

博 士 論 文

マイクロデバイスを用いた青斑核-海馬共培養系の構築
—迷走神経刺激作用機序の解明に向けて—

吉 田 墨

目次

第1章 序論	1
1.1 背景	2
1.1.1 難治性てんかん	3
1.1.2 迷走神経刺激療法 (VNS)	5
1.1.3 青斑核	7
1.1.4 微小電極アレイ (MEA)	10
1.1.5 マイクロデバイスを用いた青斑核-海馬共培養系の有用性	14
1.2 目的	15
1.3 論文の構成	16
第2章 成熟した培養神経回路網に対するノルアドレナリンの添加	17
2.1 概要	18
2.2 方法	19
2.2.1 細胞培養	19
2.2.2 細胞外電位計測	20
2.2.3 実験プロトコル	21
2.2.4 スパイク解析	22
2.2.5 単電極バースト解析	24
2.2.6 ネットワークバースト解析	26
2.2.7 フーリエスペクトル解析	29
2.3 結果	30
2.3.1 スパイク解析	30
2.3.2 単電極バースト解析	32
2.3.3 ネットワークバースト解析	39

2.3.4 フーリエスペクトル解析	46
2.4 考察	47
2.4.1 NE の活動抑制効果	47
2.4.2 NE 添加後のネットワークバースト減少	48
2.4.3 作用時間と添加濃度における NE の効果	49
2.4.4 NE 添加後に見られた周期的な活動	49
2.5 結論	51
第 3 章 ノルアドレナリンの効果に関する系統的な評価	52
3.1 概要	53
3.2 方法	54
3.2.1 細胞培養	54
3.2.2 細胞外電位計測	54
3.2.3 発達過程における NE 添加	54
3.2.4 濃度を変化させた NE 添加	55
3.2.5 アドレナリン受容体アゴニスト添加	55
3.2.6 スパイク解析	55
3.2.7 ネットワークバースト解析	55
3.2.8 フーリエスペクトル解析	55
3.3 結果	56
3.3.1 発達過程における NE 添加	56
3.3.2 濃度を変化させた NE 添加	62
3.3.3 アドレナリン受容体アゴニスト添加	68
3.4 考察	74
3.4.1 発達過程における NE 添加	74
3.4.2 濃度を変化させた NE 添加	76
3.4.3 アドレナリン受容体アゴニスト添加	78
3.4.4 NE 添加による影響の総括	79
3.5 結論	80
第 4 章 青斑核単独培養系の構築	81
4.1 概要	82

4.2 方法	83
4.2.1 デバイス作製	83
4.2.2 細胞培養	84
4.2.3 免疫組織化学染色	86
4.2.4 細胞外電位計測	87
4.2.5 実験プロトコル	87
4.2.6 スパイク解析	87
4.2.7 ネットワークバースト解析	87
4.2.8 移動エントロピー解析	88
4.3 結果	90
4.3.1 免疫組織化学染色	90
4.3.2 スパイク解析	91
4.3.3 ネットワークバースト解析	94
4.3.4 移動エントロピー解析	96
4.4 考察	99
4.4.1 青斑核由来培養神経回路の非同期的活動	99
4.4.2 青斑核由来培養神経細胞の活動特性	99
4.5 結論	101
第5章 青斑核-海馬共培養系の構築	102
5.1 概要	103
5.2 方法	104
5.2.1 デバイス作製	104
5.2.2 細胞培養	113
5.2.3 細胞外電位計測	114
5.2.4 実験プロトコル	114
5.2.5 スパイク解析	114
5.2.6 ネットワークバースト解析	114
5.2.7 結合解析	115
5.3 結果	117
5.3.1 細胞培養	117
5.3.2 スパイク解析	118

5.3.3 ネットワークバースト解析	121
5.3.4 結合解析	123
5.4 考察	127
5.4.1 青斑核-海馬の短期的作用	127
5.4.2 青斑核-海馬の長期的作用	127
5.4.3 青斑核の同期活動	129
5.5 結論	130
第6章 結論と今後の展望	131
6.1 結論	132
6.2 今後の展望	135
6.2.1 青斑核の神経修飾作用メカニズム解明への貢献	135
6.2.2 迷走神経刺激作用メカニズムの解明への貢献	135
謝辞	136
参考文献	137

図目次

図 1.1 てんかんの治療 (宇川 and 辻 2012)	4
図 1.2 VNS デバイス (Fornai et al. 2011).....	6
図 1.3 VNS による活動の伝播 (Manta et al. 2009) (一部改変)	6
図 1.4 青斑核 (Bear, Connors, and Paradiso 2006).....	9
図 1.5 アドレナリン受容体のシグナル伝達 (Gutkind 1998) (一部改変)	9
図 1.6 MEA (Tateno and Jimbo 1999) (一部改変)	12
図 1.7 パッチクランプ (Bear et al. 2007).....	12
図 1.8 光学イメージング (Ikegaya, Le Bon-Jego, and Yuste 2005)	13
図 1.9 神経細胞とグリア細胞の共培養 (Majumdar et al. 2011)	13
図 2.1 MEA	19
図 2.2 MEA 計測系	20
図 2.3 実験プロトコル	21
図 2.4 スパイク検出.....	23
図 2.5 単電極バースト検出.....	25
図 2.6 ネットワークバースト検出 (van Pelt et al. 2004).....	28
図 2.7 平均発火率	31
図 2.8 スパイク数	31
図 2.9 パラメータ感度分析 maxISI.....	34
図 2.10 パラメータ感度分析 minSpikes	35
図 2.11 単電極バースト	38
図 2.12 パラメータ感度分析 bin.....	40
図 2.13 パラメータ感度分析 pth	41
図 2.14 パラメータ感度分析 rate	42
図 2.15 ネットワークバースト	45

図 2.16 正規化フーリエスペクトル	46
図 3.1 実験プロトコル	54
図 3.2 平均発火率	57
図 3.3 スパイク数	57
図 3.4 ネットワークバースト	59
図 3.5 正規化フーリエスペクトル	61
図 3.6 平均発火率	63
図 3.7 スパイク数	63
図 3.8 ネットワークバースト	65
図 3.9 正規化フーリエスペクトル	67
図 3.10 平均発火率	69
図 3.11 スパイク数	69
図 3.12 ネットワークバースト	71
図 3.13 正規化フーリエスペクトル	73
図 4.1 培養デバイス	83
図 4.2 青斑核摘出	85
図 4.3 アトラス (Joseph and Shirley 1994)	85
図 4.4 移動エントロピー	89
図 4.5 免疫組織化学染色	90
図 4.6 平均発火率	92
図 4.7 ラスタープロット	92
図 4.8 スパイク数	93
図 4.9 スパイク間隔	93
図 4.10 スパイク間隔のヒストグラム	93
図 4.11 ネットワークバースト	95
図 4.12 パラメータ感度分析	97
図 4.13 ランダムスパイクデータの移動エントロピー比較	97
図 4.14 移動エントロピー	98
図 4.15 ISI ヒストグラム (b) (Aston-Jones and Bloom 1981a)	100
図 5.1 共培養デバイス	105
図 5.2 デバイス作製	105

図 5.3 MEA 電極パターン	107
図 5.4 MEA 絶縁パターン	107
図 5.5 フォトマスク作製	108
図 5.6 細胞培養	113
図 5.7 相対スパイク時刻ヒストグラムの作成	116
図 5.8 作製したデバイス	117
図 5.9 位相差画像	117
図 5.10 平均発火率	119
図 5.11 ラスタープロット	120
図 5.12 スパイク数	120
図 5.13 ネットワークバースト	122
図 5.14 相対スパイク時刻ヒストグラム	125
図 5.15 移動エントロピー パラメータ感度分析	125
図 5.16 移動エントロピー ランダムスパイクデータ	126
図 5.17 移動エントロピー	126

第1章 序論

1.1 背景	2
1.1.1 難治性てんかん	3
1.1.2 迷走神経刺激療法（VNS）	5
1.1.3 青斑核.....	7
1.1.4 微小電極アレイ（MEA）	10
1.1.5 マイクロデバイスを用いた青斑核-海馬共培養系の有用性	14
1.2 目的	15
1.3 論文の構成	16

1.1 背景

難治性てんかんに対する治療法として、迷走神経にデバイスを埋め込み、間欠的に電気刺激を行う迷走神経刺激療法が 2010 年に日本で保険適応になった。1 年間の治療により、約 3 割の難治性てんかん患者の発作頻度が 50% 減少する効果が得られており、開頭手術よりも侵襲性が低いため近年注目されている治療法である。迷走神経刺激作用のメカニズムとしては、ノルアドレナリン作動性神経細胞を豊富に含む青斑核が深く関与していると考えられているが、その分子、細胞、神経回路レベルの作用に関する詳細については不明な点が多く、効果を示す患者の事前識別、最適な刺激条件の設定は現在困難で、短期的な効果と長期的な効果の差異、関連する遺伝子、タンパク質、シグナル伝達などについては明らかになっていない。

ここで、迷走神経刺激療法において重要な役割を担っていると考えられる青斑核とてんかん焦点になりやすい海馬の局所的な相互作用を明らかにすることは、迷走神経刺激療法の作用メカニズム解明に貢献できると考えられる。そこで、本研究では、他部位や他組織との複雑な相互作用が存在する生体内 (*in vivo*) ではなく、当該部位間の局所的な相互作用を評価可能な生体外 (*in vitro*) で、非侵襲的な多点同時電気計測が可能な微小電極アレイと生体適合性の高いシリコーンゴム PDMS (polydimethylsiloxane) を用いた当該部位の共培養系の構築を行った。

そこで、本節では、本研究の背景において肝要である難治性てんかん、迷走神経刺激療法、青斑核、微小電極アレイについて説明する。

1.1.1 難治性てんかん

本項では、てんかんの定義、分類、そのメカニズムと治療法について述べた後、難治性てんかんの定義、治療法について述べる。

てんかんとは、けいれんや意識消失を引き起こす発作を伴う疾患であり、「慢性・反復性に起こる大脳皮質ニューロンの突発性、急激で過剰な電氣的異常発射により皮質機能が障害され種々のてんかん発作となる発作性機能性疾患」（宇川 and 辻 2012）と定義される。簡潔に述べると、大脳皮質における神経細胞集団の全体もしくは一部が異常な同期活動を行い、皮質機能の障害がおこる疾患である。分類として、てんかん発作が一側半球に局在する部分発作と、両側半球に現れる全般発作の 2 つが存在する。

てんかん発症のメカニズムとしては、電位依存性ナトリウムチャネル (Lossin et al. 2003; Wallace et al. 1998)、電位依存性カリウムチャネル (Bockenhauer et al. 2009; Zuberi 1999)、電位依存性カルシウムチャネル (Escayg et al. 2000; Imbrici et al. 2004)、GABA (gamma-aminobutyric acid) 受容体 (Baulac et al. 2001; Wallace et al. 2001) の異常、軸索出芽 (Buckmaster, Zhang, and Yamawaki 2002; Sutula et al. 1988)、神経脱落 (Mello et al. 1993; Sloviter 1987) などによる、興奮性の向上、抑制性の低下が考えられている。

図 1.1 にてんかんの治療の流れを示す。まず、てんかんの分類によって、ナトリウムチャネルを不活性化するカルバマゼピンや GABA を不活性化する GABA トランスアミナーゼを阻害して GABA 濃度を上げるバルプロ酸が第一選択薬として、用いられる。第一選択薬に効果がなかった場合、第二選択薬や多剤併用療法が用いられる。

上記の方法でも改善が見られないてんかんは、難治性てんかんと呼ばれる。難治性てんかんは薬剤抵抗性てんかんとも呼ばれ、「てんかん症候群または発作型に対し適切とされている主な抗てんかん薬 2～3 種類以上の単剤あるいは多剤併用で、かつ十分量で、2 年以上治療しても、発作が 1 年以上抑制されず日常生活に支障をきたす状態」（日本神経学会 and 「てんかん治療ガイドライン」作成委員会 2010）と定義される。

難治性てんかんの治療法としては、過剰な電氣的発射を起こすてんかん焦点の切除手術や迷走神経を間欠的に刺激する迷走神経刺激療法といった外科治療が行われる。迷走神経刺激療法は前者のような開頭手術に比べると侵襲性が低く、近年注目されている治療法である。

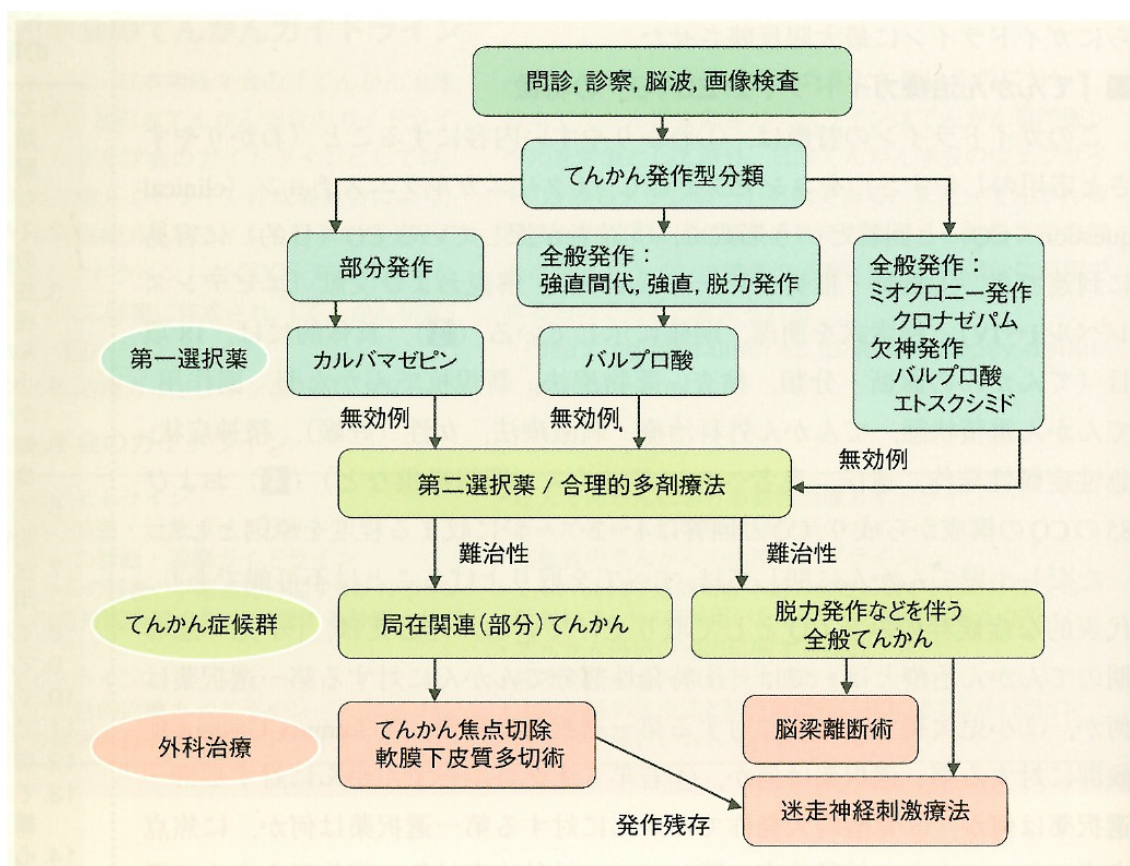


図 1.1 てんかんの治療 (宇川 and 辻 2012)

1.1.2 迷走神経刺激療法 (VNS)

迷走神経刺激療法 (VNS; vagus nerve stimulation) は 2010 年に日本で保険適応になった難治性てんかんに対する治療法である。患者の頸部に存在する迷走神経にデバイス (図 1.2) を埋め込み、間欠的に電流を発生させることで行われる (Penry and Dean 1990; Terry, Tarver, and Zabara 1990)。イヌのてんかんモデルにおける発作に対して抑制効果があったことからデバイスが開発された (Zabara 1992)。

VNS による難治性てんかんに対する 3 ヶ月間, 1 年間, 2 年間の治療により, 発作減少率はそれぞれ約 20%, 35%, 45% であり, 50% 以上発作が減少した患者数はそれぞれ全体の約 25%, 35%, 45% であり, その治療法の有用性が示された (Ben-Menachem 2002; Handforth et al. 1998; The Vagus Nerve Stimulation Study Group 1995)。このような長期的な効果に加えて, てんかん前兆症候 (オーラ) を感じた時や発作開始時に刺激を行うことで, 発作が消失するといった短期的な効果も確認されている (Hammond et al. 1992)。また, VNS はてんかんのみならず, うつ病 (Rush et al. 2000; Sackeim et al. 2001; Schlaepfer et al. 2008), 偏頭痛 (Hord et al. 2003; Lenaerts et al. 2008; Sadler, Purdy, and Rahey 2002) の治療にも有用であることが確認されており, その効果は幅広い。

迷走神経は 8 割が求心性であり (Foley and DuBois 1937), 迷走神経刺激による作用はそれら求心性神経を経由して, 脳深部へ影響を与えていると考えられる。解剖学の知見より, 迷走神経は孤束核 (NTS; solitarily nucleus) に投射し, NTS から巨細胞性網様体傍核 (Pgi; nucleus paragigantocellularis) と舌下神経前位核 (PrH; nucleus prepositus hypoglossus) を経由し, 青斑核 (LC; locus coeruleus) へ連絡があり, LC は背側縫線核 (DR; dorsal raphe nucleus), てんかん焦点になる傾向がある海馬 (HP; hippocampus) (de Lanerolle et al. 1989; Velasco et al. 2007) と連絡し合っている (図 1.3)。ここで, Krah1 らはてんかんモデルのラットの青斑核を損傷させると VNS の効果が抑制されることを実験的に確認し, 青斑核の重要性を示した (Krah1 et al. 1998)。また, Manta らはラットに対する VNS 適用期間中, 青斑核とセロトニン作動性神経細胞を豊富に含む縫線核の自発活動が増加することを示し, VNS における青斑核と縫線核の関与を示唆した (Manta et al. 2009)。これらの研究から, VNS の作用メカニズムにおいてノルアドレナリン作動性神経細胞を豊富に含む青斑核が深く関与していると考えられている。

以上のことから、VNS の効果における青斑核の役割は大きいと考えられるが、青斑核と他脳部位との相互作用の詳細、それらに関連する分子や細胞のメカニズム、短期的な効果と長期的な効果の差異、最適な電気刺激条件、VNS の効果がある患者 (responder) と効果がない患者 (non-responder) の差異など、不明な点が多い状況である (Groves and Brown 2005; Krahl and Clark 2012; Nemeroff et al. 2006).

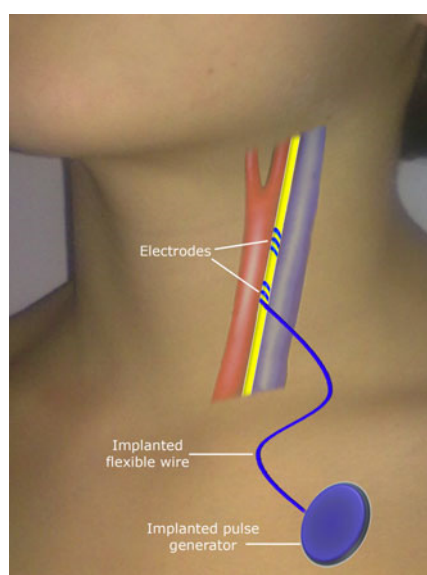


図 1.2 VNS デバイス (Fornai et al. 2011)

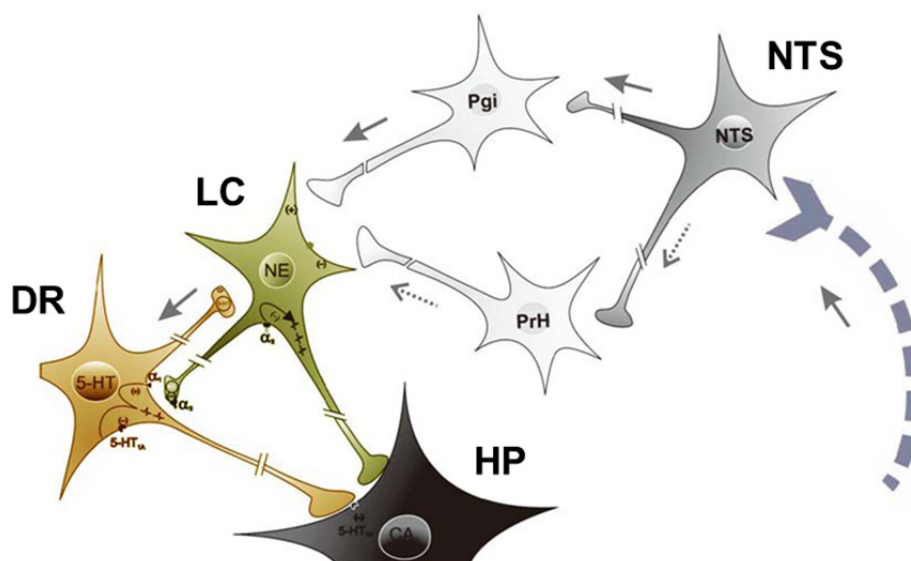


図 1.3 VNS による活動の伝播 (Manta et al. 2009) (一部改変)

1.1.3 青斑核

青斑核 (LC; locus coeruleus) はノルアドレナリン作動性神経細胞を豊富に含む神経核で脳幹に位置し、脊髄、橋、視床、海馬、脳梁、大脳皮質など広範囲に投射している (図 1.4). LC 内の神経細胞の大多数がノルアドレナリン作動性であり、それ以外の神経細胞は GABA 作動性である (Berod et al. 1984; Iijima, Ohtomo, and Iijima 1988).

