

# 論文審査の結果の要旨

氏名 大岩 孝輔

本論文は 5 章構成である。

第 1 章では、研究背景並びに関連分野の動向に関する考察に基づき、研究目的と検討課題が提示されている。心疾患の 1 つである心房細動を対象にその早期診断・治療手法の確立を目指すのが本研究の立場であり、発症メカニズム解明を可能にする *in vitro* モデルを構築、その有用性を示すことを目的として設定している。心房細動は、初期段階では器質的な原因が認められない症例が少なからずあり、不規則な生活習慣やストレスとの相関を考慮すると、自律神経活動の失調が要因となっている可能性が高い。この点に注目し、交感／副交感神経と心筋細胞群を共培養、電気刺激により交感／副交感のバランスを制御して心拍リズムに与える影響の可視化を試みる。合わせて、自律神経活動の体外からの制御、迷走神経磁気刺激の実現可能性について、シミュレーションと実験の両面から検討する。

第 2 章は自律神経細胞の培養と活動計測である。交感神経 (Superior Cervical Ganglion; SCG) については多くの研究報告があり、培養手法が確立されているが、副交感神経 (Intra-Cardiac Ganglion; ICG) に関する報告は少ない。明確な神経節を形成する SCG と異なり ICG は標的組織表面に分散して存在するため、その採取が技術的に困難、急性試料に免疫組織化学染色を適用した細胞種の同定、72 時間の *in vitro* 系での維持が限界であった。本研究では ICG を含む心臓表面の Fat Pad を顕微鏡下で選択的に採取、細胞種によるサイズや基板表面への接着性の違いを利用してフィルタリングすることにより、ICG 細胞の含有率向上を試みた。神経栄養因子等培養液の組成についても改良した。結果として、従来手法と比較して 4 倍以上の ICG 細胞を含む培養系を 3 週間維持することができた。SCG, ICG 神経細胞群をそれぞれ集積化電極基板 (MicroElectrode Array; MEA) 上に播種して培養、ネットワークとしての電気活動と細胞内  $Ca^{2+}$  濃度変化を計測した。節後神経細胞のみから構成される系で、培養開始後 2 週目から自発的な活動が見られ、3 週目に入ると細胞間の同期性が認められる、すなわちシナプス結合を介した神経回路を形成していることを示唆する結果が得られた。自律神経細胞群のネッ

トワークとしての活動を記録した初めての結果である。

第3章では、SCG/ICG/心房筋細胞 (Atrial Myocyte; AM) の3要素からなる共培養システム構築を行った結果が示されている。MEA基板上に3つの細胞培養区画を集積化、SCG、ICG、AMをそれぞれの区画に播種して区画間をマイクロトンネルで連絡する構造としている。AM単独の培養系で観測される拍動リズムに比べて共培養系ではその変動が大きくなり、交感/副交感神経伝達のアンタゴニストである *propranolol* と *atropine* の投与によりその変動は抑制される、SCGに電気刺激を印加すると拍動間隔が短縮し、ICG刺激の場合は延長するなどの結果が得られ、「交感/副交感神経からなる自律神経系の支配を受ける心筋細胞群の *in vitro* 再構成」が実現された。SCGへの電気刺激により交感神経の活動亢進状態を作り出すと、1分間の刺激で誘導された心拍リズムの変調は5-10分で初期状態に復帰する、1時間刺激を継続すると3時間後も頻脈状態が続き、24時間後に90%程度まで回復するなどの結果が得られた。交感神経に対する慢性電気刺激という人為的な自律神経活動の制御により、心拍リズムの不可逆な変化が誘導される可能性が示され、心房細動 *in vitro* モデルとしての有用性が確認できた。

第4章は心房細動に対する新たな治療手法に関する基礎的検討である。薬理治療には副作用および耐性という問題があり、非薬理治療として実用化されている迷走神経刺激は外科手術による装置の体内埋め込みという侵襲性が避けられない。本研究では脳に対する体外からの刺激が実現されている磁気刺激を自律神経系に適用する可能性について検討した。自律神経線維束を模擬し、マイクロトンネル構造を利用して単一方向に整列させた培養交感神経軸索に対して、近接配置したマイクロコイルによる磁気刺激を試みた。シミュレーションと実験両面からコイルの配置と刺激の空間分解能について検討した結果を記述した。

以上、設定した研究目的、課題に対して得られた結果に基づき、第5章で結論と今後の展望について総括した。なお、本論文第2章、第3章、第4章の一部は、榛葉健太、沼田崇志、武内彬正、小谷潔、神保泰彦との共同研究であるが、論文提出者が主体となって実験及び解析を行なったものであり、論文提出者の寄与が十分であると判断する。

従って、博士(科学)の学位を授与できると認める。

以上 1990 字