**, 32

[Park et al. 2013]

Park HJ, Bonmassar G, Kaltenbach JA, Machado AG, Manzoor NF and Gale JT, “Activation of the central nervous system induced by micro-magnetic stimulation”, *Nature Communications*, 2013, **4**, 1-9

[Park et al. 2009]

Park J, Koito H, Li J and Han A, “Microfluidic compartmentalized co-culture platform for CNS axon myelination research”, *Biomedical Microdevices*, 2009, **11**, 6, 1145-1153

[Patterson and Chun 1974]

Patterson PH and Chun LL, “The influence of non-neuronal cells on catecholamine and acetylcholine synthesis and accumulation in cultures of dissociated sympathetic neurons”, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 1974, **71**, 9, 3607-3610

[Potter 1987]

Potter E, “Presynaptic inhibition of cardiac vagal postganglionic nerves by neuropeptide Y”, *Neuroscience Letters*, 1987, **83**, 1, 101-106

[Randhawa et al. 2013]

Randhawa BK, Farley BG and Boyd LA, “Repetitive transcranial magnetic stimulation improves handwriting in Parkinson’s disease”, *Parkinson’s Disease*, **2013**, 751925

[Rodefeld et al. 1996]

Rodefeld MD, Beau SL, Schuessler RB, Boineau JP and Saffitz JE, "Beta-adrenergic and muscarinic cholinergic receptor densities in the human sinoatrial node: identification of a high beta 2-adrenergic receptor density", *Journal of Cardiovascular*, 1996, **7**, 11, 1039-1049

[Rotem et al. 2014]

Rotem A, Neef A, Neef NE, Agudelo-Toro A, Rakhmilevitch D, Paulus W and Moses E, "Solving the orientation specific constraints in transcranial magnetic stimulation by rotating fields", *PloS one*, 2014, **9**, 2, e86794.

[Ruohonen et al. 1997]

Ruohonen J, Virtanen J and Ilmoniemi RJ, "Coil optimization for magnetic brain stimulation", *Annals of Biomedical Engineering*, 1997, **25**, 5, 840-849

[Schauerte et al. 1999]

Schauerte P, Scherlag BJ, Scherlag MA, Goli S, Jackman WM and Lazzara R, "Ventricular rate control during atrial fibrillation by cardiac parasympathetic nerve stimulation: a transvenous approach", *Journal of the American College of Cardiology*, 1999, **34**, 7, 2043-2050

[Seabrook et al. 1990]

Seabrook GR, Fieber LA and Adams DJ, "Neurotransmission in neonatal rat cardiac ganglion in situ", *The American Physiological Society*, 1990, **259**, 4, H997-H1005

[Sergent-Tanguy et al. 2003]

Sergent-Tanguy S, Chagneau C, Neveu I and Naveilhan P, "Fluorescent activated cell sorting (FACS): a rapid and reliable method to estimate the number of neurons in a mixed population", *Journal of Neuroscience Methods*, 2003, **129**, 1, 73-79

[Shen et al. 2011]

Shen MJ, Shinohara T, Park HW, Frick K, Ice DS, Choi EK, Han S, Maruyama M, Sharma R, Shen C, Fishbein MC, Chen LS, Lopshire JC, Zipes DP, Lin SF and Chen PS "Continuous low-level vagus nerve stimulation reduces stellate ganglion nerve activity and paroxysmal atrial tachyarrhythmias in ambulatory canines", *Circulation*, 2011, **123**, 20, 2204-2212

[Shtukmaster et al. 2013]

Shtukmaster S, Schier MC, Huber K, Krispin S, Kalcheim C and Unsicker K, “Sympathetic neurons and chromaffin cells share a common progenitor in the neural crest *in vivo*”, *Neural Development*, 2013, **8**, 12, 1-7

[Singh et al. 2014]

Singh JP, Kandala J and Camm AJ, “Non-pharmacological modulation of the autonomic tone to treat heart failure”, *European Heart Journal*, 2014, **35**, 2, 77-85

[Singh et al. 2013]

Singh S, Sayers S, Walter JS, Thomas D, Dieter RS, Nee LM and Wurster RD, “Hypertrophy of neurons within cardiac Ganglia in human, canine, and rat heart failure: the potential role of nerve growth factor”, *Journal of the American Heart Association*, 2013, **2**, 4, e000210

[Smith-White et al. 2002]

Smith-White MA, Herzog H and Potter EK, “Role of neuropeptide Y Y2 receptors in modulation of cardiac parasympathetic neurotransmission”, *Regulatory Peptides*, 2002, **103**, 2, 105-111

[Spitzer 2015]

Spitzer N C, “Neurotransmitter switching? No surprise”, *Neuron*, 2015, **86**, 5, 1131-1144

[Stancescu et al. 2015]