青斑核は脳の多様な機能に関わっており、例えば、覚醒、注意、記憶に関与している。覚醒に関しては、睡眠時は活動が減少し、覚醒時には活動が増加することが知られている (Aston-Jones and Bloom 1981a; Carter et al. 2010; Foote, Aston-Jones, and Bloom 1980; Hagan et al. 1999; Hobson, McCarley, and Wyzinski 1975). また、聴覚刺激や視覚刺激を与え、注意を喚起した際に、青斑核の活動性が高まることが確認されている (Aston-Jones and Bloom 1981b; Bouret and Sara 2002; Foote et al. 1980; Rasmussen, Morilak, and Jacobs 1986). そして、青斑核を損傷させると記憶の定着に対して障害がおこること、青斑核を活性化させると学習が促進されることから、学習にも関わっていると考えられている (Anlezark, Crow, and Greenway 1973; Gibbs, Hutchinson, and Summers 2010; Sara and Devaues 1988). また、前項で記述した通り、抗てんかん性も有していることが示唆されている (Krahl et al. 1998; Manta et al. 2009).

上記の神経調節作用は生体の行動と関わるマクロな機能であり、それらの機能を実現するための神経細胞に対するミクロな機能の解明も脳の動作原理を解明する上では肝要である。そこで、青斑核は主にノルアドレナリン作動性神経細胞から構成されることから、低分子化合物である神経調節物質ノルアドレナリンを用いることによって、神経細胞に対する多様な調節機能があることが確認されている。例えば、興奮性神経細胞のグルタミン酸放出抑制 (Scanziani, Gähwiler, and Thompson 1993), 抑制性神経細胞の活動促進 (Bergles et al. 1996), スパイクタイミング依存可塑性の修飾 (Salgado, Köhr, and Treviño 2012) などが挙げられる。

ノルアドレナリンの効果はアドレナリン受容体の活性化を通して現れている (図 1.5). アドレナリン受容体は α , β のサブファミリーから構成され、いずれも G タンパク質共役型受容体である。中枢神経系では、主に $\alpha 1$, $\alpha 2$, β アドレナリン受容体を通してノルアドレナリンの作用が実現される。 $\alpha 1$ 受容体はホスホリパーゼ C を

活性化し、イノシトール三リン酸 (IP_3) の産生を促し、細胞内小胞体のカルシウムイオンを放出させ、細胞内カルシウムイオン濃度を増加させる。 α_2 , β 受容体はアデニル酸シクラーゼを、それぞれ阻害、活性化し、環状アデノシンーリン酸 (cAMP; cyclic adenosine monophosphate) の濃度を低下、上昇させる。 cAMP はプロテインキナーゼ A を活性化させ、プロテインキナーゼ A は電位依存性カルシウムチャネルをリン酸化し、細胞内カルシウムイオンを増加させる。

ここで、神経調節作用や抗てんかん作用といった青斑核の多様な機能を明らかにするためには、上記の生体の行動レベルのマクロな機能と神経細胞の活動レベルのミクロな機能をつなげる、神経回路のダイナミクスレベルのメゾな機能の理解も肝要である。神経調節物質であるドーパミン、セロトニン、アセチルコリンの神経回路レベルの効果を、電位感受性蛍光色素を用いて評価している研究 (Bandyopadhyay and Hablitz 2007; Mann et al. 2005; Svensson, Grillner, and Parker 2001) も存在するが、ネットワークレベルの研究は数少なく、マクロな機能とミクロな機能を統合するには至っていないのが現状である。

さらに、ノルアドレナリン作動性神経細胞から放出されたノルアドレナリンの量の調整はノルエピネフリントランスポーター (NET; norepinephrine transporter) による再取り込みによる影響が大きいこと (Xu et al. 2000), NET はノルアドレナリン作動性神経細胞に限定的に発現していること (Sager and Torres 2011; Schroeter et al. 2000; Torres, Gainetdinov, and Caron 2003) をふまえると、ノルアドレナリンを添加してその効果を評価する場合、短期的な効果の評価は妥当であると考えられるが、長期的な効果の評価をする際、NET の再取り込みが果たすようなノルアドレナリン濃度の調整が存在しない系をもちいることは適切でないと考えられる。そのため、ノルアドレナリンの効果を長期的に評価する場合は、NET の再取り込みと同様の濃度調整を行うシステムの構築や、再取り込みを行うノルアドレナリン作動性神経細胞を用いることが肝要であると考えられる。

また、青斑核はノルアドレナリンに加えて共存伝達物質として、神経ペプチド Y, ガラニン, ソマトスタチンといった多様な神経ペプチドを生成し放出している (Olpe and Steinmann 1991)。前者 2 つのペプチドは後述する、抗てんかん作用にも寄与している可能性があると考えられている (Mazarati and Wasterlain 2002; Mazarati et al. 1998; Stroud et al. 2005)。そこで、ノルアドレナリンを添加するのみでは青斑核の機能を評価するには適切でなく、青斑核を用いた実験系の構築が望まれる。

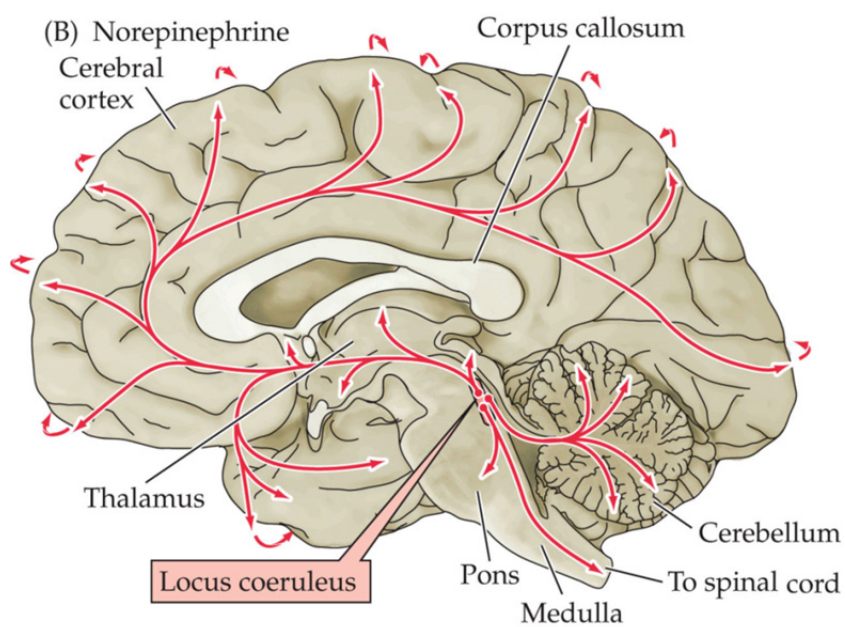


図 1.4 青斑核 (Bear, Connors, and Paradiso 2006)

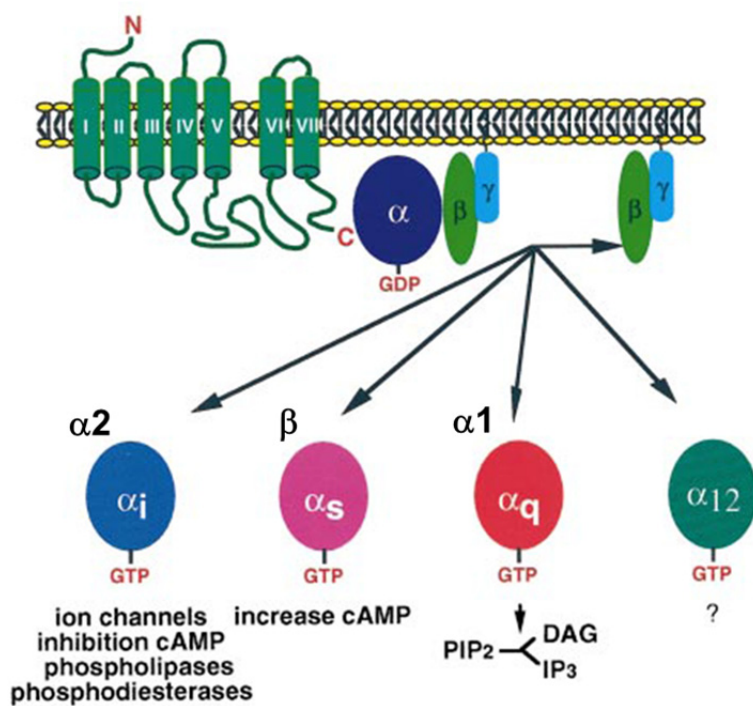


図 1.5 アドレナリン受容体のシグナル伝達 (Gutkind 1998) (一部改変)

1.1.4 微小電極アレイ (MEA)

微小電極アレイ (MEA; microelectrode array) とは、多数の微小電極をガラス基板上に集積化したものである (図 1.6 (a)). その上で神経細胞を培養すること (図 1.6 (b)) によって、高時間分解能 (サンプリングレート 25kHz 以上) で非侵襲的に細胞外電位同時多点計測ができる. 図 1.6 (c) は細胞外電位の波形の例である. また、電気回路を切り替えることで電気計測のみならず、電気刺激が可能となる. そして、フォトリソグラフィを用いることにより目的に応じた電極の大きさや配置といった電極パターンを設計することが可能である.

神経回路の機能を評価する方法は、生体そのものを用いた実験を行う方法 (*in vivo*) と対象部位を生体外に摘出して実験を行う方法 (*in vitro*) に大別できる. *in vivo* を用いた研究の利点としては、生体そのものを扱うため、得られたデータと認知活動や行動との対応付けが直接可能である点である. 例えば、O'Keefe らが行った空間認知の際に活動する海馬の場所細胞の発見 (O'Keefe and Dostrovsky 1971) や場所細胞とシータリズムの関係性の発見 (O'Keefe and Recce 1993; Skaggs and McNaughton 1996) が挙げられ、*in vitro* 研究では困難である. 一方、*in vitro* を用いた研究の利点としては、目的の部位を特異的に摘出し、そのダイナミクスの解析や薬品の効果測定などを、他の脳部位や他臓器の影響を排除した上で行うことができる点である. 例えば、Beggs らは脳スライスと MEA を用いて、自発活動する範囲の大きさとその頻度がべき乗則に従う自己組織化臨界である神経雪崩を発見した (Beggs and Plenz 2003). また、神経雪崩が発生している場合、神経回路における情報伝達の効率化や情報保持量が最大化されていることを示し、記憶や情報処理に深く関わることを示唆した (Beggs and Plenz 2003; Friedman et al. 2012; Haldeman and Beggs 2005; Pasquale et al. 2008). 実際、*in vivo* においても神経雪崩の現象は確認されており (Hahn et al. 2010; Petermann et al. 2009), 本例は *in vitro* の有用性を示している.

本研究で用いる MEA は *in vitro* における活動計測、電気刺激の方法の 1 つであり、MEA 以外の活動計測手法としては、パッチクランプ (図 1.7) や光学イメージング (図 1.8) が存在する. パッチクランプとは、マイクロピペットを用いて細胞膜を吸引し、細胞内と電極内を通電させることにより膜電位を計測可能にする手法である. また、細胞膜を破壊せず、ピペットと細胞膜を密に接着させることで単一イオンチャネル電流の計測も実現可能である. この手法の長所はシナプス電流といった微小な膜

電位の変化を，高い信号対雑音比（SN 比; signal-to-noise ratio）・高時間分解能（サンプリングレート 100kHz 以上）で計測できる点にある．しかし，ピペットを用いて侵襲的に電気計測を行うため，長時間計測できず，多数の細胞を同時に計測することも難しく，空間分解能も低い．

光学イメージングとは，カルシウム蛍光プローブや電位感受性蛍光色素によって蛍光強度の変化として光学的に活動を計測する手法である．顕微鏡視野内の細胞の活動を評価できる点で空間分解能は高いが，退色と呼ばれる時間経過と共に蛍光強度が落ちる現象や蛍光プローブの細胞に対する毒性により，長時間の計測は難しい．また，時間分解能も最大で 1kHz 程度であり，パッチクランプや MEA に比べると低い．

MEA は非侵襲的に多点同時電気計測できることから神経回路全体に渡るダイナミクスの評価，長期培養が可能であり，計測のみならず電気刺激も可能である（Jimbo et al. 2003）．MEA を用いて評価されているネットワークレベルのダイナミクスとしては，神経回路全体の同期的な活動であり，情報処理，情報伝達，記憶，発達，てんかん様活動に関係していると考えられているネットワークバーストが挙げられる（Chiappalone et al. 2006; Kamioka et al. 1996; Maeda, Robinson, and Kawana 1995; van Pelt et al. 2004; Wagenaar, Pine, and Potter 2006）．また，前述した神経雪崩（Beggs and Plenz 2003; Pasquale et al. 2008）やスパイクの時空間パターン（Mok et al. 2012; Rolston, Wagenaar, and Potter 2007）も評価の対象となっている．さらに，電気刺激を用いることによって神経回路の学習も評価可能である（Jimbo, Tateno, and Robinson 1999; Shahaf and Marom 2001）．

また，MEA は生体適合性の高いシリコンゴム PDMS を組み合わせることによって，更に有用性が高くなる．PDMS を用いて構造物を作製する技術をソフトリソグラフィと呼び（Whitesides et al. 2001; Xia and Whitesides 1998），例えば，神経細胞体と軸索を分離する構造物（Taylor et al. 2005），神経細胞とグリア細胞の共培養系を構築する構造物（Majumdar et al. 2011）（図 1.9）が作製されている．また，PDMS と MEA を組み合わせ，軸索における活動電位の伝播を検出するデバイス（Dworak and Wheeler 2009），海馬スライスを安定的に培養するデバイス（Berdichevsky et al. 2009）の開発に加えて，細胞間相互作用を評価するための共培養系（Fukuda et al. 2006; Torisawa et al. 2009），神経細胞の髄鞘形成を評価するための神経細胞とグリア細胞の共培養系（Park et al. 2009）といった，細胞同士の局所的な相互作用を評価する共培養系の構築も行われている．

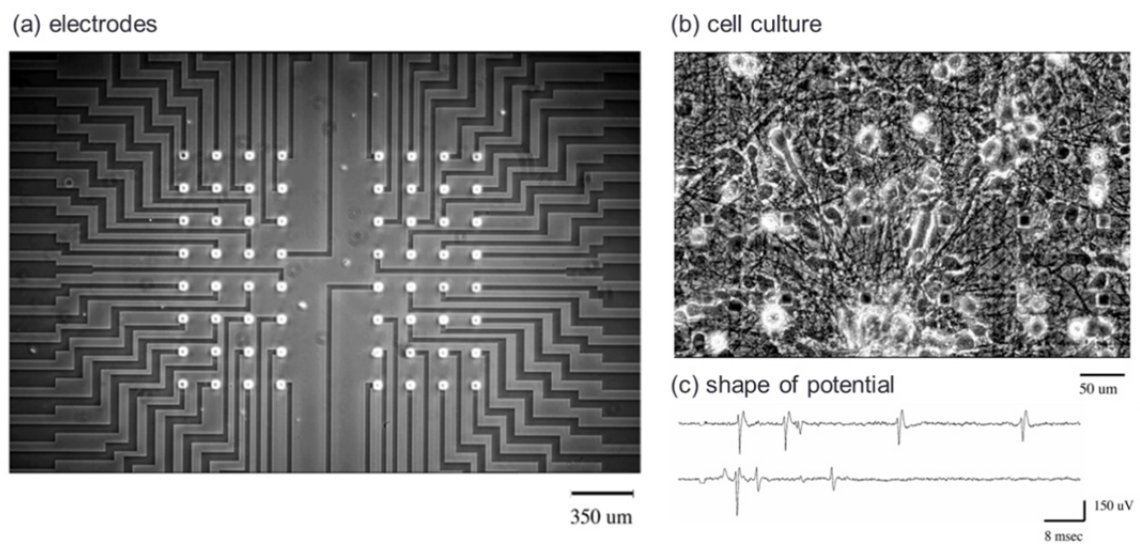


図 1.6 MEA (Tateno and Jimbo 1999) (一部改変)

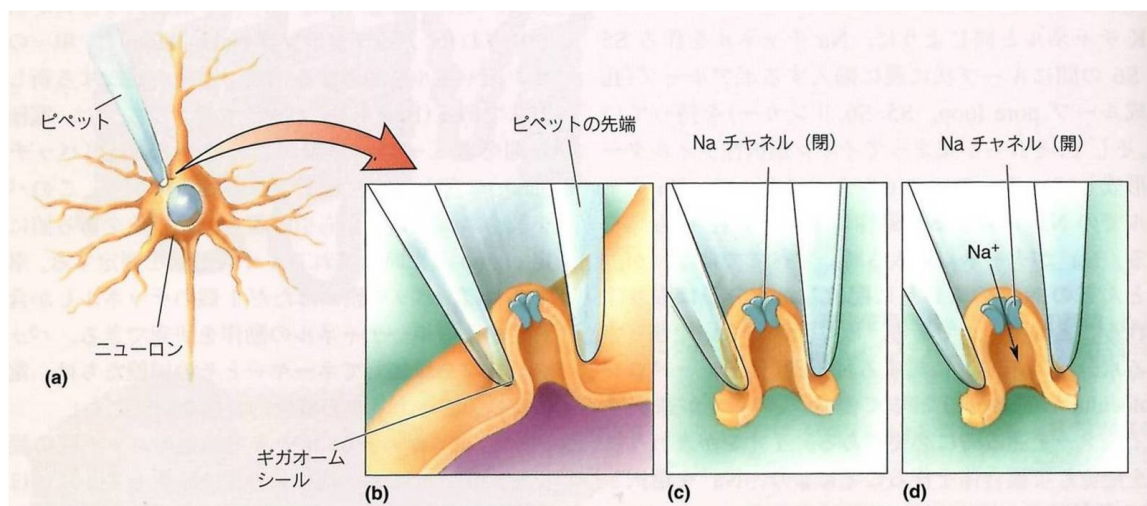


図 1.7 パッチクランプ (Bear et al. 2007)

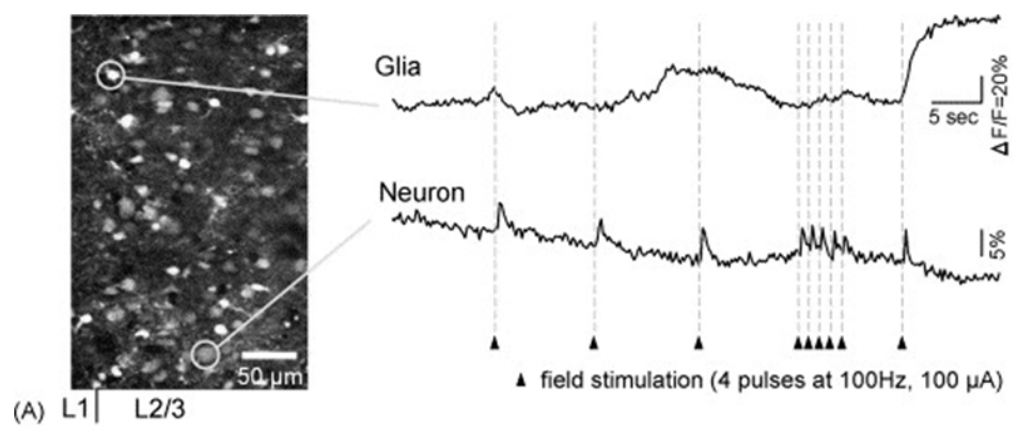


図 1.8 光学イメージング (Ikegaya, Le Bon-Jego, and Yuste 2005)

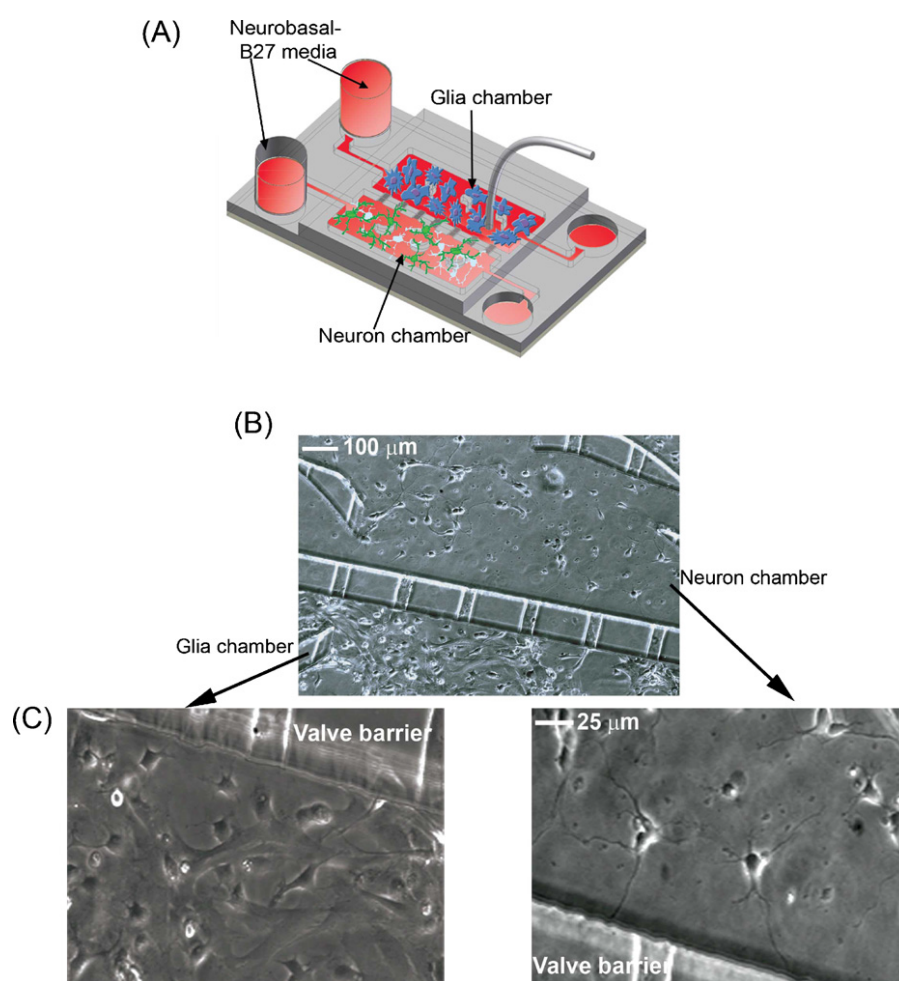


図 1.9 神経細胞とグリア細胞の共培養 (Majumdar et al. 2011)

1.1.5 マイクロデバイスを用いた青斑核-海馬共培養系の有用性

これまでの先行研究や現状の問題点をふまえると、MEA と PDMS を組み合わせたマイクロデバイスを用いて、多様な神経調節作用や VNS の作用において肝要な青斑核と情報処理を司り、てんかん焦点になる傾向を持つ海馬の共培養系を構築することは、現在不明な点が多い、当該部位間の局所的な相互作用を評価するために有用であると考えられる。

その理由は以下のとおりである。2 つの培養区画と区画間をつなぐ通路を保持した PDMS 構造物は青斑核と海馬を分離して培養しつつも、当該部位の結合を形成させることが可能である。また、MEA を用いた多点同時電気計測は、同期活動であるてんかん様活動やネットワークバーストといった神経回路レベルの活動、メゾスコピックな機能の評価することを可能とする。さらに、非侵襲性の高さから実現できる長期培養は、神経調節や VNS の短期的な効果のみならず、長期的な効果における青斑核と海馬の役割の明確化に寄与することができる。最後に、電気刺激可能な点は、VNS における刺激効果の検証と刺激条件の最適化や刺激に応じた神経回路網の情報処理や学習の効果検証に貢献できる。

これらの理由からマイクロデバイスを用いた青斑核-海馬共培養系の構築は極めて有用であると考えられる。

1.2 目的

1.1 に記述した背景をふまえて、本研究では、青斑核の神経調節作用や VNS における抗てんかん作用メカニズムの解明に向けて、青斑核と記憶や情報処理を司り、てんかん焦点になる傾向をもつ海馬の相互作用を局所的に評価する、マイクロデバイスを用いた青斑核-海馬共培養系の構築を目的とした。

目的を達成するため、本研究では以下の項目を行った。

1. 成熟した培養神経回路網に対するノルアドレナリンの添加

青斑核と海馬の共培養系のダイナミクス評価に対して、海馬に対するネットワークレベルでのノルアドレナリンの効果に関する基礎的な知見を得るため、MEA 上に培養された成熟した海馬由来神経回路網に対してノルアドレナリンを添加し、その影響を評価した。

2. ノルアドレナリンの効果に関する系統的な評価

海馬に対するネットワークレベルでのノルアドレナリンの効果に関する基礎的な知見の獲得に向けて、成熟した培養神経回路網に対するノルアドレナリンの影響に加えて、系統的にノルアドレナリンの効果の評価するため、培養神経回路網のダイナミクスが変化する発達過程における影響、ノルアドレナリンの濃度変化に対する影響、アドレナリン受容体アゴニスト添加によるダイナミクス変化の評価を行った。

3. 青斑核単独培養系の構築

青斑核と海馬の共培養系の構築に向けて、培養方法が確立されていなかった MEA を用いた青斑核の培養を行い、そのダイナミクスを評価した。

4. 青斑核-海馬共培養系の構築

独自に設計し、作製した MEA と PDMS 構造物を組み合わせたデバイスを作製し、青斑核単独培養系の構築にて得られた知見を活用して青斑核と海馬の共培養を行い、培養神経回路網に対するノルアドレナリンの影響をふまえて、そのダイナミクスについて評価した。

1.3 論文の構成

本論文の構成を以下に述べる.

第1章では, 本研究の背景と目的を述べた.

第2章では, 培養神経回路網に対するノルアドレナリンの効果を明らかにするため, 成熟した培養神経回路網に対してノルアドレナリンを添加し, その影響に関する評価について述べる.

第3章では, 第2章で得られた知見をもとに, 発達過程におけるノルアドレナリンの効果, 濃度の変化による効果を評価し, 効果に関わる受容体を推定するため, アゴニストの添加による効果の評価について述べる.

第4章では, 青斑核を MEA 上で培養するための方法, 青斑核由来培養神経回路網のダイナミクスに関する評価について述べる.

第5章では, 第4章に記述された確立した培養方法を用いて, 青斑核と海馬の共培養系の構築に関する方法, 共培養系におけるダイナミクスに関する評価について述べる.

第6章では, 本研究の結論と今後の展望について述べる.

第2章 成熟した培養神経回路網に対するノルアドレナリンの添加

2.1 概要	18
2.2 方法	19
2.2.1 細胞培養	19
2.2.2 細胞外電位計測	20
2.2.3 実験プロトコル	21
2.2.4 スパイク解析	22
2.2.5 単電極バースト解析	24
2.2.6 ネットワークバースト解析	26
2.2.7 フーリエスペクトル解析	29
2.3 結果	30
2.3.1 スパイク解析	30
2.3.2 単電極バースト解析	32
2.3.3 ネットワークバースト解析	39
2.3.4 フーリエスペクトル解析	46
2.4 考察	47
2.4.1 NE の活動抑制効果	47
2.4.2 NE 添加後のネットワークバースト減少	48
2.4.3 作用時間と添加濃度における NE の効果	49
2.4.4 NE 添加後に見られた周期的な活動	49
2.5 結論	51

2.1 概要

青斑核から海馬に対する影響に関する基礎的知見を得るため、海馬の活動に対するノルアドレナリン (NE; norepinephrine) 添加による、細胞レベル、ネットワークレベルの影響を評価した。

具体的には、MEA を用いて、ラット新生児由来の海馬神経細胞から構成される神経回路を 4 週間以上培養し、NE の複数添加を行い、その活動を計測した。そして、その NE 添加による活動の変化を、スパイク、単電極におけるバースト (単電極バースト)、ネットワークバースト、フーリエスペクトルに着目して評価した。スパイク、単電極バースト、ネットワークバーストに関しては培養神経回路網の活動を多角的に評価するために用いた。また、フーリエスペクトルは、NE 添加による活動への特徴的な影響を定量化するために用いた。

2.2 方法

2.2.1 細胞培養

Wistar ラット新生児から摘出された海馬由来神経細胞を MEA (図 2.1) 上で培養した。以下、その手順について記述する。

4～6 日齢 Wistar ラット新生児から海馬を摘出し、0.25% Trypsin (Life Technologies 社) で酵素処理し、単離し、MEA 上に単離した細胞を約 50 万個播種した。MEA は 8×8 で 250 μ m おきに配置された、大きさ 30 μ m×30 μ m の電極パターンのものを用いた (図 2.1) (Jimbo et al. 2003)。また、MEA は 0.1% Polyethyleneimine (和光純薬工業社) を用いて細胞接着性を向上させる表面処理を施した。基本培地には Neurobasal medium (Life Technologies 社) に 2 % B-27 Supplement (Life Technologies 社), 1% GlutaMAX (Life Technologies 社), 100 unit/ml Penicillin-Streptomycin (Life Technologies 社) を添加した溶液を用いた。細胞播種時のみ、基本培地と馴化培地を 1:1 の比率で混合した溶液を用いた。馴化培地には基本培地を Wistar ラット新生児大脳皮質由来の神経回路の培養に 1～2 週間使用したのものを用いた。そして、全て 37 °C ・ 水蒸気飽和 ・ 5 % CO₂ 条件のインキュベータ内で培養し、3～4 日に 1 回半量培地交換を行った。

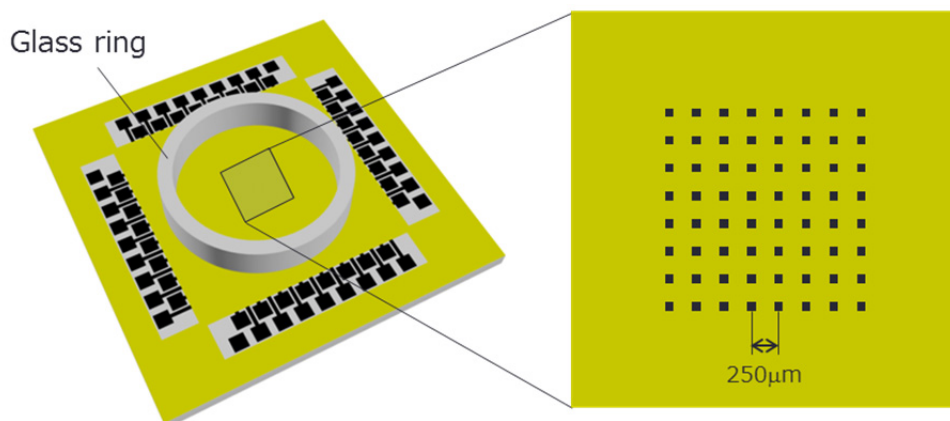


図 2.1 MEA

2.2.2 細胞外電位計測

Jimbo らが構築した MEA 計測システム (Jimbo et al. 2003) を用いて、培養神経回路網の細胞外電位計測を行った (図 2.2). MEA 上の 64 電極から得られる信号をプリアンプで 20 倍し、アナログバンドパスフィルタ (100~3000 Hz) に通し、メインアンプで 1000 倍した。そして、その信号をサンプリング周波数 25kHz で A/D 変換し、コンピュータ内のハードディスクに保存した。

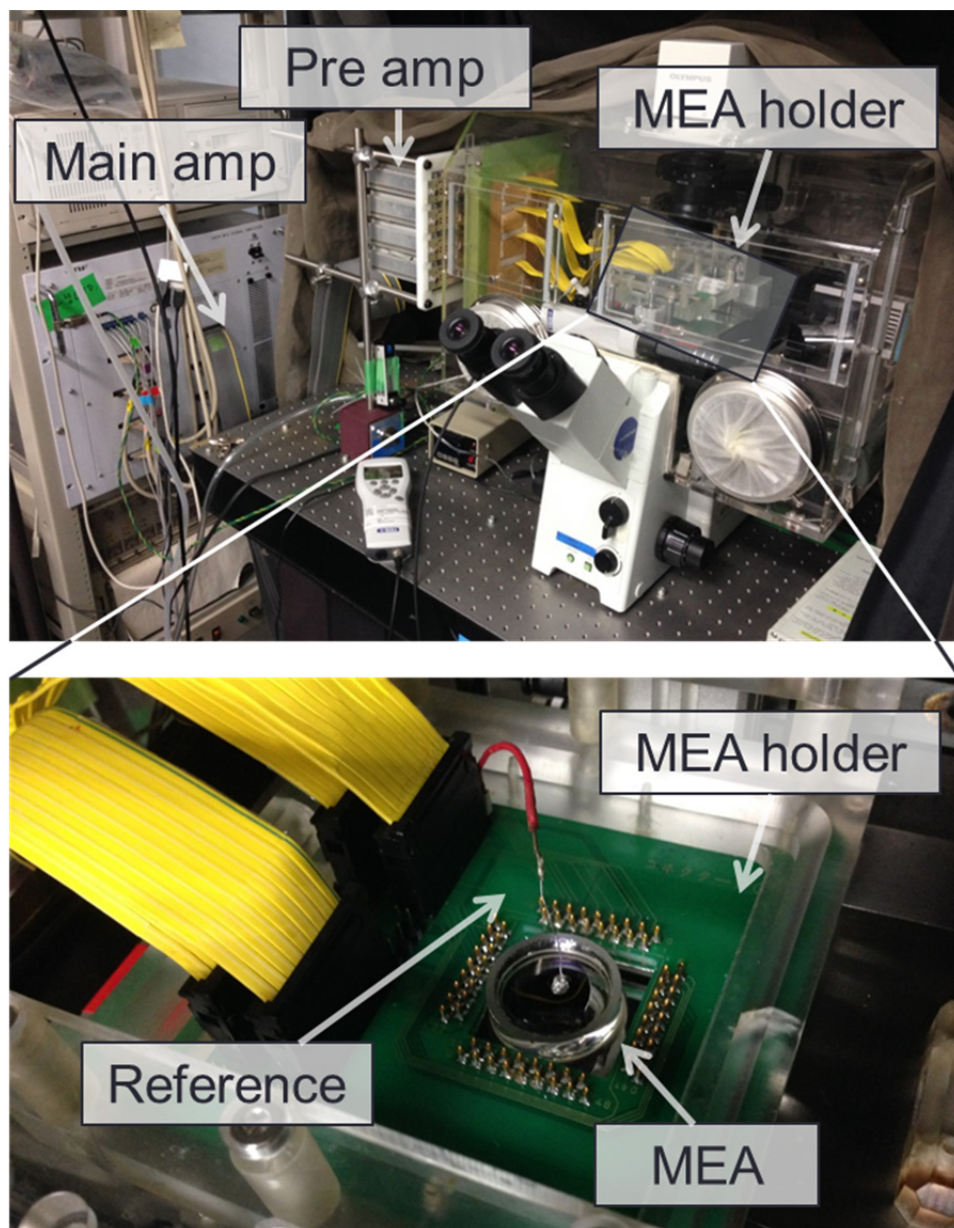


図 2.2 MEA 計測系

2.2.3 実験プロトコル

試料移動による活動の変動の安定化を目的に、試料を計測システムに移動後 5 分間静置した後、計測を開始した。開始 15 分間は自発活動を計測し、その後、2mM NE 溶液を 2 μ l 添加して（最終 NE 濃度: 10 μ M），15 分間活動を計測することを連続して 4 回続けた。つまり NE を計 4 回添加し、試料内の最終 NE 濃度を 10 μ M, 20 μ M, 30 μ M, 40 μ M と増加させた。NE 溶液にはノルエピネフリン重酒石酸塩一水和物（Sigma-Aldrich 社）を Hanks' Balanced Salt Solution（HB）に溶解させたものを用いた。またコントロールとして、NE ではなく HB を同様のプロトコルで添加し、自発活動を計測した。NE の添加には 30～31 DIV (Days *in vitro*) の 5 試料、HB の添加には 31 DIV の 5 試料を用いた。便宜上、自発活動を計測している状態、NE / HB を 1, 2, 3, 4 回添加して計測している状態をそれぞれ、S, N1/H1, N2/H2, N3/H3, N4/H4 と記述した。

図 2.3 に前述の実験プロトコルを図示した。図内の NE / HB はその時点で NE または HB を添加したこと、灰色の線は解析に用いたデータの時間区間、灰色の線の上に書かれている記号は計測している状態を表している。

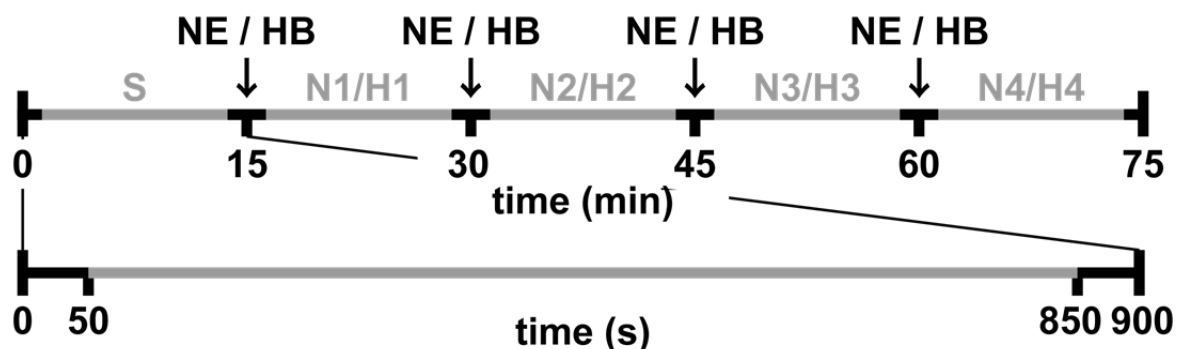


図 2.3 実験プロトコル

2.2.4 スパイク解析

計測データからスパイクを検出し、各状態 (S, N1~4, H1~4) におけるスパイク数を比較した。解析に用いる計測データは、添加作業の影響を除くため、計測開始または NE 添加 50 秒後から 800 秒間のデータを用いた (図 2.3)。また、ノイズの多い電極は解析から除いた。本節では、スパイクの検出方法、平均発火率の算出方法、各状態間での比較方法について述べる。

2.2.4.1 スパイク検出

ノイズ除去を目的とし、各電極の計測データに対して 300~2000Hz のバンドパスフィルタを適用した。後述する閾値を下に超える計測データをスパイクとして数え、超えた時刻をスパイク時刻とした (図 2.4)。スパイクの重複検出の除去を目的に、検出されたスパイクから 0.5ms 以内に検出されたスパイクは除去した。閾値は計測ノイズの推定標準偏差の 5 倍とした。具体的な算出方法は以下のとおりである。

閾値を *threshold* , フィルタを適用した計測データを x , $\text{median}(|x|)$ を x の絶対値の中央値とすると、閾値はノイズの推定標準偏差の 5 倍として、以下のように表せる (Quiroga, Nadasdy, and Ben-Shaul 2004; Takekawa, Isomura, and Fukai 2010)。

$$\text{threshold} = -5\hat{\sigma} \quad , \quad \hat{\sigma} = \frac{\text{median}(|x|)}{0.6745} \quad (1)$$

スパイクが連続的に発生する場合、全ての計測データを使って標準偏差を算出すると、算出するデータにノイズのみならずスパイクが存在しているため、算出された標準偏差はノイズの標準偏差よりも値が大きくなってしまう。そこで、中央値を用いることでロバストにノイズの標準偏差を推定することができる。

ここで、0.6745 の算出方法について説明する。ノイズデータは、サンプリングレートが 25kHz と高くデータ数が多いことから、正規分布に従うと考えられる。ここで、正規分布に従うノイズの絶対値の分布における標準偏差と中央値には以下の関係式が成り立つ。

$$\begin{aligned} \text{絶対値ノイズ分布の標準偏差} &= \frac{\text{絶対値ノイズ分布の中央値}}{\text{標準正規分布の第3四分位}} \\ &\approx \frac{\text{絶対値ノイズ分布の中央値}}{0.6745} \end{aligned} \quad (2)$$

この標準偏差と中央値の関係性を用いることにより、中央値を用いてロバストにノイズの標準偏差を推定することができる。

2.2.4.2 平均発火率算出

各電極の計測データから平均発火率を算出した。ここで平均発火率は、計測データを時間区間幅 (bin 幅) 1 秒で分割し、平均発火率を算出したい時刻における bin と前後 5 つの bin を用いて総スパイク数を算出し、bin 数で割ることで算出した。つまり、ある時刻における前後 11 秒間を用いた平均発火率を算出した。そして、さらにそれら各電極の平均発火率を用いて、全電極における平均発火率を算出した。

2.2.4.3 各状態間比較

単電極あたりのスパイク数は正規性が保証されない (本実験で用いた S における計測データから算出されたスパイク数の 1 標本コルモゴロフ・スミルノフ検定は有意水準 0.001 で帰無仮説が棄却される $p=4.8 \times 10^{-175}$)。そこで、各状態 (S, N1~4, H1~4) における電極におけるスパイク数の比較 (${}_5C_2 = 10$ 通り) を Wilcoxon rank sum test で行った。多重比較の補正には Bonferroni 補正を用いた。

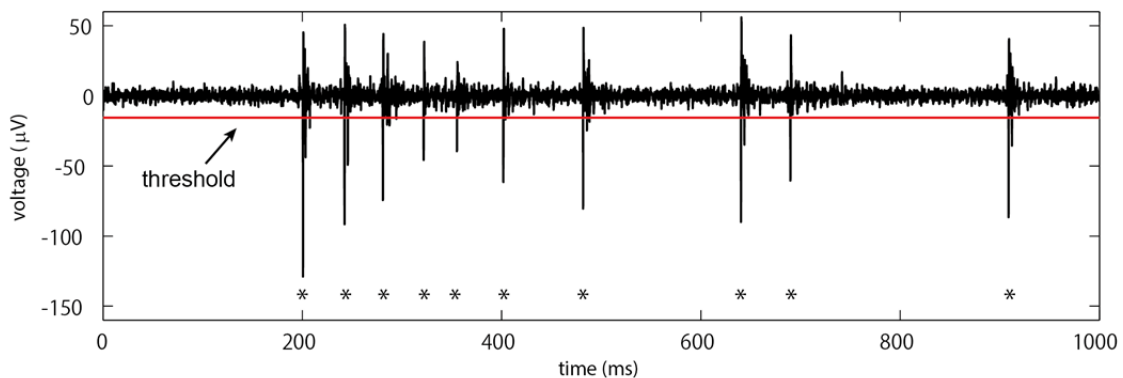


図 2.4 スパイク検出

2.2.5 単電極バースト解析

単電極におけるバーストは Chiappalone らの方法 (Chiappalone et al. 2005) を参考にして検出した。そして NE の効果を多角的に評価するため、バーストの特徴量として、バースト数、バースト時間、バースト内スパイク数、バースト間隔、バースト率を算出し、各状態間で比較した。