Stancescu M, Molnar P, McAleer CW, McLamb W, Long CJ, Oleaga C, Prot JM and Hickman JJ, “A phenotypic in vitro model for the main determinants of human whole heart function”, *Biomaterials*, 2015, **60**, 20-30

[Stanke et al. 2006]

Stanke M, Duong CV, Pape M, Geissen M, Burbach G, Deller T, Gascan H, Parlato R, Schütz G and Rohrer H, “Target-dependent specification of the neurotransmitter phenotype: cholinergic differentiation of sympathetic neurons is mediated in vivo by gp130 signaling”, *Development*, 2006, **133**, 1, 141-150

[Takeuchi et al. 2011]

Takeuchi A, Nakafutami S, Tani H, Mori M, Takayama Y, Moriguchi H, Kotani K, Miwa K, Lee JK, Noshiro M and Jimbo Y, *Lab Chip*, 2011, **11**, 2268-2275

[Tan et al. 2008]

Tan AY, Zhou S, Ogawa M, Song J, Chu M, Li H, Fishbein MC, Lin SF, Chen LS and Chen PS, “Neural mechanisms of paroxysmal atrial fibrillation and paroxysmal atrial tachycardia in ambulatory canines”, *Circulation*, 2008, **118**, 9, 916-925

[Torén et al. 2015]

Torén K, Schiöler L, Söderberg M, Giang KW and Rosengren A, “The association between job strain and atrial fibrillation in Swedish men”, *Occupational and Environmental Medicine*, 2015, **72**, 177-180

[Thielscher et al. 2011]

Thielscher A, Opits A and Windhoff M, “Impact of the gyral geometry on the electric field induced by transcranial magnetic stimulation”, *Neuroimage*, 2011, **54**, 1, 234-243

[Triposkiadis et al. 2009]

Triposkiadis F, Karayannis G, Giamouzis G, Skoularigis J, Louridas G and Butler J, “The sympathetic nervous system in heart failure: physiology, pathophysiology, and clinical implications”, *Journal of the American College of Cardiology*, 2009, **54**, 19, 1747-1762

[Ueno et al. 1988]

Ueno S, Tashiro T and Harada K, “Localized stimulation of neural tissues in the brain by means of a paired configuration of time-varying magnetic fields”, *Journal of Applied Physics*, 1988, **64**, 10, 5862-5864

[Ueno et al. 1990]

Ueno S, Matsuda T and Fujiki M, “Functional mapping of the human motor cortex obtained by focal and vectorial magnetic stimulation of the brain”, *IEEE Transactions on Magnetics*, 1990, **26**, 5, 1539-1544

[Vega et al. 2010]

Vega A, Luther JA, Birren SJ and Morales MA, “Segregation of the classical transmitters norepinephrine and acetylcholine and the neuropeptide Y in sympathetic neurons: modulation by ciliary neurotrophic factor or prolonged growth in culture”, *Developmental Neurobiology*, 2010, **70**, 14, 913-928

[Wachtell et al. 2005]

Wachtell K, Lehto M, Gerds E, Olsen MH, Hornestam B, Dahlöf B, Ibsen H, Julius S, Kjeldsen SE, Lindholm LH, Nieminen MS and Devereux RB, “Angiotensin II receptor blockade reduces new-onset atrial fibrillation and subsequent stroke compared to atenolol: the Losartan Intervention For End Point Reduction in Hypertension (LIFE) study”, *Journal of the American College of Cardiology*, 2005, **45**, 5, 712-719

[Wang et al. 2004]

Wang TJ, Parise H, Levy D, D’Agostino RB, Wolf PA, Vasan RS and Benjamin EJ, “Obesity and the risk of new-onset atrial fibrillation”, *The Journal of the American Medical Association*, 2004, **292**, 20, 2471-2477

[Warner and Levy 1990]

Warner MR and Levy MN, “Sinus and atrioventricular nodal distribution of sympathetic fibers that contain neuropeptide Y”, *Circulation Research*, 1990, **67**, 3, 713-721

[Warner et al. 1991]

Warner MR, Senanayake PD, Ferrario CM and Levy M, “Sympathetic stimulation-evoked overflow of norepinephrine and neuropeptide Y from the heart”, *Circulation Research*, 1991, **69**, 2, 455-465

[Weerasooriya et al. 2011]

Weerasooriya R, Khairy P, Litalien J, Macle L, Hocini M, Sacher F, Lellouche N, Knecht S, Wright M, Nault I, Miyazaki S, Scavee C, Clementy J, Haissaguerre M and Jais Pierre, “Catheter ablation for atrial fibrillation: are results maintained at 5 years of follow-up?”, *Journal of the American College of Cardiology*, 2011, **57**, 2, 160-166

[Wilhelmsen et al. 2001]

Wilhelmsen L, Rosengren A and Lappas G, “Hospitalizations for atrial fibrillation in the general male population: morbidity and risk factors”, *Journal of Internal Medicine*, 2001, **250**, 5, 382-389

[Wilson et al. 2010]