2.2.5.1 単電極バースト検出

単電極バーストの検出には Chiappalone らの方法を用いた (Chiappalone et al. 2005) (図 2.5)。パラメータは、バースト内スパイクの最長時間間隔 (ms) を表す maxISI とバースト内スパイク数の下限を表す minSpikes の 2 つが存在する。ここで、maxISI ms 以下のスパイク間隔で minSpikes 個以上続くスパイク列を単電極バーストとして検出する。

2.2.5.2 パラメータ感度分析

Chiappalone らは、単電極バーストを検出する際、明確な基準は示されていないものの実験データを用いてパラメータ maxISI, minSpikes をそれぞれ 100ms, 10 と設定したとしている (Chiappalone et al. 2005)。そこで、それらを基本パラメータ値として、本実験系におけるパラメータを設定するため、NE を添加した全試料を用いて、maxISI のみを 50ms, 100ms から 100ms おきに 1000ms と変化させた場合と minSpikes のみを 2 から 2 おきに 20 まで変化させた場合で単電極バーストを検出し、結果に対するパラメータの依存性を評価した。

2.2.5.3 単電極バースト特徴量算出

バースト数は計測データ内で検出されたバーストの数、バースト時間はバースト内の最初のスパイク時刻から最後のスパイク時刻までの時間、バースト内スパイク数はバースト内の総スパイク数、バースト間隔 (IBI; inter-burst interval) はあるバースト内の最初のスパイク時刻から 1 つ前のバースト内の最後のスパイク時刻の差分として算出した。

また、Wagenaar らの burstiness index (Wagenaar et al. 2005) を参考にして、神経細胞の活動に対してバーストの占める割合を示す単電極バースト率を以下のように算出した。単電極で検出されたバーストを構成するスパイク数を全て足しあわせ、単電極で検出された全スパイク数で割ることで、バースト率を算出した。

$$\text{単電極バースト率} = \frac{\text{単電極におけるバースト内スパイク数}}{\text{単電極における全スパイク数}} \quad (3)$$

この値が 1 に近いほど、神経細胞の活動はバースト支配的であり、0 に近いほどバーストがないことを示す。

2.2.5.4 各状態間比較

電極におけるスパイク数の正規性が保証できないため、各状態 (S, N1~4, H1~4) における比較を Wilcoxon signed-rank test, Bonferroni 補正を用いて行った。比較の対象は、単電極バースト特徴量とした。ここで、バースト時間、バースト内スパイク数、バースト間隔は、バースト数、バースト率と異なり、各状態の各電極における計測データにつき 1 つの値が対応せず、複数の値が対応する。例えば、S におけるある電極から算出されたバースト数は 1 つの値だが、バースト時間、バースト内スパイク数はバースト数分、バースト間隔は (バースト数-1) 分存在し、1 つの分布が対応する。そこで、各状態で比較するため、その状態をロバーストに表す代表値と考えられる中央値を用いて比較を行った。またバースト時間、バースト内スパイク数、バースト間隔に関しては、バーストが発生していない時は比較ができないため、バーストを検出できなかった電極に関しては比較対象から除いた。

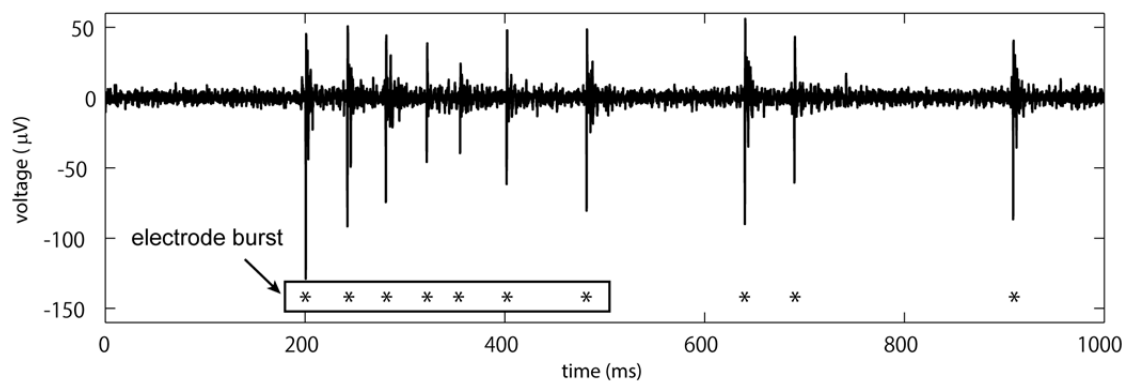


図 2.5 単電極バースト検出

2.2.6 ネットワークバースト解析

ネットワークバーストは Pelt らの方法 (Chiappalone et al. 2005; van Pelt et al. 2004) を参考にして検出した (図 2.6). そして NE の効果を多角的に評価するため, バースト特徴量として, バースト数, バースト時間, バースト内スパイク数, バースト参加電極数, バースト間隔, バースト率を各状態間で算出し, 比較した.

2.2.6.1 ネットワークバースト検出

最初に, 計測データのある時間区間 (bin) で区切り, それぞれの bin に対してその中に入るスパイク数とスパイクが検出された電極数 (参加電極数) を算出した. そして, そのスパイク数と参加電極数をかけた値 `product` が, 閾値 `pth` を超えた bin を, ネットワークバーストを構成する bin として検出した. さらに, その bin の `product` の boundary rate (br) 倍以下の `product` になる前後の bin もネットワークバーストを構成する bin とし, それらの bin の集合をネットワークバーストとして検出した.

2.2.6.2 パラメータ感度分析

Pelt らはネットワークバーストを検出する際, bin, br をそれぞれ 25ms, 0.05 と固定し, 実験データから `pth` を 9 と設定していた (van Pelt et al. 2004). そこで, それらを基本パラメータ値として, 本実験系におけるパラメータを設定するため, NE を添加した全試料のデータを用いて, bin 幅のみを 10ms から 15ms おきに 100ms と変化させた場合と `pth` のみを 4, 9, 16, 25, 36 と変化させた場合と br のみを 0.01, 0.05, 0.1, 0.2 と変化させた場合でネットワークバーストを検出し, 結果に対するパラメータの依存性を評価した.

2.2.6.3 ネットワークバースト特徴量算出

バースト数は計測データ内で検出されたバーストの数, バースト時間はネットワークバーストの開始 bin から終了 bin までの時間, バースト内スパイク数はバーストに参加した総スパイク数, バースト参加電極数はバーストに参加した総電極数, バースト間隔はあるバーストの最初の bin の時刻から 1 つ前のバースト内の最後の bin の時刻の差分として算出した.

ネットワークバースト率は, 単電極バースト率の算出と基本的には同様, Wagenaar らの burstiness index (Wagenaar et al. 2005) を参考にして算出した. ここで, 単電

極バースト率とは異なり，単電極におけるスパイク数ではなく，全電極におけるスパイク数を用いた．

$$\text{ネットワークバースト率} = \frac{\text{全電極におけるバースト内スパイク数}}{\text{全電極における全スパイク数}} \quad (4)$$

2.2.6.4 各状態間比較

各状態(S, N1~4, H1~4)における比較を Wilcoxon signed-rank test を用いて行った．比較の対象は，バースト数，バースト時間，バースト内スパイク数，バースト参加電極数，バースト間隔，バースト率とした．ここで，バースト時間，バースト内スパイク数，バースト参加電極数，バースト間隔は，単電極バーストの時と同様の議論で，各状態の中央値を用いて比較を行った．ネットワークバーストの場合，電極ごとではなく試料ごとに比較するため，スパイク解析や単電極バースト解析の時に比べて，検定に用いる標本数が著しく低くなる．そこで，ネットワークバーストに関しては最も興味のある，S と N1~4 の 4 状態を比較することとした．そうすることで多重比較の数を減らし，Bonferroni 補正による過剰な補正を抑えた．

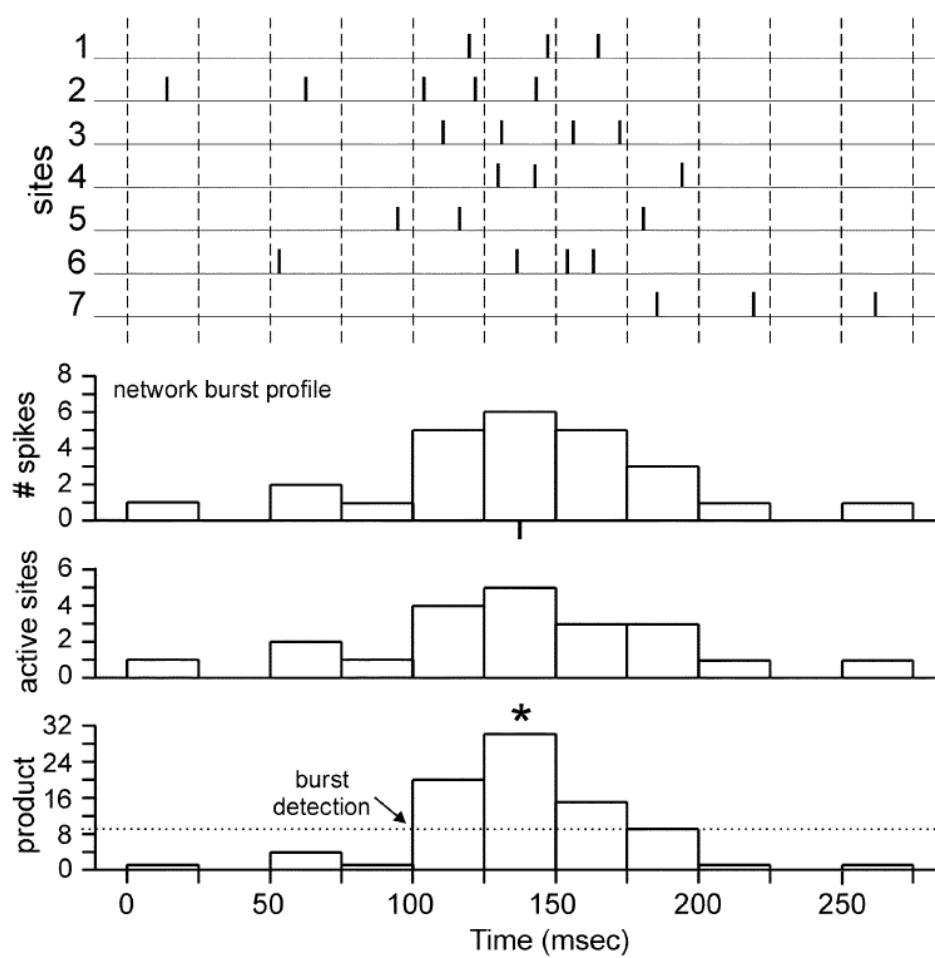


図 2.6 ネットワークバースト検出 (van Pelt et al. 2004)

2.2.7 フーリエスペクトル解析

NE による活動パターン変化を定量的に評価することを目的に，平均発火率を算出してから，正規化されたフーリエスペクトルを算出した．

2.2.7.1 平均発火率算出

各電極の計測データを時間区間 (bin) 幅 1 秒で分割し，各 bin におけるスパイク数を算出し，平均発火率の時系列データを算出した．

2.2.7.2 正規化フーリエスペクトル算出

各電極の平均発火率の時系列データから平均値を引いたデータを用いて，離散フーリエ変換を行った．平均値が 0 である時系列データを $x_n (n=0, \dots, N-1)$ ，フーリエ係数の絶対値を $X_k (k = 0, \dots, N-1)$ ，絶対値を算出する関数を `abs` とすると，関係は以下のように表せる．

$$X_k = \text{abs} \left(\sum_{n=0}^{N-1} x_n e^{-i2\pi k \frac{n}{N}} \right) \quad (5)$$

また，そこから得たフーリエスペクトルを全パワーで割ったものを正規化フーリエスペクトルとして算出した．

2.2.7.3 正規化フーリエスペクトル比較

正規化フーリエスペクトルの比較を Wilcoxon signed-rank test, Bonferroni 補正を用いて行った．

2.3 結果

2.3.1 スパイク解析

神経細胞のスパイクを検出し、平均発火率、スパイク数の算出、各状態におけるスパイク数の比較を行った。

2.3.1.1 平均発火率

NE 添加による活動変化の概観を把握するため、図 2.7 に、(a) は NE を添加した場合、(b) は HB を添加した場合の代表的な MEA における平均発火率の全有効電極平均 (AFR; average firing rate) を示す。縦軸は平均発火率、横軸は時間を示し、NE の 1, 2, 3, 4 回目の添加は横軸の 15, 30, 45, 60 min に対応している。NE を添加した場合、N1 では顕著な活動の変化は見られなかった。しかし、N2 から発火率のベースラインがさがり、神経細胞が発火する時間としない時間が交互に現れた。その周期は 15 分間で山が 5 つあることから、およそ 3 分 (180 秒) であった。そして、N2 以降では各状態間における顕著な活動の差は見られなかった。一方、HB を添加した場合、どの状態でも顕著な活動の差はみられなかった。

2.3.1.2 スパイク数比較

各状態における変化を定量的に評価するため、各状態における総スパイク数を算出し、比較を行った。図 2.8 に (a) は NE を添加した場合、(b) は HB を添加した場合におけるスパイク数の平均値を示す。横軸は各状態、縦軸は全電極のスパイク数の平均を表している。NE を添加した場合、N1~4, N2~4 におけるスパイク数はそれぞれ S, N1 に比べて有意に減少していた ($p < 0.001$)。一方、HB を添加した場合、どの状態でも有意な差はなかった。

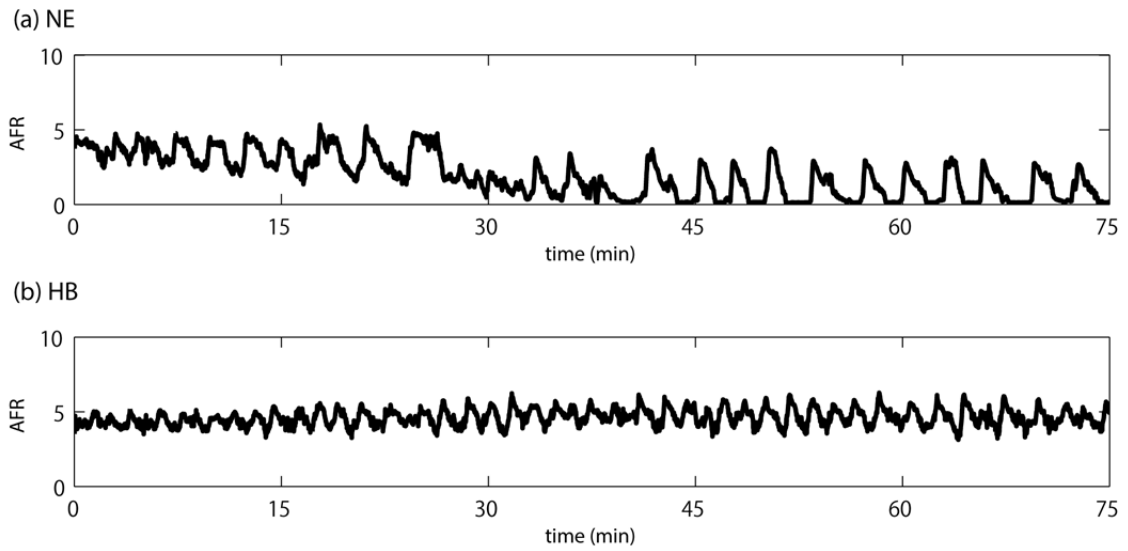


図 2.7 平均発火率

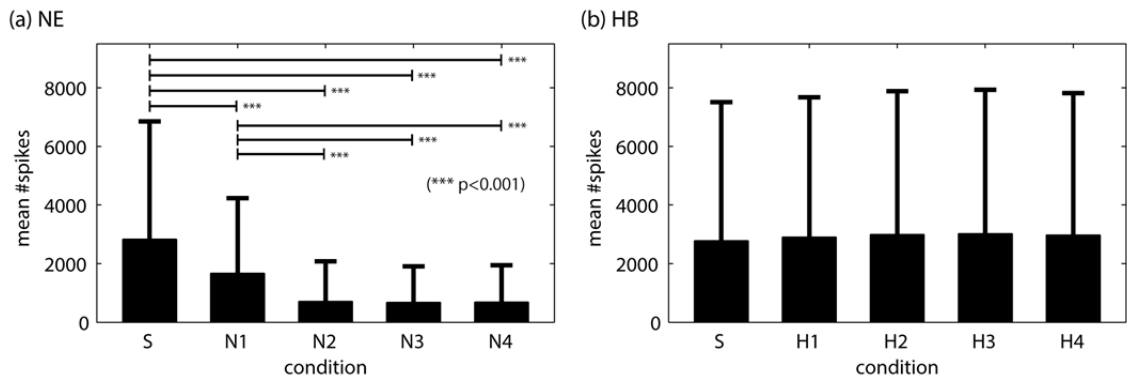


図 2.8 スパイク数

2.3.2 単電極バースト解析

2.3.2.1 パラメータ感度分析

基本パラメータ値をもとに、**maxISI** のみを 50ms, 100ms から 1000ms まで 100ms おきに変化させた際の各状態におけるバースト特徴量を図 2.9 に示す. バースト数については, いずれの状態も 300ms 付近で最大値をとっていた. バースト時間, バースト内スパイク数に関しては, **maxISI** が増えるに従って増加する傾向があり, 800ms 付近で N2 において急激な増加が確認された. バースト間隔に関しては, パラメータ値が大きくなるに従って減少傾向にあるが, 他の特徴量に比べてパラメータ値によって変動が大きかった. バースト率に関しては, **maxISI** が増えるに従って増加する傾向があった.

単電極バーストを検出する際, **maxISI** が小さいとバースト検出率は下がり, **maxISI** が大きいと複数のバーストを 1 つのバーストとして検出する可能性が高まると考えられる. 実際, **maxISI** が 300ms まではバースト数が増加し, 300ms 以降はバースト数が減少することが確認された. また, **maxISI** を増加させると N2 のデータにおいて 800ms で急激にバースト時間やバースト内スパイク数が増加しており, 800ms に設定すると複数のバーストを 1 つのバーストとして検出している可能性が高くなることを示唆している. これらの結果と考察より, **maxISI** を 300ms に設定することで, バースト検出率を下げず, 適切にバースト検出できると考えられる. そこで, 本解析では **maxISI** として 300ms を用いることとした.

基本パラメータ値をもとに, **minSpikes** のみを 2 から 20 まで 2 おきに変化させた際の各状態におけるバースト特徴量を図 2.10 に示す. **maxISI** が増えるに従って, バースト数, バースト率は減少する傾向があり, バースト時間, バースト内スパイク数は増加する傾向が見られた. また, バースト間隔に関しては, パラメータ値が大きくなるに従って増加傾向にあるが, 他の特徴量に比べてパラメータ値によって変動が大きかった.

単電極バーストを検出する際, **minSpikes** が小さいとバースト検出率が上がり, **minSpikes** が大きいとバースト検出率が下がると考えられる. **minSpikes** の増加に伴い, バースト数, バースト率が減少し, バースト時間, バースト内スパイク数, バースト間隔は増加しており, パラメータ値特異的な変化は確認されなかった. これらの結果と考察から, Chiappalone らが設定した **minSpikes** のパラメータ値は妥当であ

と考え、本解析では、**min Spikes** として 10 を用いることとした。

ここで、バースト間隔については、他の特徴量に比べて **maxISI**, **minSpikes** いずれのパラメータの変化に対しても影響を受けやすいことは留意すべき点として挙げられる。

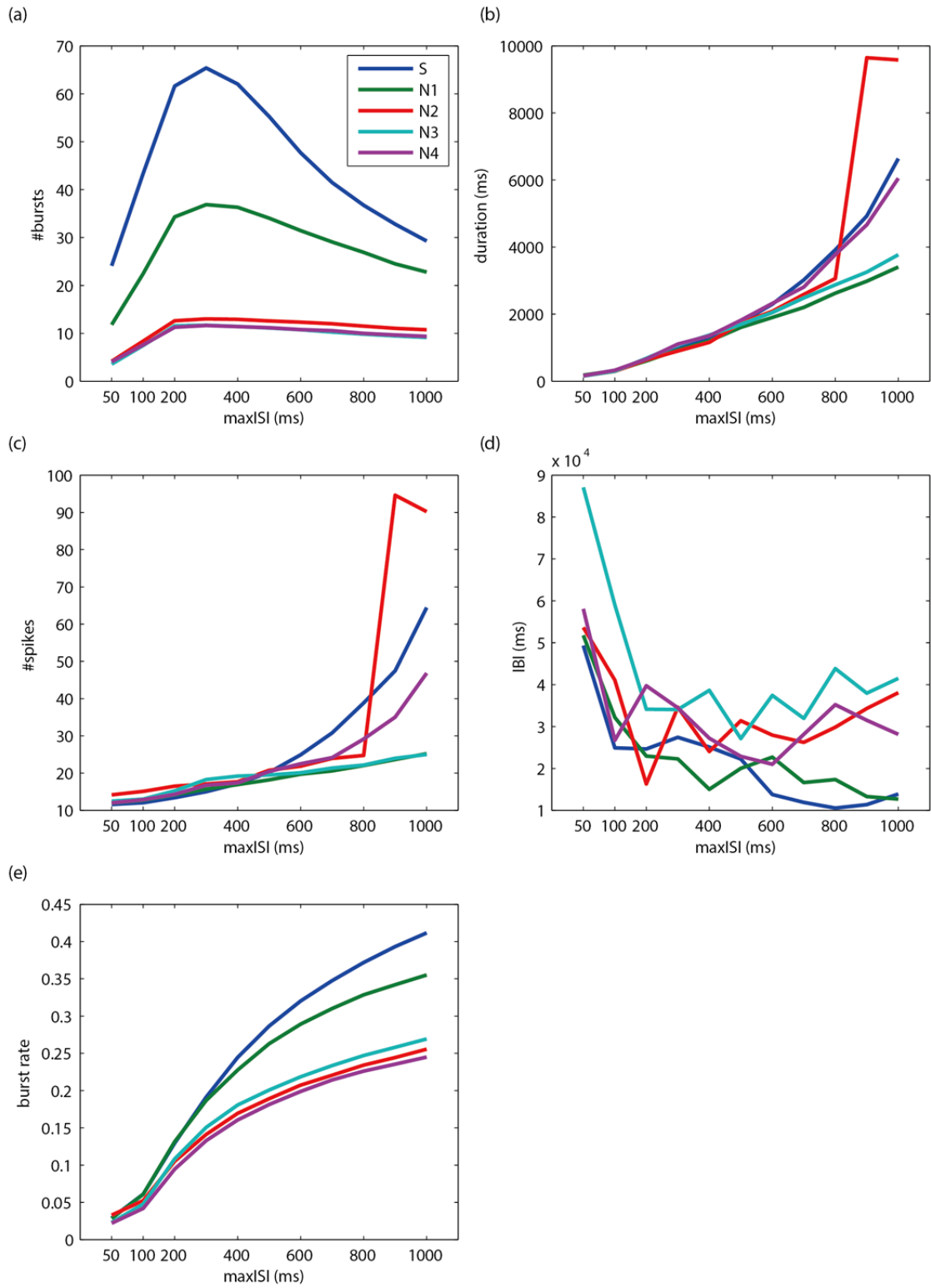


図 2.9 パラメータ感度分析 maxISI

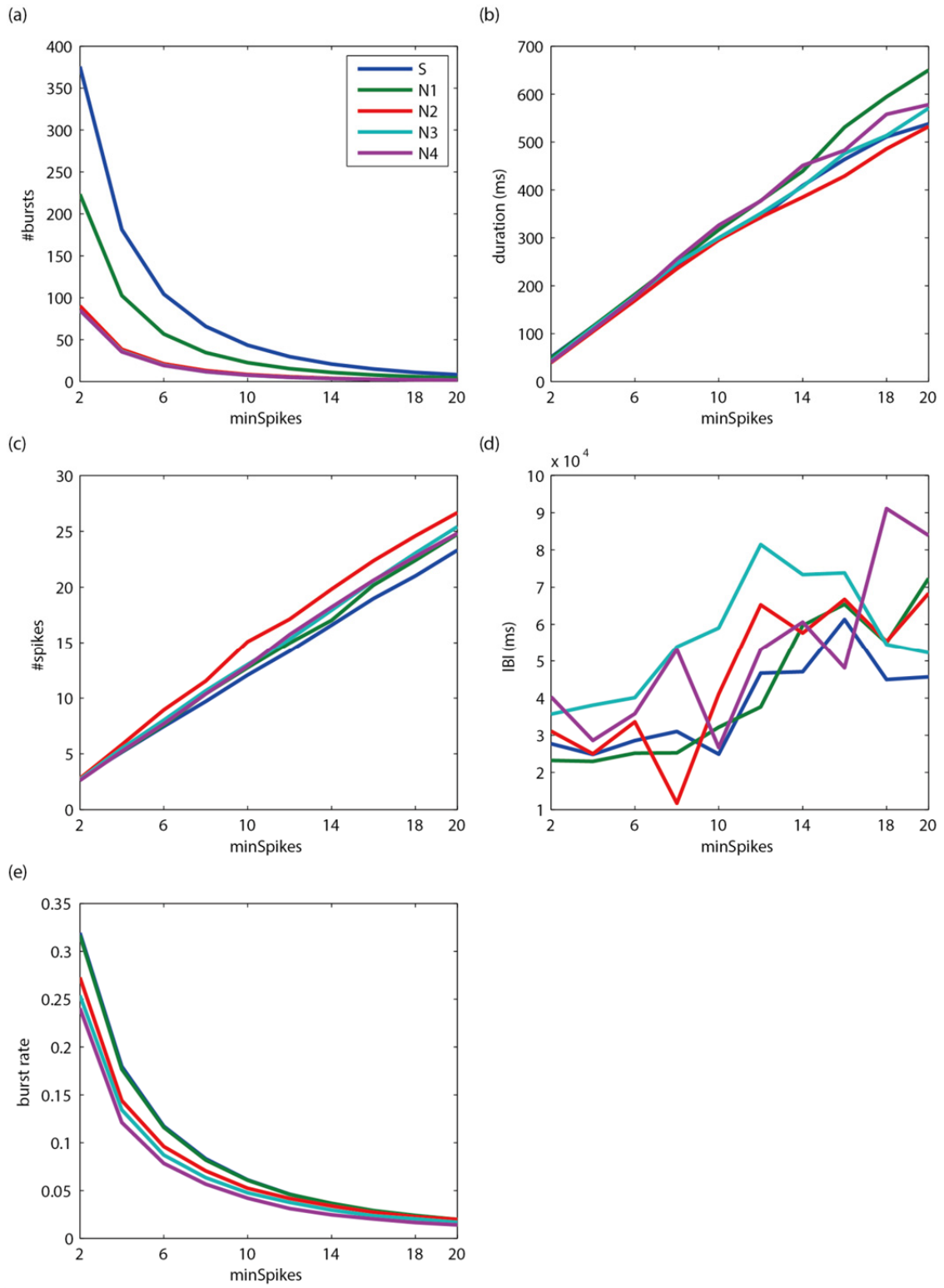
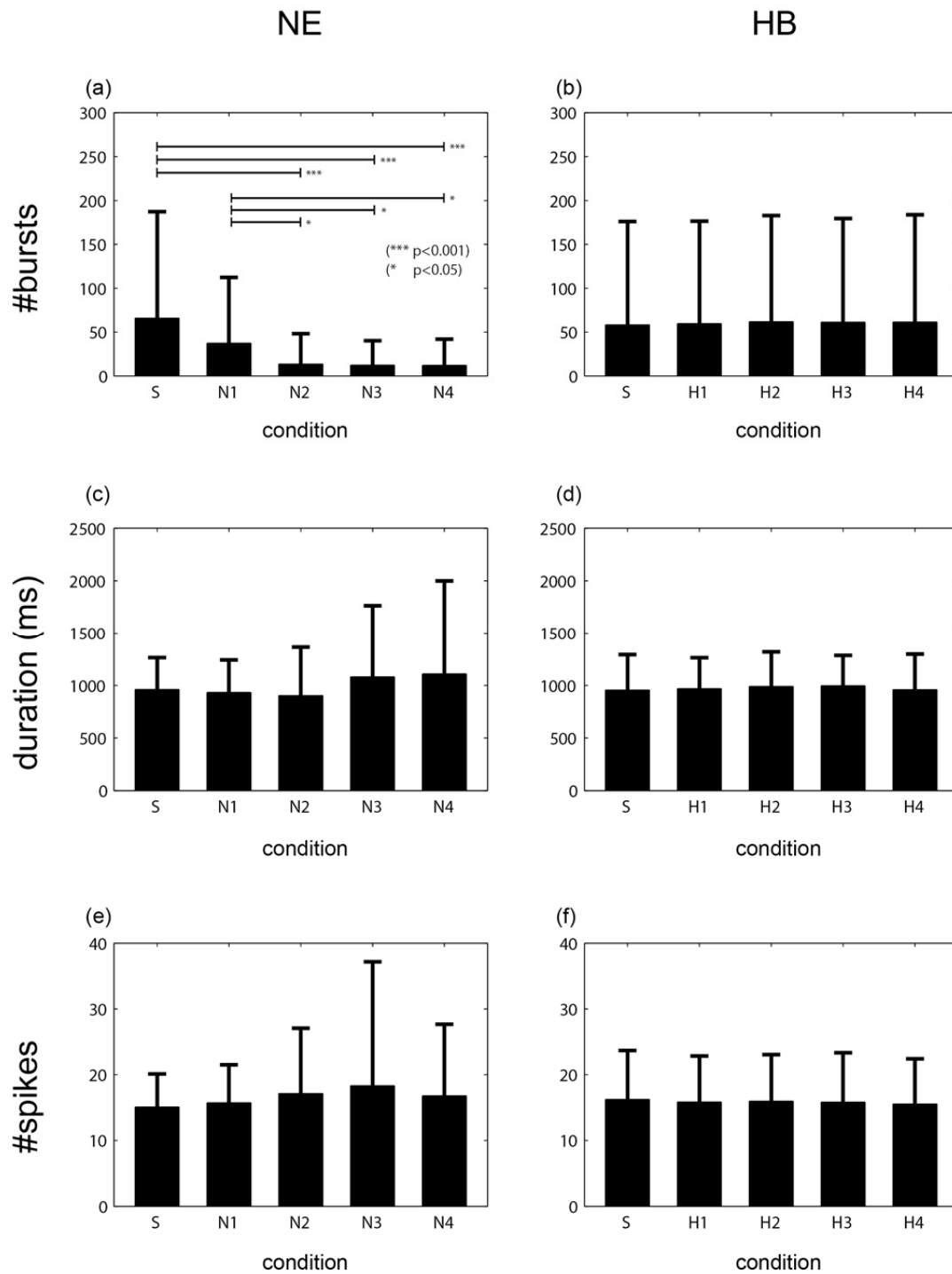


図 2.10 パラメータ感度分析 minSpikes

2.3.2.2 各状態間比較

2.3.2.1 の結果をもとに設定したパラメータを用いて、単電極におけるバースト活動を検出し、バースト数、バースト時間、バースト内スパイク数、バースト間隔、バースト率に着目し、各状態間比較を行った。その結果を図 2.11 に示す。(a), (c), (e), (g), (i) は NE を添加した場合、(b), (d), (f), (h), (j) は HB を添加した場合の各指標の平均を表している ($N_{NE}=5$, $N_{HB}=5$)。それぞれ横軸は各状態を表し、縦軸は (a), (b) はバースト数の電極平均、(c), (d) はバースト時間の電極平均、(e), (f) はバースト内スパイク数の電極平均、(g), (h) はバースト間隔、(i), (j) はバースト率の電極平均を表している。NE を添加した場合、S と N2~4, N1 と N2~4 の間で、バースト数が有意に減少していた。それ以外では、HB を添加した場合も含め、有意な差はなかった。



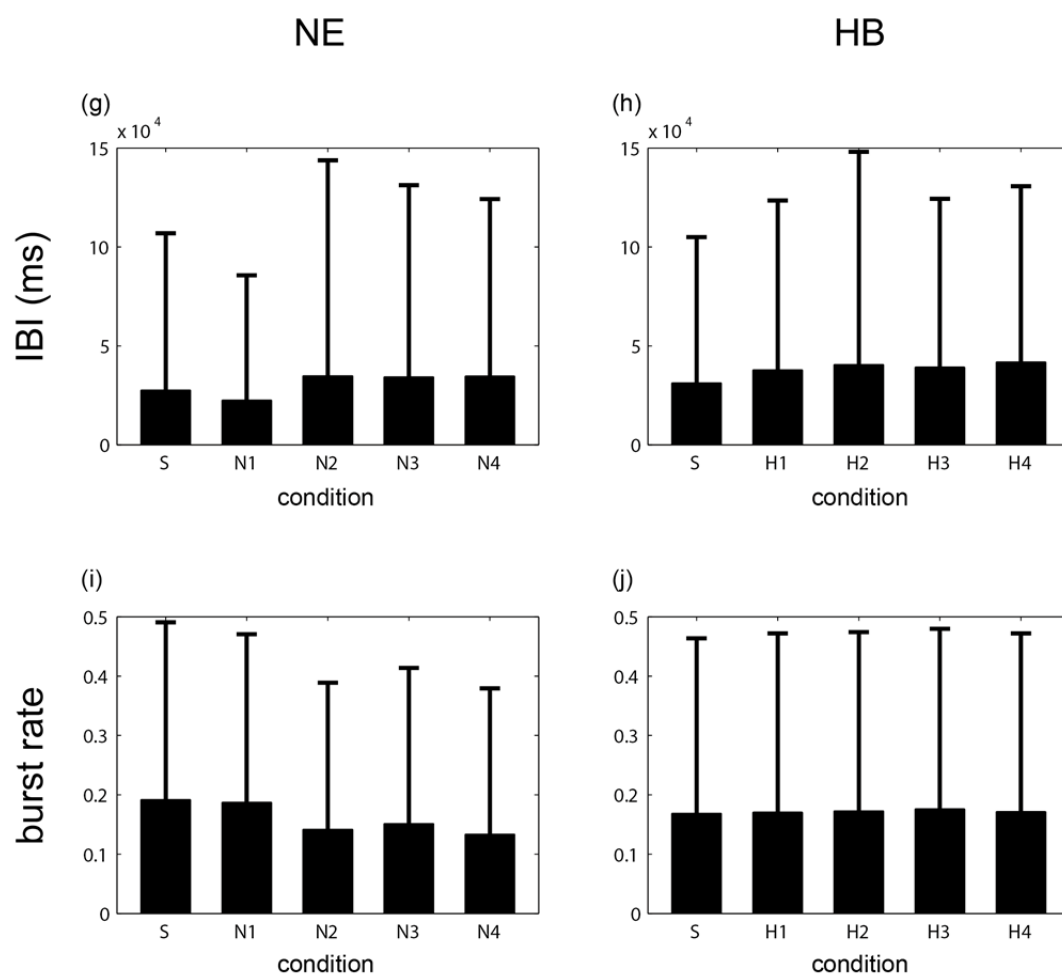


図 2.11 単電極バースト

2.3.3 ネットワークバースト解析

2.3.3.1 パラメータ感度分析

基本パラメータ値をもとに, bin のみを 10ms から 100ms まで 15ms おきに変化させた時, pth のみを 4, 9, 16, 25, 36 と変化させた時, rate のみを 0.01, 0.05, 0.1, 0.2 と変化させた時の各状態におけるバースト特徴量をそれぞれ図 2.12, 図 2.13, 図 2.14 に示す. bin の値が大きくなるに従って, バースト数が減少し, それ以外の特徴量は増加する傾向にあった. また, pth の値が大きくなるに従って, バースト数, バースト時間, バースト率が減少し, バースト内スパイク数, バースト参加電極数, バースト間隔は増加する傾向にあった. そして, rate の値が大きくなるに従って, バースト数が増加し, それ以外の特徴量は減少する傾向にあった.

bin の値が大きくなるに従って, 検出されるバースト数が下がり, バースト時間, バースト内スパイク数, バースト参加電極数, バースト率が単調に増加していた. このことから, bin が大きくなるとバーストとして認識されるスパイクデータの範囲が大きくなっていることが理解できる. また, pth の値が大きくなるに従って, バーストの検出率は下がると考えられる. 実際, バースト数は減少傾向にあった. そして, rate が大きくなるに従って, バースト検出率は上がると考えられ, 解析結果からバースト数が増加傾向になることが確認された.

ここで, いずれのパラメータ値を変化させたとしても, S, スパイク数が減少した N1, スパイク数が大きく減少した N2~N4 の 3 グループ間において, 各特徴量の大小関係には変化がなかった. つまり, 各特徴量の絶対値にはパラメータの値が影響を与えるが, 当該 3 グループ間の相対的な関係性には影響を与えないことが確認された. 本研究では, NE の効果を評価することを目的としているため, 各状態間の比較が肝要である. これらの結果と考察をふまえて, 先行研究で用いられたパラメータ値は妥当だと考え, 本解析では bin, pth, rate として, それぞれ 25ms, 9, 0.05 を用いることとした.