Wilson K, Das M, Wahl KJ, Colton RJ and Hickman J, “Measurement of contractile stress generated by cultured rat muscle on silicon cantilevers for toxin detection and muscle performance enhancement”, *PloS One*, 2010, **5**, 6, e11042

[Wolf et al. 1991]

Wolf PA, Abbott RD and Kannel WB, “Atrial fibrillation as an independent risk factor for stroke: the Framingham Study”, *Stroke*, 1991, **22**, 8, 983-988

[Wood 1954]

Wood P, “An Appreciation of Mitral Stenosis-I”, *British Medical Journal*, 1954, **1**, 4870, 1051-1063

[Yamamori et al. 1989]

Yamamori T, Fukada K, Aebersold R, Korsching S and Fann MJ, “The cholinergic neuronal differentiation factor from heart cells is identical to leukemia inhibitory factor”, *Science*, 1989, **246**, 4936, 1412-1416

[Yamashita et al. 1998]

Yamashita T, Murakawa Y, Hayami N, Sezaki K, Inoue M, Fukui EI and Omata M, “Relation between aging and circadian variation of paroxysmal atrial fibrillation”, *The American Journal of Cardiology*, 1998, **82**, 11, 1364-1367

[Zarzoso et al. 2013]

Zarzoso M, Rysevaite K, Milstein ML, Calvo CJ, Kean AC, Atienza F, Pauza DH, Jalife J and Noujaim SF, “Nerves projecting from the intrinsic cardiac ganglia of the pulmonary veins modulate sinoatrial node pacemaker function”, *Cardiovascular Research*, 2013, cvt081

[Zhang et al. 2010]

Zhang XM, Li Liu DT, Chiang SWY, Choy KW, Pang CP, Lam DSC and Yam GHF, “Immunopanning purification and long-term culture of human retinal ganglion cells”, *Molecular Vision*, 2010, **16**, 2867-2872

[井上 2001]

井上博, “循環器疾患と自律神経機能”, 医学書院, 2001, 3-15, ISBN-10: 4260119850

[井上他 2013]

井上博, 新博次, 奥村謙, 鎌倉史郎, 熊谷浩一郎, 是恒之宏, 杉薫, 三田村秀雄, 矢坂正弘, 山下武志, 里見和浩, 大江透, 小川聡, 児玉逸雄, 筒井裕之, “心房細動治療 (薬物) ガイドライン (2013年改訂版), 日本循環器学会, 2013

[厚生労働省 平成 25 年人口動態統計月報年計]

厚生労働省, 平成 25 年度人口動態統計月報年計, 第 7 表

[国際非電離放射線防護委員会 2010]

国際非電離放射線防護委員会, “時間変動する電界および磁界へのばく露制限に関するガイドライン (1 Hz から 100 kHz まで)”, 2010

研究業績

査読付き論文(英文)

[1] Kosuke Oiwa, Kenta Shimba, Takashi Numata, Akimasa Takeuchi, Kiyoshi Kotani and Yasuhiko Jimbo, “A device for co-culturing autonomic neurons and cardiomyocytes using micro-fabrication techniques”, *Integrative Biology* (in press)

査読付き論文(和文)

[1] 大岩孝輔, 吉松裕貴, 塗木淳夫, 湯ノ口万友, 玉利陽三, 神保泰彦, “モデルを用いた経頭蓋磁気刺激における刺激コイルの配置及び刺激対象の形状による影響の検討”, 電気学会論文誌 C, Vol.134, No.7, pp.891-896, 2014

[2] 大岩孝輔, 榛葉健太, 沼田崇志, 武内彬正, 小谷潔, 神保泰彦, “微細加工技術を用いた副交感神経細胞－心筋細胞共培養系の構築”, 電気学会論文誌 C, Vol.135, No.7, pp. 813-818, 2015

国際会議

[1] Kosuke Oiwa, Kenta Shimba, Takashi Numata, Akimasa Takeuchi, Kiyoshi Kotani and Yasuhiko Jimbo, “Towards micro-magnetic stimulation of autonomic nervous system -development of in vitro model system-”, 19th International Conference on Biomagnetism (BIOMAG 2014), P3-083, Halifax, Canada, 2014

国内学会・研究会

[1] 大岩孝輔, 榛葉健太, 沼田崇志, 武内彬正, 小谷潔, 神保泰彦, “微細加工技術を用いた自律神経細胞－心筋細胞共培養系の構築”, 電気学会研究会 医用・生体工学研究会, MBE-15-044, 東京, 2015

[2] 大岩孝輔, 榛葉健太, 湯ノ口万友, 小谷潔, 神保泰彦, “微細加工技術を用いたマイクロ磁気刺激システムの構築”, 第 54 回日本生体医工学会大会, P1-5-7-A, 名古屋, 2015

受賞

[1] 論文奨励賞, 電気学会論文誌 C, Vol.135, No.7, pp. 813-818, 2015