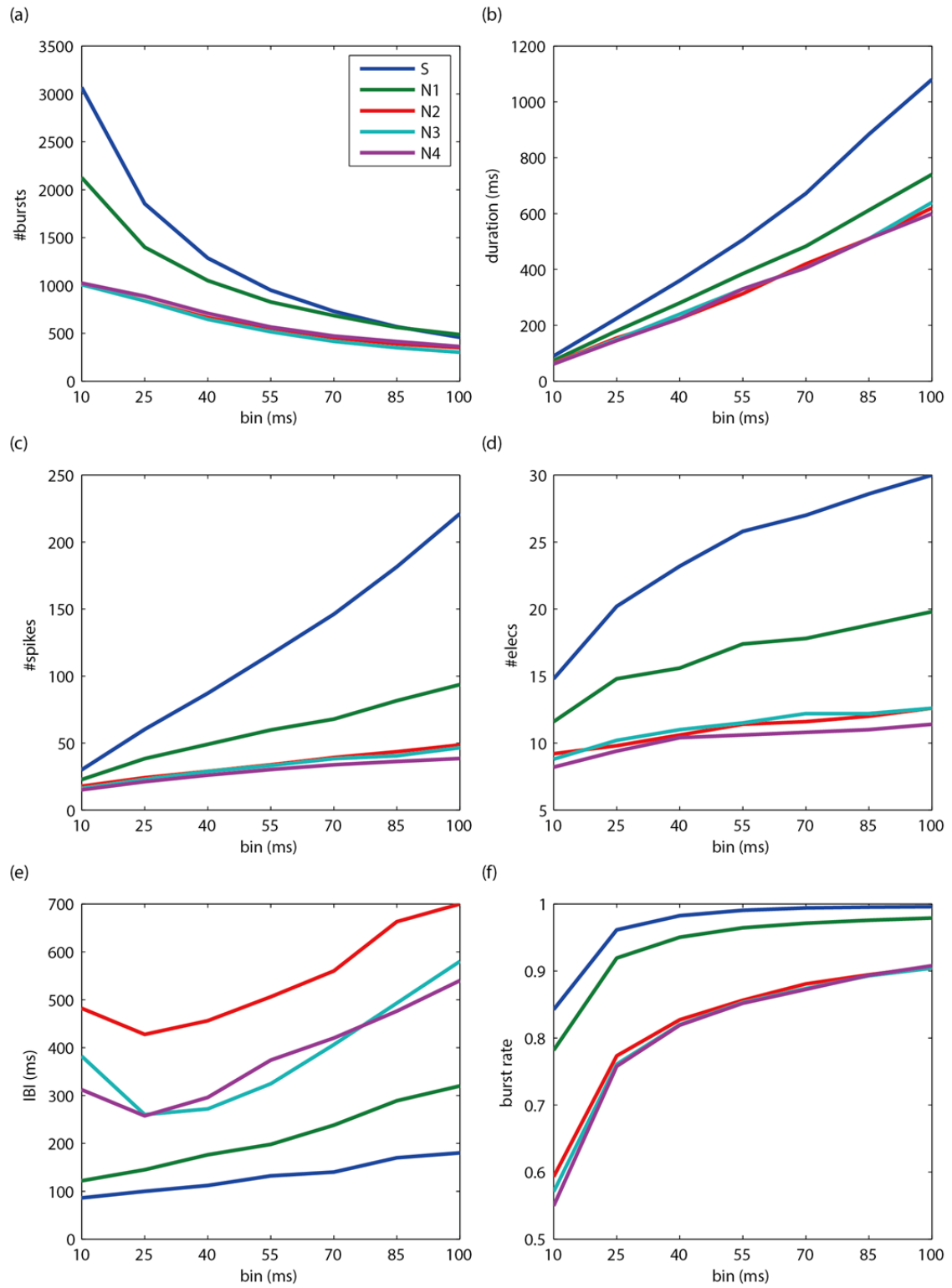


図 2.12 パラメータ感度分析 bin

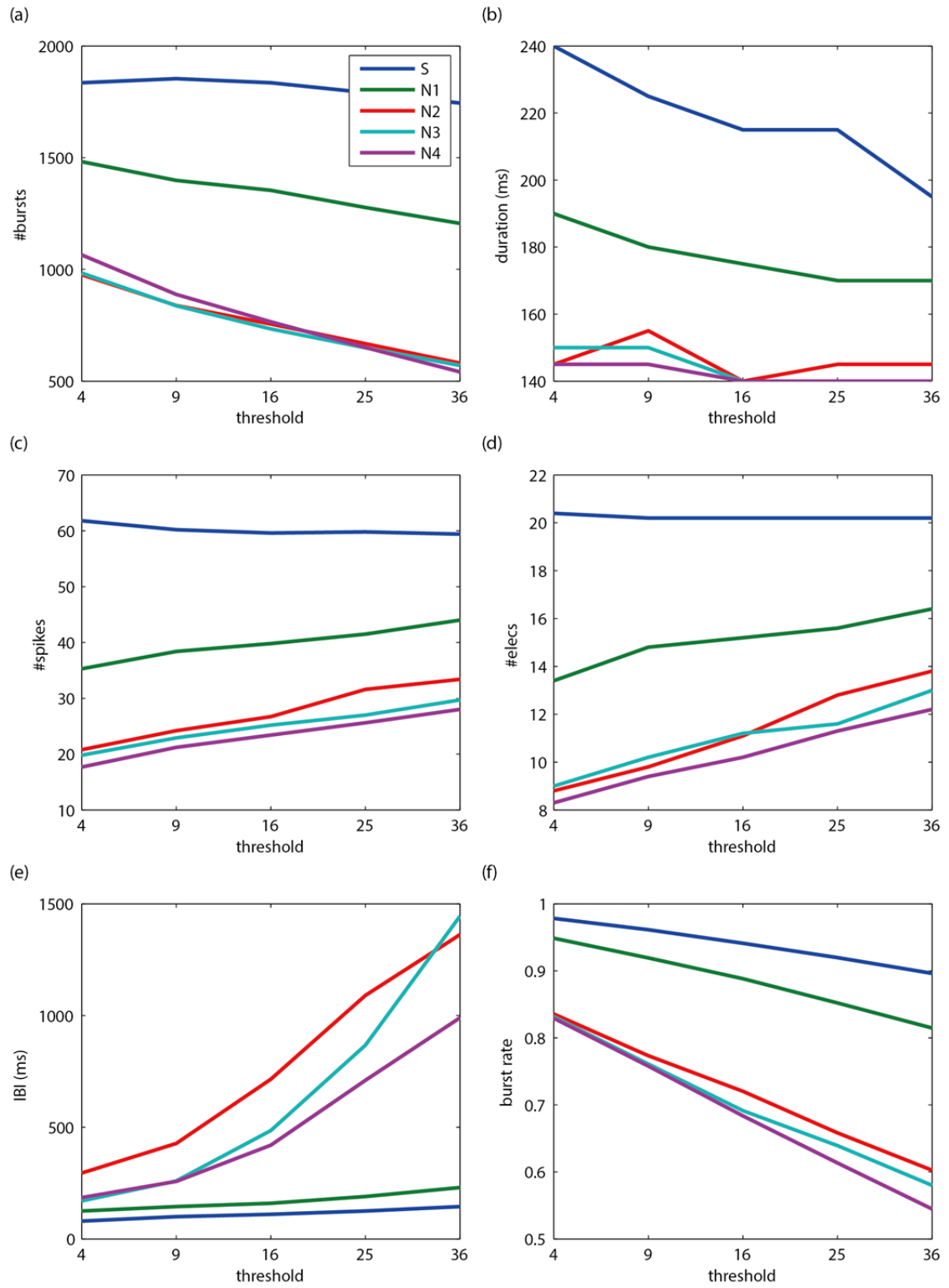


図 2.13 パラメータ感度分析 pth

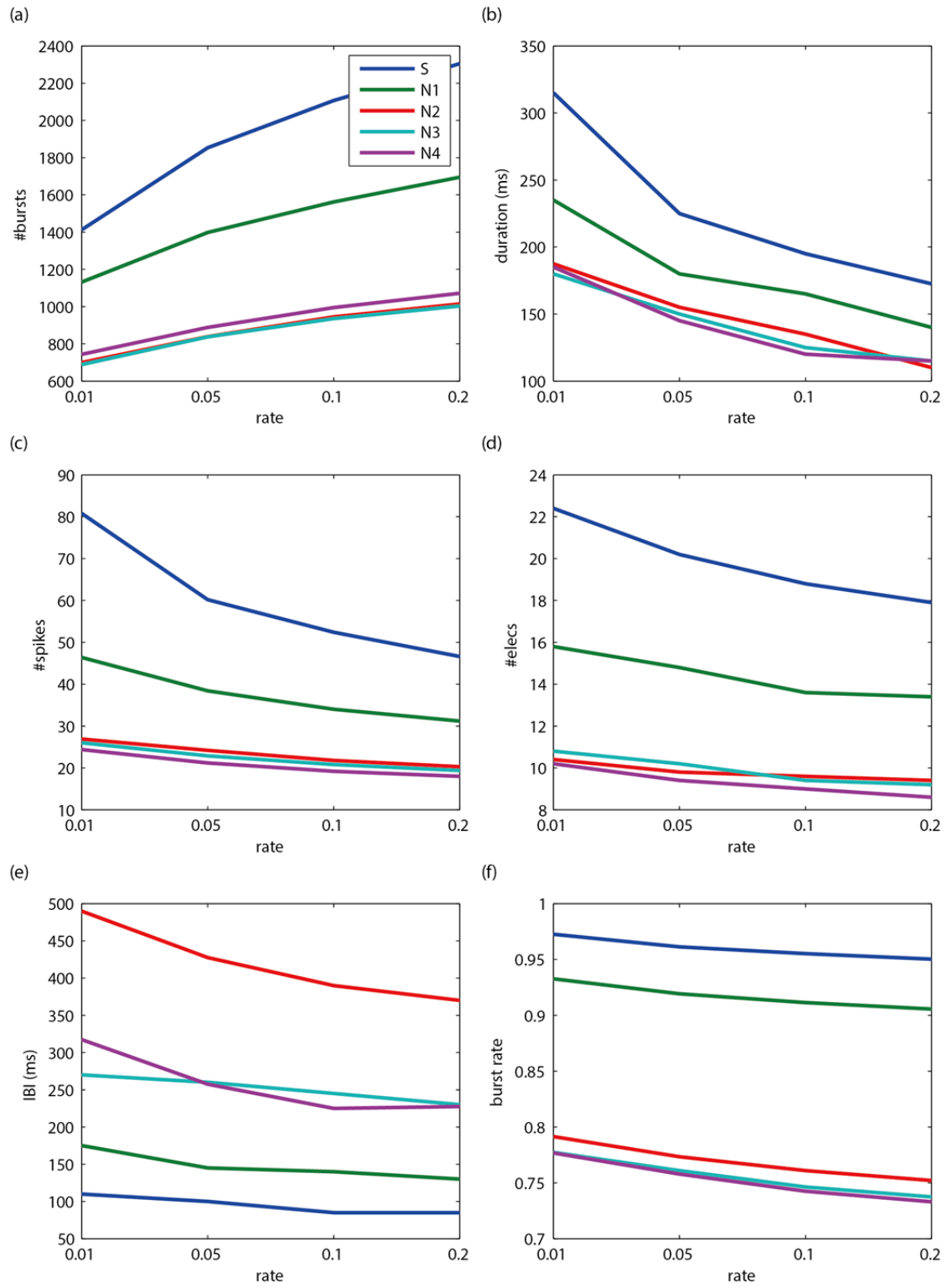
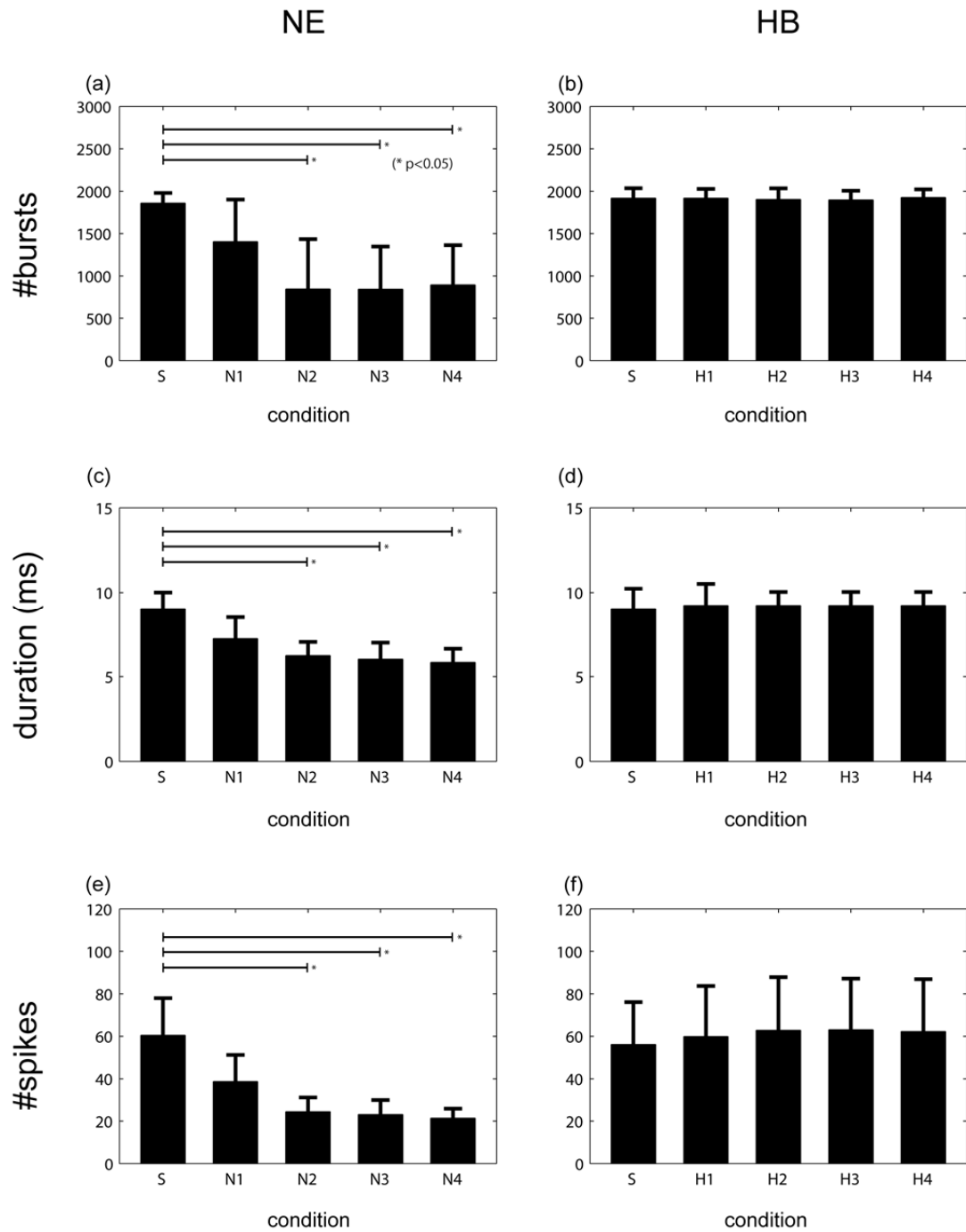


図 2.14 パラメータ感度分析 rate

2.3.3.2 各状態間比較

2.3.3.1 において設定したパラメータを用いて、ネットワークバースト活動を検出し、バースト数、バースト時間、バースト内スパイク数、バースト参加電極数、バースト間隔、バースト率に着目し、各状態間比較を行った。その結果を図 2.15 に示す。(a), (c), (e), (g), (i), (k) は NE を添加した場合、(b), (d), (f), (h), (j), (l) は HB を添加した場合の各特徴量の試料平均 ($N_{NE}=5$, $N_{HB}=5$) を表している。横軸は各状態を表し、縦軸は (a), (b) はバースト数, (c), (d) はバースト時間, (e), (f) はバースト内スパイク数, (g), (h) はバースト参加電極数, (i), (j) はバースト間隔, (k), (l) はバースト率の試料平均を表している。NE を添加した場合、S と N2~4 の間でバースト率以外の指標が有意に減少していた。また、S と N3~4 の間でバースト率が有意に減少していた。それ以外では、HB を添加した場合も含め、状態間で有意な差はなかった。



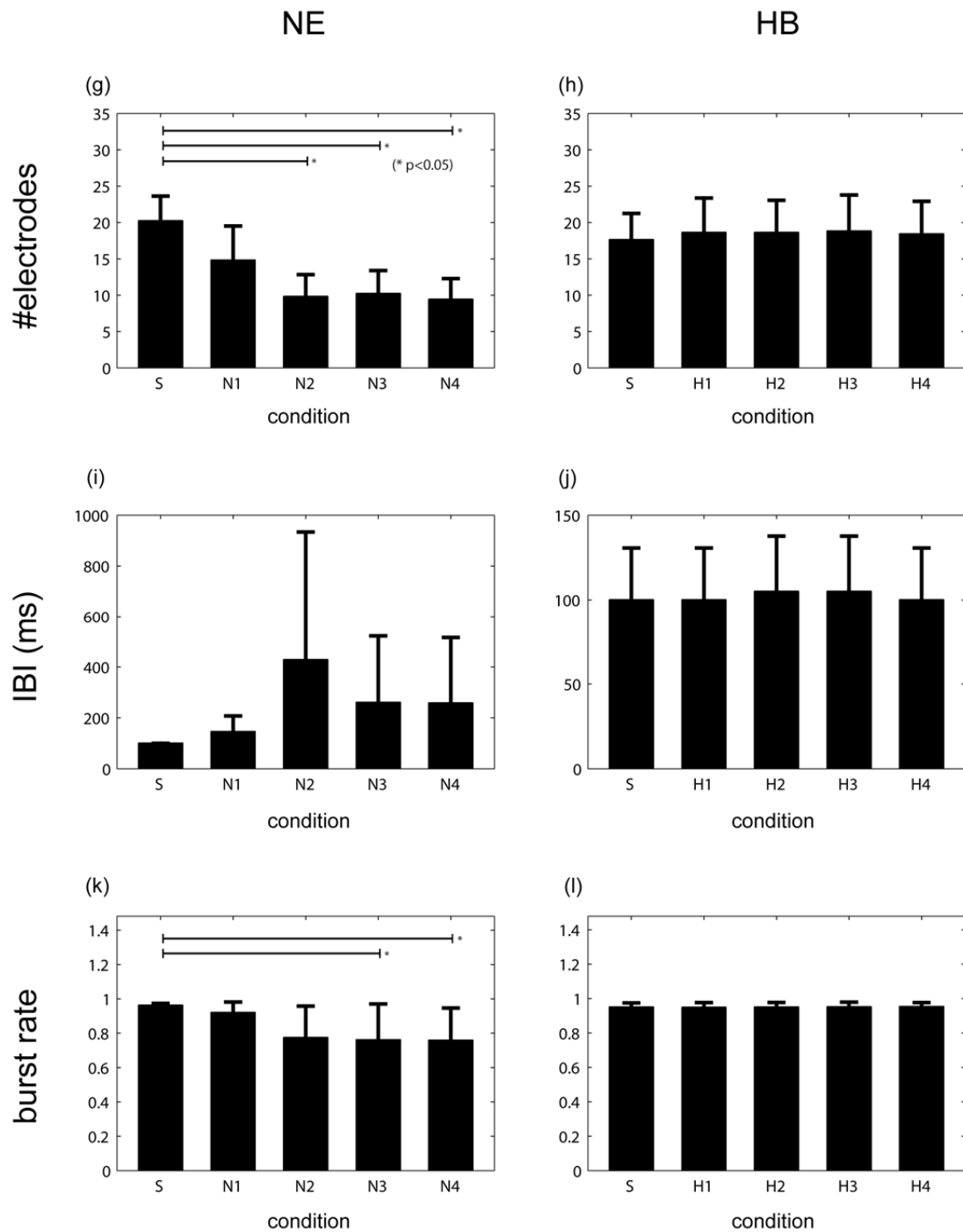


図 2.15 ネットワークバースト

2.3.4 フーリエスペクトル解析

活動パターンを評価するため、標準化したフーリエスペクトルを算出した。図 2.16 に (a) は NE を添加した場合、(b) は HB を添加した場合の結果を示す。横軸は周波数、縦軸は正規化されたフーリエスペクトルを表している。また各図の右上に周波数 $1/800 \sim 1/50$ の範囲を拡大した図を載せた。NE を添加した場合、正規化されたパワーが相対的に大きい 0.005 以上の範囲では、S に比べて N4 で $3/800$ Hz, $1/200$ Hz の成分が有意に増加していた。一方、HB を添加した場合にはどの周波数も NE 添加によって確認された顕著な変化はみられなかった。

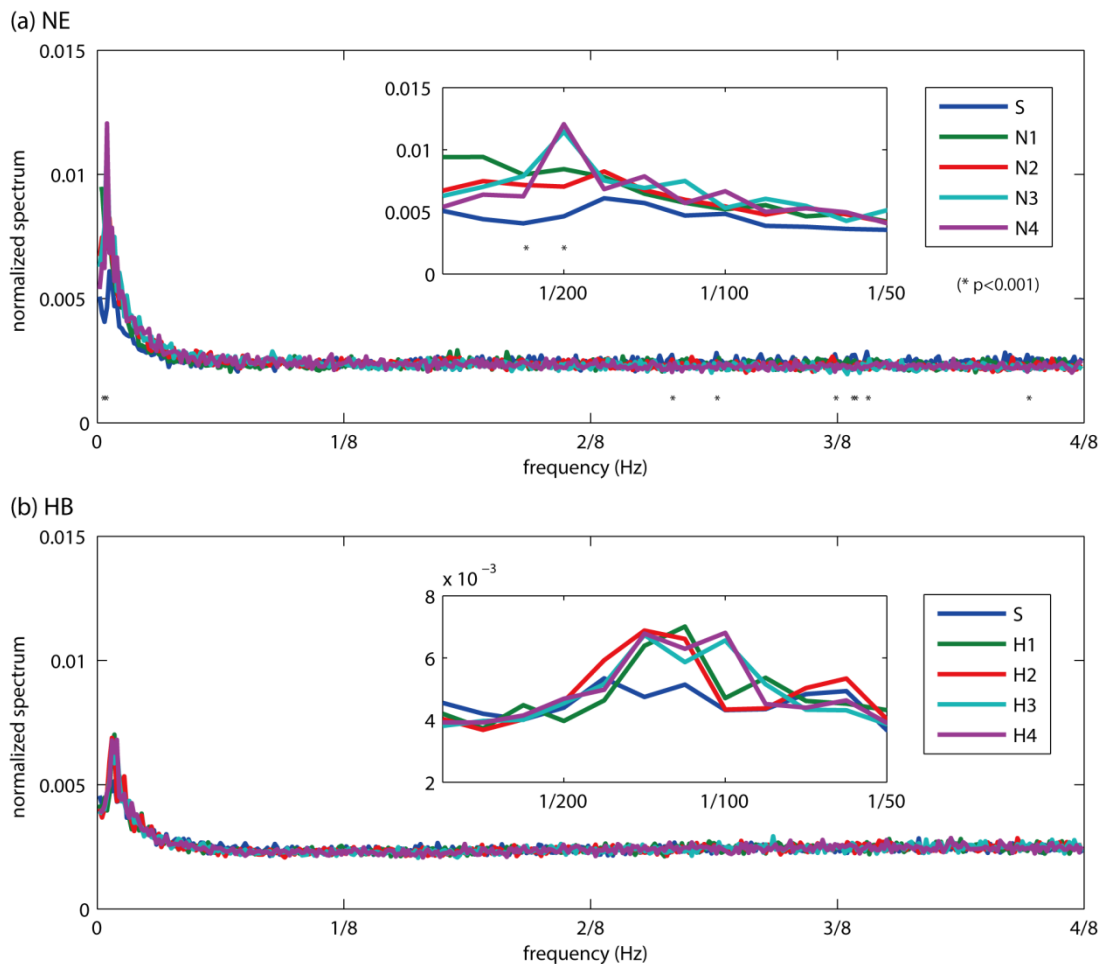


図 2.16 正規化フーリエスペクトル

2.4 考察

2.4.1 NE の活動抑制効果

NE を添加することによって、スパイク数が有意に減少していた。単電極バーストについては、バースト数は有意に減少していたが、バースト時間、バースト内スパイク数に関しては有意な変化はなかった。このことから、NE は単電極バーストの性質を変化させず、バースト自体を減少させる作用があることが示された。一方、ネットワークバーストについては、バースト数に加えて、単電極バーストでは顕著な変化が見られなかったバースト時間、バースト内スパイク数、バースト率、そして、ネットワークバースト特有の特徴量であるバースト参加電極数と全ての指標が有意に減少していた。NE 添加前のバースト率は 1 に近く、培養神経回路網の活動はネットワークバースト支配的であったことが確認できる。NE 添加後、バースト率は減少し、同期的な活動が相対的に減少していたことが示された。これらの結果からネットワークレベルの NE の活動抑制効果が確認された。また、N2 以降では全ての指標に関して顕著な変化は見られなかった。HB を添加した場合では、このような活動の抑制効果は見られないため、NE の添加による効果であることが確認できる。

そのような NE の活動抑制効果には GABA とアドレナリン受容体の関与が考えられる。Bergles らはパッチクランプ法を用いて、海馬の GABA 作動性神経細胞である介在細胞が NE 添加によって脱分極することを確認し、興奮性神経細胞である海馬 CA1 錐体細胞への抑制性シナプス後電流が上昇することを確認した (Bergles et al. 1996)。また、Clinckers らはてんかん発作を呈しているラットに対して $\alpha 1$ アドレナリン受容体のアゴニストを添加することによっててんかん症状が軽減することと同時に脳内の GABA 濃度が上昇していることを確認した (Clinckers et al. 2010)。また、Mcintyre らは $\alpha 2$ アゴニストを添加することによってラットのてんかん発作が軽減することを示した (Mcintyre and Giugno 1988)。これらのことから、本実験における NE 添加による活動抑制効果は GABA とアドレナリン受容体が関与している可能性が示唆される。GABA、アドレナリン受容体の関与の確認は、それぞれ、GABA 受容体のアンタゴニストである bicuculline を添加した上で NE の添加、アゴニストの添加による活動に対する効果を評価することによって可能であると考えられる。

NE は神経回路における SN 比を向上させると考えられている。Hasselmo らは、大脳皮質スライスに NE を添加し、求心性神経が投射する皮質 Ia 層と層内の結合が主な皮質 Ib 層に対してそれぞれ電気刺激することによって、NE によって両層の刺激応答が抑制されること、Ib 層の刺激応答の方が Ia 層の刺激応答に比べて強く抑制されることを示した (Hasselmo et al. 1997)。そこで、本実験の活動抑制効果は、バックグラウンドを低下させる効果と同様のメカニズムで発生した可能性があり、本実験系を用いて、アドレナリン受容体アゴニストやアンタゴニストの添加、遺伝子発現解析を行うことで当該効果に関する受容体や遺伝子の特定に貢献できることが期待される。

2.4.2 NE 添加後のネットワークバースト減少

単電極バーストにおいては NE 添加によってバースト時間、バースト内スパイク数、バースト率に顕著な変化が見られなかったが、ネットワークバーストにおけるそれらの特徴量は有意に減少していた。この結果は、NE のネットワークバーストに対する効果が、単に単電極バーストに対する効果から推測できるわけではないことを示しており、電極レベルのみではなく、ネットワークレベルで活動を評価することの有用性を示している。

NE 添加後にネットワークバーストに関する指標が有意に減少していること、つまり同期活動が NE 添加によって減少していることは特筆すべき事項である。これまでに、培養神経回路網では全体にわたる同期活動か、ごく少数の神経細胞が活動するかの二極性の高い、bimodal な活動を示すこと (Madhavan, Chao, and Potter 2007)、生体内の神経回路には存在する外部刺激を模した電気刺激を与えると同期活動は消失すること (Wagenaar et al. 2005)、生体内で同期活動が観測されるのは主に神経回路の成熟期のみであること (Meister et al. 1991)、てんかん患者の神経回路では全体にわたる同期活動が発生していること (Hobbs, Smith, and Beggs 2010) がわかっている。これらの結果は、培養神経回路網におけるネットワークバーストは病的な同期活動、てんかん様活動であることを示唆している。また、NE は難治性てんかんの治療法である迷走神経刺激療法の効果において重要な役割を果たしていると考えられている (Krahl et al. 1998)。これらの知見をふまえると、本研究で観測された NE 添加による同期活動の抑制は NE の抗てんかん作用が *in vitro* 系で確認できたことを示唆している。そこで、NE 添加によるネットワークバーストの時空間パターン (Ikegaya

et al. 2004; Rolston et al. 2007) の変化, この作用に寄与する受容体の同定, 関連するパスウェイの解析を行うことで, NE の抗てんかん作用機序解明に貢献できると考えられる.

2.4.3 作用時間と添加濃度における NE の効果

N2 以降で顕著な活動の変化が起こらなかった理由として以下の 2 つの可能性が考えられる. 1 つは 2 回目の NE 添加時刻付近に 1 回目の NE 添加の効果が時間をおいて現れるといった遅延による効果の可能性である. つまり, 1 回目の NE 添加の効果が約 15 分後に現れた可能性である. もう 1 つの可能性は 2 回目の NE の添加による NE 濃度上昇による効果の可能性である. DiPilato らは 10 μ M β アドレナリン受容体アゴニストを添加後数分でセカンドメッセンジャーである cAMP 濃度が増加し, 添加後 10 分程から cAMP 濃度が低下していることを示した (DiPilato, Cheng, and Zhang 2004). また, Zaccolo らは, 3 μ M NE 添加後およそ 20 秒で cAMP 濃度が上昇し, 50 秒ほどで減少することを確認した (Zaccolo et al. 2000). そして, Hasselmo らは NE 濃度に比例して興奮性シナプス後電位が減少することを示した (Hasselmo and Linster 1997). これらを踏まえると, 本実験で見られた活動抑制効果が時間依存的, または濃度依存的であるか, もしくは両事項によるものなのかを判断することは困難である. そこで, 今後, NE 添加時間間隔を広げること, もしくは, 添加濃度を変化させることによってそれらの効果を評価可能になると考えられる. しかし, N2 以降は顕著な活動の変化がみられないことから, 遅延効果に関しては NE 添加から 30 分以上経った後の活動への影響, 濃度効果に関しては 20 μ M 以上の濃度による活動への影響は大きくないと考えられる.

2.4.4 NE 添加後に見られた周期的な活動

本実験における活動抑制効果の特徴的な点は, N2 以降で平均発火率のベースラインが下がり, 周期的な活動が強調されている部分である. これは, 正規化したフーリエスペクトルに注目した時, N4 では S に対して 3/400~1/200 Hz のスペクトルが有意に高くなっていることから確認できる. それ以外のスペクトルにも有意な変化があったが, パワーは 3/400~1/200Hz のものと比べて 1/10 以下であり, 3/400~1/200Hz の有意な変化が培養神経回路網のダイナミクスには影響が大きいと考えられる. これは, 平均発火率の結果で確認された周期がおよそ 180 秒である事実とも合致する. このように平均発火率をもとに算出したフーリエスペクトルを用いることで,

スパイク，バーストに着目した評価とは異なる観点で活動の特性を評価できると考えられる．

0.1 Hz よりも遅い周期的な活動としては, *infra-slow oscillations* (ISO), *ultra slow oscillations* が存在する (Filippov, Williams, and Frolov 2004; Lorincz et al. 2009; Penttonen et al. 1999). ISO は数十秒から数分の周期の振動であり，ウサギの新皮質で最初に発見された (Aladjalova 1957). ISO は fMRI (functional magnetic resonance imaging) における安静時の BOLD (blood oxygenation level dependent) 信号 (Damoiseaux et al. 2006), 睡眠中の EEG (electroencephalogram) の信号 (Vanhatalo et al. 2004) にも現れ，課題行動の成功率にも関係していることが示されている (Monto et al. 2008). さらに，皮質由来の培養神経回路網でも確認されており，振動の位相に応じてスパイクの時空間パターンが繰り返し現れることが示されている (Mok et al. 2012). ISO は本実験で見られた周期的な活動の周波数と近い現象であり，ノルアドレナリンの添加によって，その ISO が強調されたことは本実験によって初めて明らかになったと考えられる．今後は時空間パターンに着目した解析を行うことによって，ISO に対するノルアドレナリンの効果を詳細に評価できると考えられる．

2.5 結論

NE の抗てんかん作用メカニズム，神経調節メカニズム解明を大きな目的とし，本実験では NE の複数添加による培養神経回路網への影響評価を評価した．NE を添加することにより，スパイク数，単電極バースト数，ネットワークバースト数など活動に関する指標が有意に減少するといった NE の活動抑制効果が確認された．また，平均発火率，標準化されたフーリエスペクトルの算出により，NE 添加によって，活動のベースラインが下がり，およそ 200 秒周期の活動パターンが強調される，周期的な活動の強調を促す効果が確認された．これらの結果は培養神経回路網に対する NE の影響に関する基礎的知見を与え，今後，NE による活動変化に関連する受容体，細胞内シグナリングを調べることで，上記 2 メカニズムの解明につながることを期待される．

第3章 ノルアドレナリンの効果に関する系統的な評価

3.1 概要	53
3.2 方法	54
3.2.1 細胞培養	54
3.2.2 細胞外電位計測	54
3.2.3 発達過程における NE 添加	54
3.2.4 濃度を変化させた NE 添加	55
3.2.5 アドレナリン受容体アゴニスト添加	55
3.2.6 スパイク解析	55
3.2.7 ネットワークバースト解析	55
3.2.8 フーリエスペクトル解析	55
3.3 結果	56
3.3.1 発達過程における NE 添加	56
3.3.2 濃度を変化させた NE 添加	62
3.3.3 アドレナリン受容体アゴニスト添加	68
3.4 考察	74
3.4.1 発達過程における NE 添加	74
3.4.2 濃度を変化させた NE 添加	76
3.4.3 アドレナリン受容体アゴニスト添加	78
3.4.4 NE 添加による影響の総括	79
3.5 結論	80

3.1 概要

第 2 章では、海馬由来の成熟した培養神経回路網に対する NE の評価を行った。培養神経回路網は発達段階によって、そのダイナミクスが変化することが知られている (Kamioka et al. 1996; Van Pelt et al. 2004; Wagenaar et al. 2006)。また、活動に与える NE の影響の濃度依存性に関しては明らかではない。そして、NE の影響は $\alpha 1$, $\alpha 2$, β アドレナリン受容体を介していると考えられるが、どの受容体がその影響に寄与しているかは明らかでない。

そこで、NE 添加の効果における、発達過程の影響、濃度依存性、関与する受容体の特定を目的に、以下の実験を行った。発達過程の影響については、培養神経回路網におけるダイナミクスが変化する培養 2 週間、3 週間、4 週間の試料に対して、10 μM NE を複数添加し、その電気的活動の変化を解析することによって、評価した。また、濃度依存性については、NE の濃度を 1 μM , 10 μM , 20 μM と 3 条件に分けて複数添加し、その影響に関して評価した。そして、関与する受容体に関しては、 $\alpha 1$, $\alpha 2$, β アドレナリン受容体のアゴニストをそれぞれ添加し、活動の変化を評価することによって推定した。

それぞれの評価の対象は、平均発火率、スパイク、ネットワークバースト、フーリエスペクトルとした。平均発火率は神経回路のダイナミクスを定性的に理解するため、スパイクは基本的な活動指標を用いてダイナミクスを定量的に評価するため、ネットワークバーストはネットワークレベルのダイナミクスを定量的に評価するため、フーリエスペクトルは NE による周期的な活動の強調に関する評価を定量的に行うために用いた。

3.2 方法

3.2.1 細胞培養

2.2.1 と同様の方法で細胞培養した。簡単に記述すると，4～6 日齢 Wistar ラット新生児から摘出された海馬を単離し，電極を 64 個保持する MEA 上に培養した。

3.2.2 細胞外電位計測

2.2.2 と同様の方法で細胞外電位計測を行った。

3.2.3 発達過程における NE 添加

発達過程における NE の効果を評価するため，培養 2 週間 (2WIV; Weeks *in vitro*)，3 週間 (3WIV)，4 週間 (4WIV) の試料に対して NE 添加を行った ($N_{2WIV}=5$, $N_{3WIV}=5$, $N_{4WIV}=5$)。4WIV の試料に関しては，第 2 章で用いた試料のデータを再利用している。NE 添加のプロトコルは 2.2.3 のものと同様である (図 3.1)。簡単に記述すると，15 分毎に 10 μ M NE が加わるように試料に添加した。

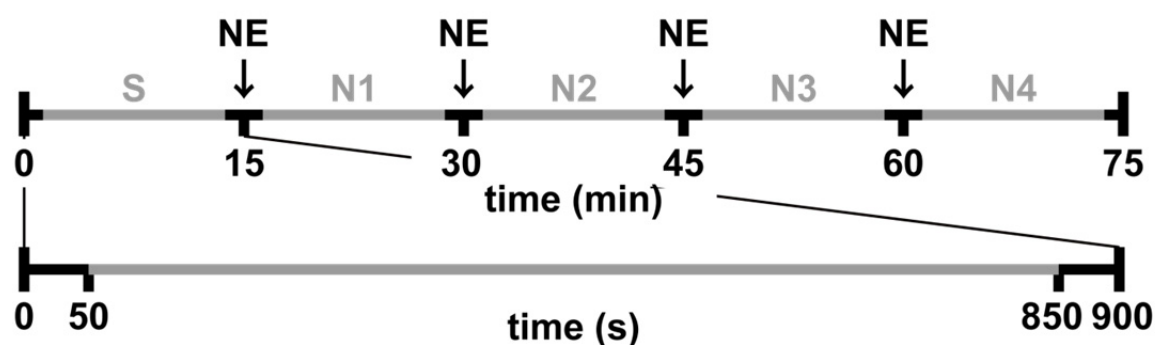


図 3.1 実験プロトコル

3.2.4 濃度を変化させた NE 添加

濃度を変化させた場合における NE の効果を評価するため、濃度を変化させ、培養 30 日～41 日 (30-40 DIV; days *in vitro*) の試料に対して NE を添加した ($N_{1\mu\text{M}}=3$, $N_{10\mu\text{M}}=5$, $N_{20\mu\text{M}}=3$). 実験プロトコルは基本的に 3.2.3 と同様であり、添加する NE の濃度を $10\mu\text{M}$ から変化させ、 $1\mu\text{M}$, $20\mu\text{M}$ をそれぞれ 4 回添加した. $1\mu\text{M}$, $10\mu\text{M}$, $20\mu\text{M}$ を 4 回添加した試料数はそれぞれ、3, 5, 3 とした. ここで、 $10\mu\text{M}$ の試料のデータに関しては、第 2 章で用いたデータを再利用している.

3.2.5 アドレナリン受容体アゴニスト添加

得られた NE の効果に関わるアドレナリン受容体を評価するため、アドレナリン受容体アゴニストを、3.2.3 と同様のプロトコルで添加した ($N_{\alpha 1}=1$, $N_{\alpha 2}=1$, $N_{\beta}=1$). 29-31 DIV の試料に対して、添加後の濃度に $10\mu\text{M}$ が加わるように、 $\alpha 1$, $\alpha 2$, β アドレナリン受容体アゴニストをそれぞれ 4 回添加した. $\alpha 1$, $\alpha 2$, β アドレナリン受容体アゴニストとして、それぞれフェニレフリン (phenylephrine) 塩酸塩 (Sigma-Aldrich 社), クロニジン (clonidine) 塩酸塩 (Sigma-Aldrich 社), イソプロテレノール (isoproterenol) 塩酸塩 (Sigma-Aldrich 社) の水溶液を用いた.

3.2.6 スパイク解析

2.2.4 と同様の方法でスパイク解析を行った. 簡単に記述すると、スパイク検出を行い、平均発火率、スパイク数を算出し、各状態間でスパイク数の比較を行った.

3.2.7 ネットワークバースト解析

2.2.6.1, 2.2.6.3, 2.2.6.4 と同様の方法でネットワークバースト検出、ネットワークバースト特徴量の算出、各状態間比較を行った. パラメータ bin, pth, rate の値は、2.3.3.1 の結果と Pelt らの先行研究で用いられていること (van Pelt et al. 2004) を考慮して、それぞれ 25ms, 9, 0.05 を用いることとした.

3.2.8 フーリエスペクトル解析

2.2.7 と同様の方法でフーリエスペクトル解析を行った. 簡単に記述すると、平均発火率の時系列データの正規化フーリエスペクトルを算出し、各状態間で比較を行った.

3.3 結果

3.3.1 発達過程における NE 添加

3.3.1.1 スパイク解析

3.3.1.1.1 平均発火率

発達過程における NE 添加による活動変化の概観を把握するため、図 3.2 に、(a), (b), (c) はそれぞれ 2WIV, 3WIV, 4WIV の代表的な試料に対して NE を添加した際の平均発火率の全有効電極平均 (AFR) を示す。縦軸は平均発火率、横軸は時間を示し、NE の 1, 2, 3, 4 回目の添加は横軸の 15, 30, 45, 60 min に対応している。どの試料においても N1 では顕著な活動の変化は見られなかった。しかし、N2 から 2WIV と 3WIV の試料では発火頻度が落ち、4WIV の試料では発火率のベースラインがさがった。4WIV の試料に見られる神経細胞が発火する時間としない時間が交互に現れるリズムカルな現象は 2WIV, 3WIV の試料では見られなかった。

3.3.1.1.2 スパイク数比較

各状態における変化を定量的に評価するため、各状態における総スパイク数を算出し、比較を行った。図 3.3 に (a), (b), (c) はそれぞれ 2WIV, 3WIV, 4WIV の全試料におけるスパイク数の平均値を示す ($N_{2WIV}=5$, $N_{3WIV}=5$, $N_{4WIV}=5$)。横軸は各状態、縦軸は全電極のスパイク数の平均を表している。どの発達段階の試料においても、N1 ~4 におけるスパイク数は S に比べて有意に減少していた。また、3WIV, 4WIV の試料においては、N2~4 におけるスパイク数は N1 に比べて有意に減少していた。さらに、3WIV の試料においては、N3~4 におけるスパイク数は N2 に比べて有意に減少していた。

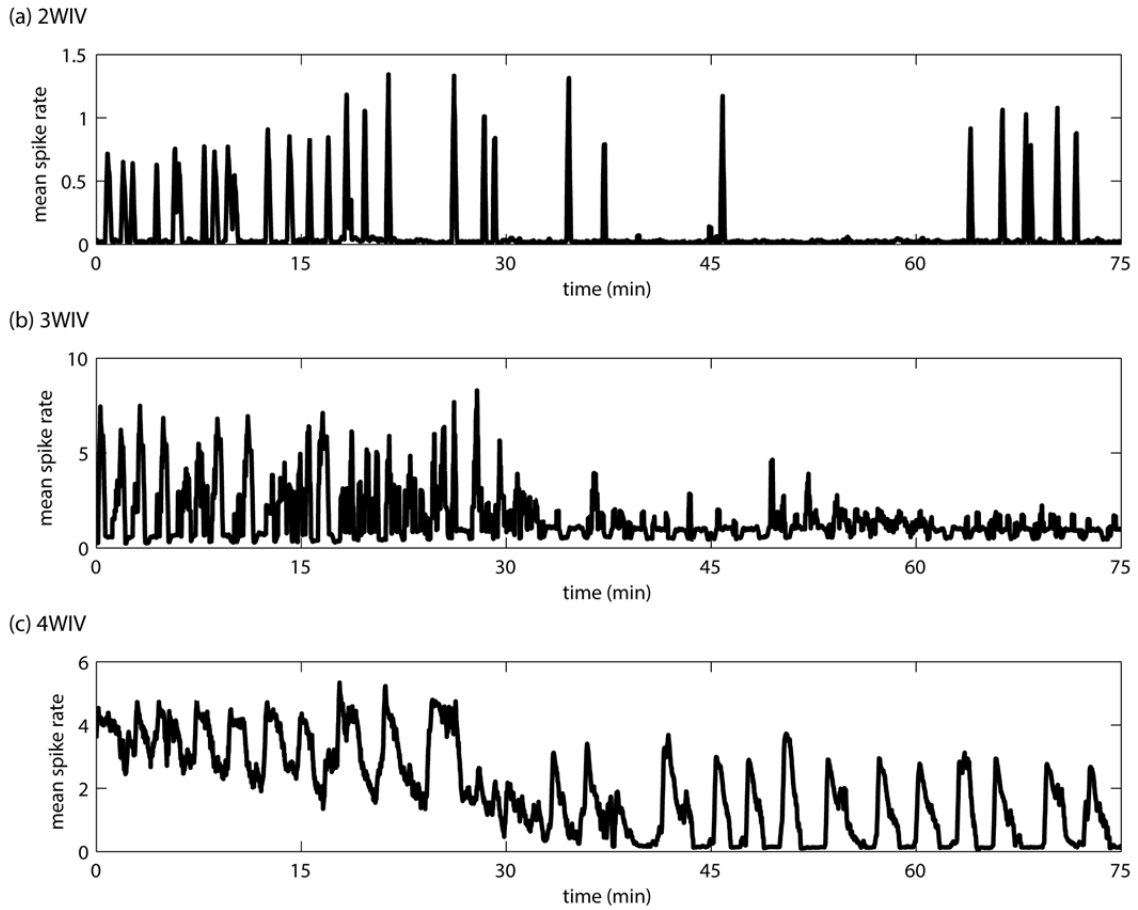


図 3.2 平均発火率

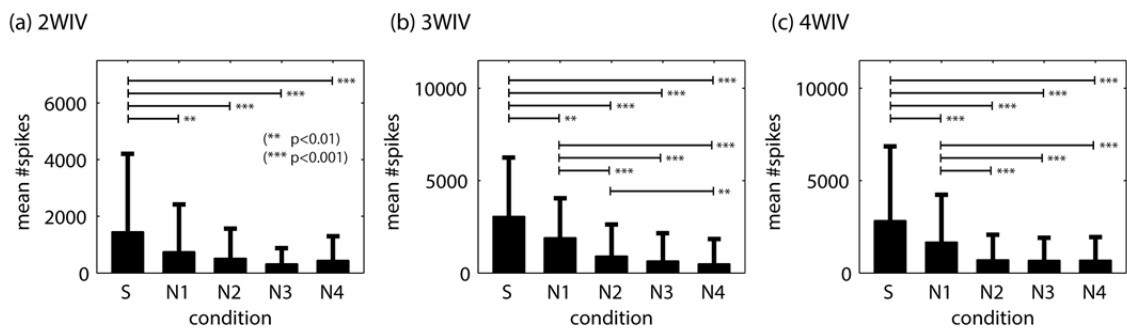


図 3.3 スパイク数

3.3.1.2 ネットワークバースト解析

ネットワークバースト活動を検出し、バースト数、バースト時間、バースト内スパイク数、バースト参加電極数、バースト間隔、バースト率に着目し、各状態間比較を行った。その結果を図 3.4 に示す。(a), (d), (g), (j), (m), (p) は 2WIV, (b), (e), (h), (k), (n), (q) は 3WIV, (c), (f), (i), (l), (o), (r) は 4WIV の試料に対して NE を添加した際のネットワークバーストに関する各特徴量の試料平均 ($N_{2WIV}=5$, $N_{3WIV}=5$, $N_{4WIV}=5$) を表している。横軸は各状態を表し、縦軸は (a), (b), (c) はバースト数, (d), (e), (f) はバースト時間, (g), (h), (i) はバースト内スパイク数, (j), (k), (l) はバースト参加電極数, (m), (n), (o) はバースト間隔, (p), (q), (r) はバースト率の試料平均を表している。

2WIV の試料では、バースト数が、S に対して N1~4 の間で有意に減少していた。3WIV の試料では、バースト数が、S に対して N2~4 の間で 0.1 の有意水準で有意に減少していた。また、バースト時間、バースト間隔が S に対して N3~4 の間で有意に減少していた。さらに、バースト率も S に対して N4 で有意に減少していた。4WIV の試料では、S に対して N2~4 の間でバースト間隔、バースト率以外の指標が有意に減少していた。また、S に対して N3~4 の間でバースト率が有意に減少していた。それ以外では、有意な変化はみられなかった。

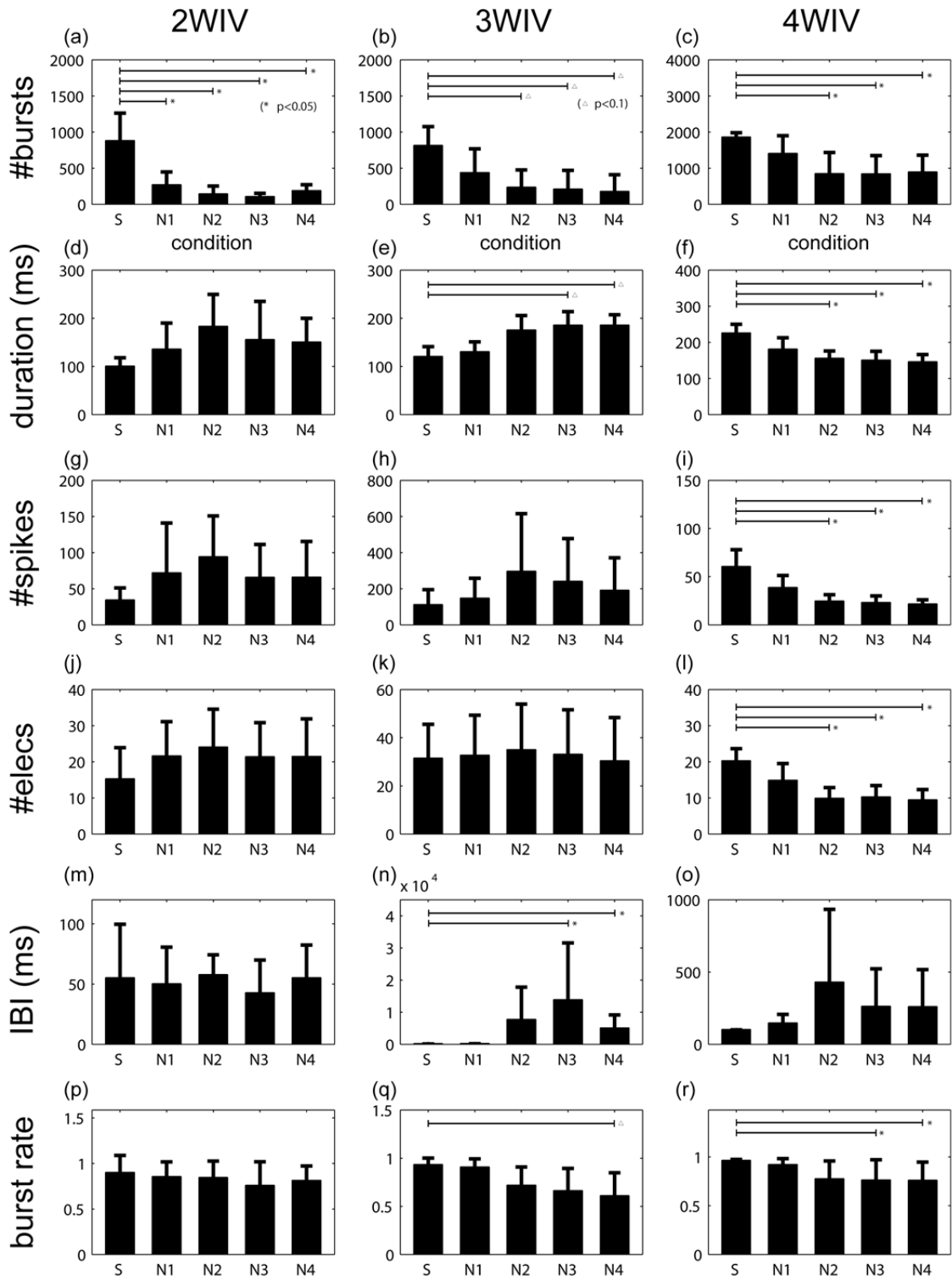


図 3.4 ネットワークバースト

3.3.1.3 フーリエスペクトル解析

活動パターンを評価するため、標準化したフーリエスペクトルを算出した。図 3.5 に (a), (b), (c) はそれぞれ 2WIV, 3WIV, 4WIV の試料に対して NE を添加した際の正規化スペクトルの結果を示す。横軸は周波数、縦軸は正規化されたフーリエスペクトルを表している。また各図の右上に周波数 1/800~1/50 の範囲を拡大した図を載せた。

4WIV の試料に対して NE を添加した際に確認された、1/200 Hz におけるパワーの特異的な増加は、2WIV, 3WIV の試料には見られなかった。3WIV の試料においては、S でみられていた 1/25 Hz 以下の低周波領域のパワーが NE 添加によって減少していた。

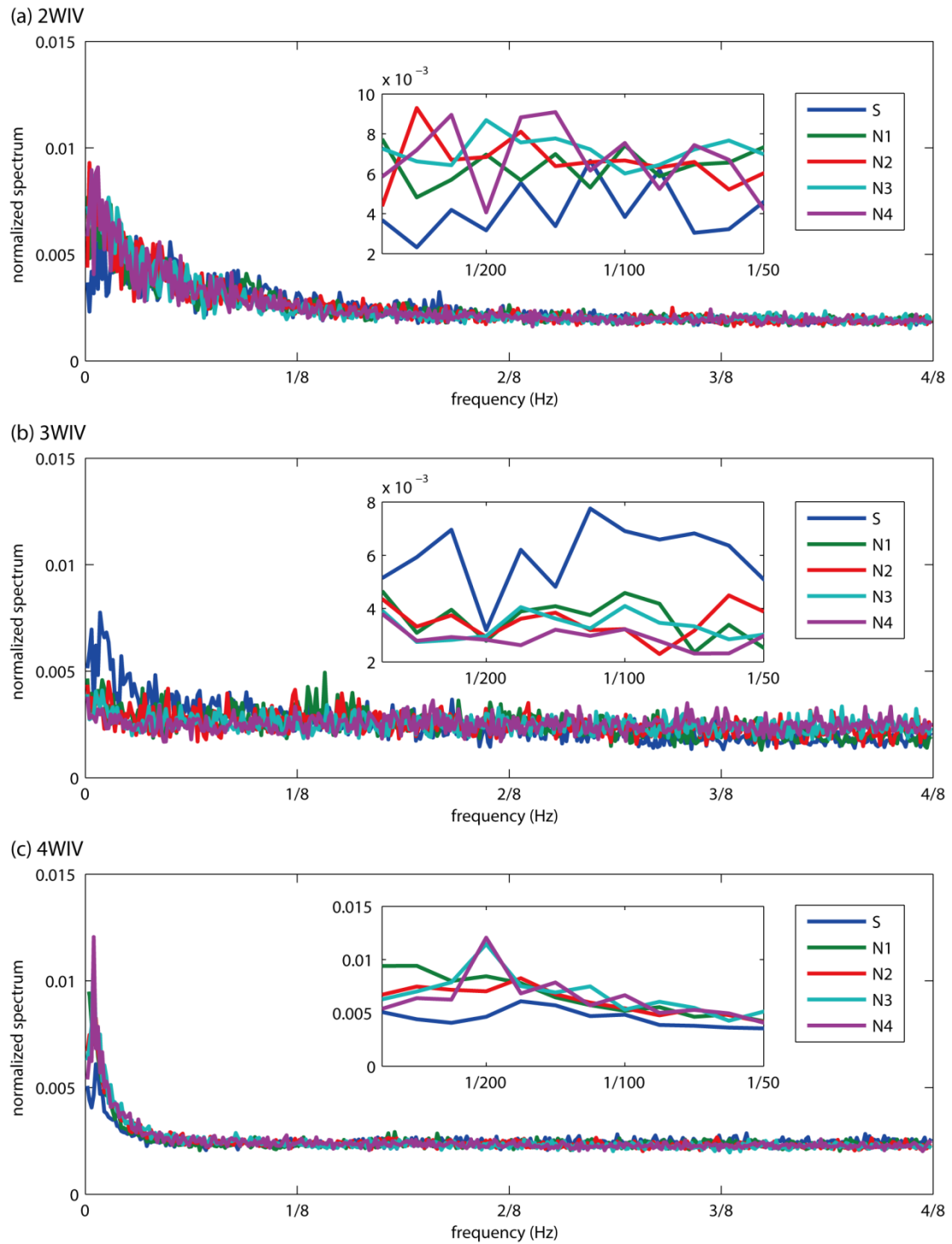


図 3.5 正規化フーリエスペクトル

3.3.2 濃度を変化させた NE 添加

3.3.2.1 スパイク解析

3.3.2.1.1 平均発火率

濃度変化した際の NE 添加による活動変化の概観を把握するため、図 3.6 に、(a), (b), (c) は代表的な試料に対して、それぞれ $1\ \mu\text{M}$, $10\ \mu\text{M}$, $20\ \mu\text{M}$ NE を添加した際の平均発火率の全有効電極平均 (AFR) を示す。縦軸は平均発火率、横軸は時間を示し、NE の 1, 2, 3, 4 回目の添加は横軸の 15, 30, 45, 60 min に対応している。

$20\ \mu\text{M}$ NE を添加した試料においては、N1 で発火率が減少し、 $1\ \mu\text{M}$, $10\ \mu\text{M}$ NE を添加した試料においては、N2 で発火率が減少した。それぞれ、それ以降は顕著な変化はなく、どの試料においても、神経細胞が発火する時間としない時間が交互に現れるリズムカルな現象が確認された。

3.3.2.1.2 スパイク数比較

各状態における変化を定量的に評価するため、各状態における総スパイク数を算出し、比較を行った。図 3.6 に (a), (b), (c) はそれぞれ $1\ \mu\text{M}$, $10\ \mu\text{M}$, $20\ \mu\text{M}$ NE を添加した全試料におけるスパイク数の平均値を示す ($N_{1\mu\text{M}}=3$, $N_{10\mu\text{M}}=5$, $N_{20\mu\text{M}}=3$)。横軸は各状態、縦軸は全電極のスパイク数の平均を表している。どの濃度の NE 添加においても、N2~4 におけるスパイク数は S に比べて有意に減少していた。また、 $1\ \mu\text{M}$, $10\ \mu\text{M}$ NE を添加した試料において、N2~4 におけるスパイク数は N1 に比べて有意に減少していた。さらに、 $10\ \mu\text{M}$, $20\ \mu\text{M}$ NE を添加した試料においては、N1 におけるスパイク数は S に比べて有意に減少していた。

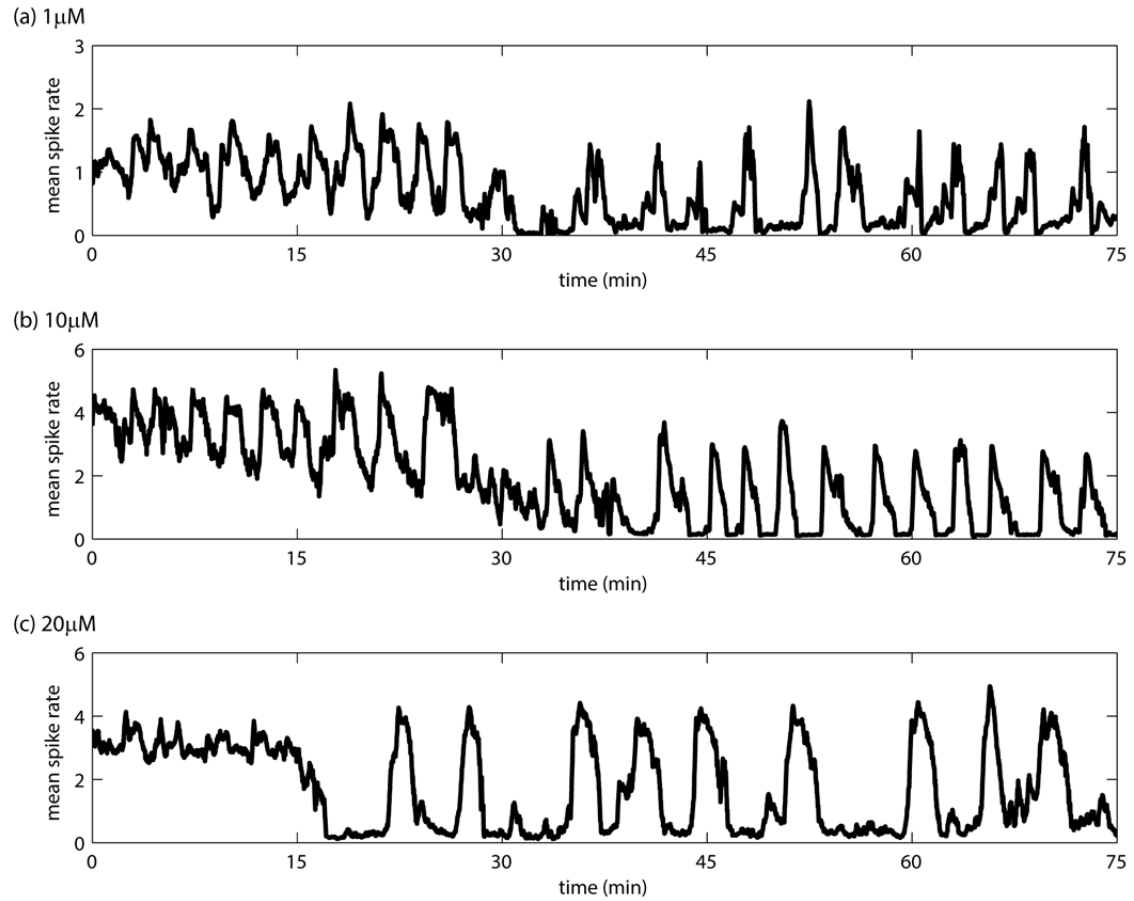


図 3.6 平均発火率

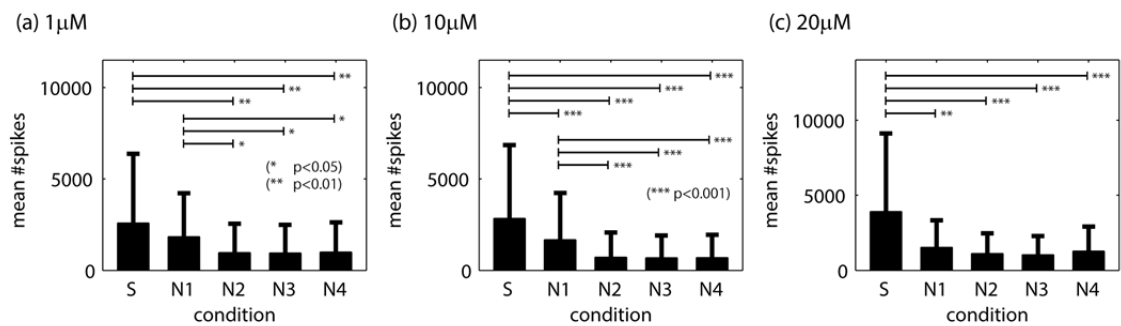


図 3.7 スパイク数

3.3.2.2 ネットワークバースト解析

ネットワークバースト活動を検出し、バースト数、バースト時間、バースト内スパイク数、バースト参加電極数、バースト間隔、バースト率に着目し、各状態間比較を行った。その結果を図 3.8 に示す。(a), (d), (g), (j), (m), (p) は $1\text{ }\mu\text{M}$, (b), (e), (h), (k), (n), (q) は $10\text{ }\mu\text{M}$, (c), (f), (i), (l), (o), (r) は $20\text{ }\mu\text{M}$ NE を試料に対して添加した際のネットワークバーストに関する各特微量の試料平均 ($N_{1\mu\text{M}}=3$, $N_{10\mu\text{M}}=5$, $N_{20\mu\text{M}}=3$) を表している。横軸は各状態を表し、縦軸は (a), (b), (c) はバースト数, (d), (e), (f) はバースト時間, (g), (h), (i) はバースト内スパイク数, (j), (k), (l) はバースト参加電極数, (m), (n), (o) はバースト間隔, (p), (q), (r) はバースト率の試料平均を表している。

$1\text{ }\mu\text{M}$, $10\text{ }\mu\text{M}$, $20\text{ }\mu\text{M}$ NE を添加した試料は、どれも、バースト数、バースト時間、バースト内スパイク数、バースト参加電極数、バースト率が減少していた。また、バースト間隔については、NE の添加とともに増加する傾向がみられた。

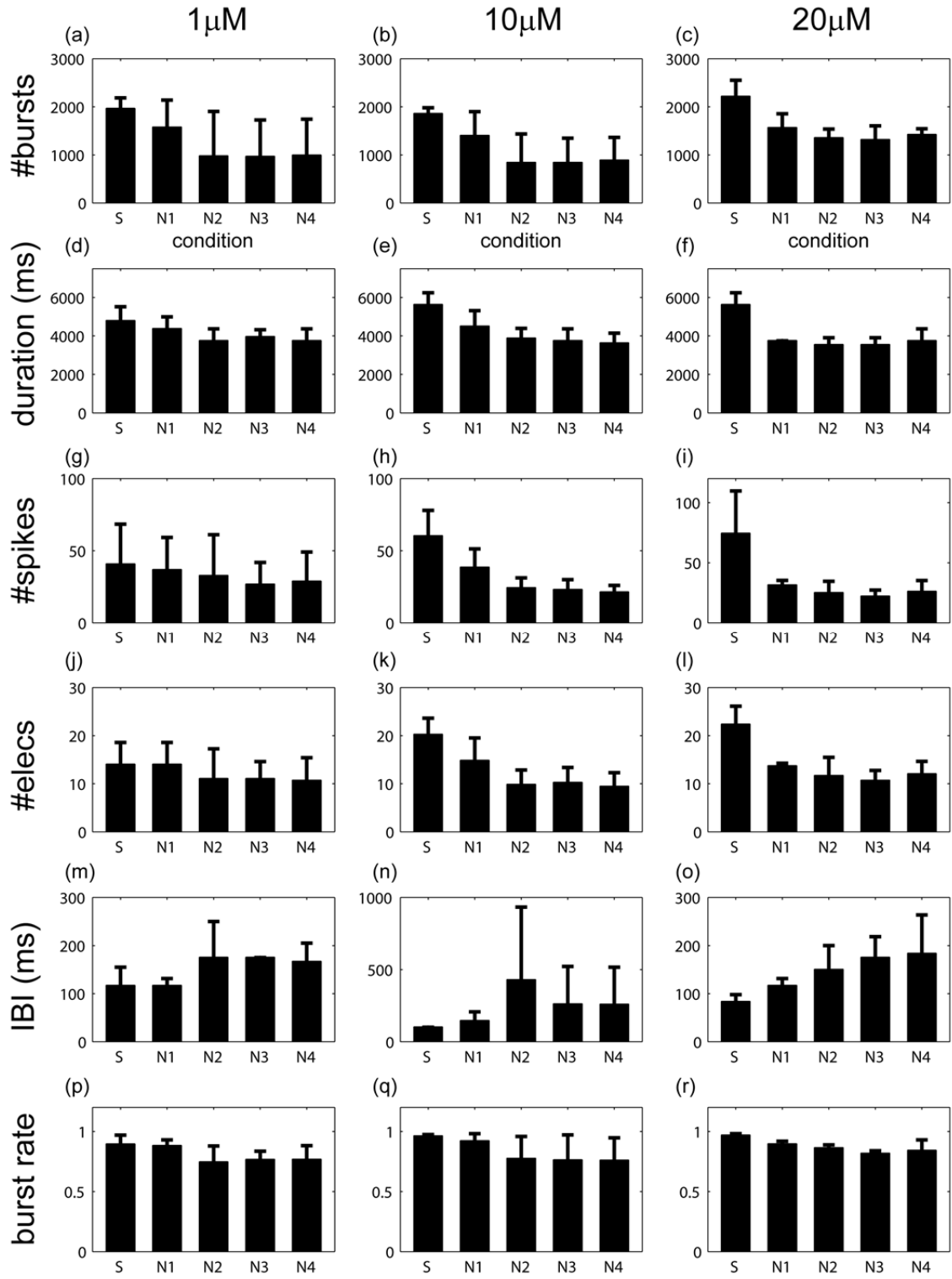


図 3.8 ネットワークバースト

3.3.2.3 フーリエスペクトル解析

活動パターンを評価するため、標準化したフーリエスペクトルを算出した。図 3.9 (a), (b), (c) に、試料に対して、それぞれ 1 μ M, 10 μ M, 20 μ M NE を添加した際の正規化スペクトルの結果を示す。横軸は周波数、縦軸は正規化されたフーリエスペクトルを表している。また各図の右上に周波数 1/800~1/50 の範囲を拡大した図を載せた。

20 μ M NE を添加した場合、10 μ M NE を添加した場合に 1/200 Hz の成分が増加していたことと類似し、3/800 Hz の成分が顕著に増加していた。一方、1 μ M NE を添加した場合、1/800 ~ 5/800 Hz の成分が増加していたが、10 μ M, 20 μ M のときと異なり、特異的にある成分が増加するのではなく、一様に増加していた。また、10 μ M, 20 μ M NE を添加する前に最も値が高かった 5/800 Hz, 1/200 Hz の成分に対して、添加した後に最も値が高くなったのは、スペクトルの分解能である 1/800 Hz 分小さくなった、1/200 Hz, 3/800 Hz であった。

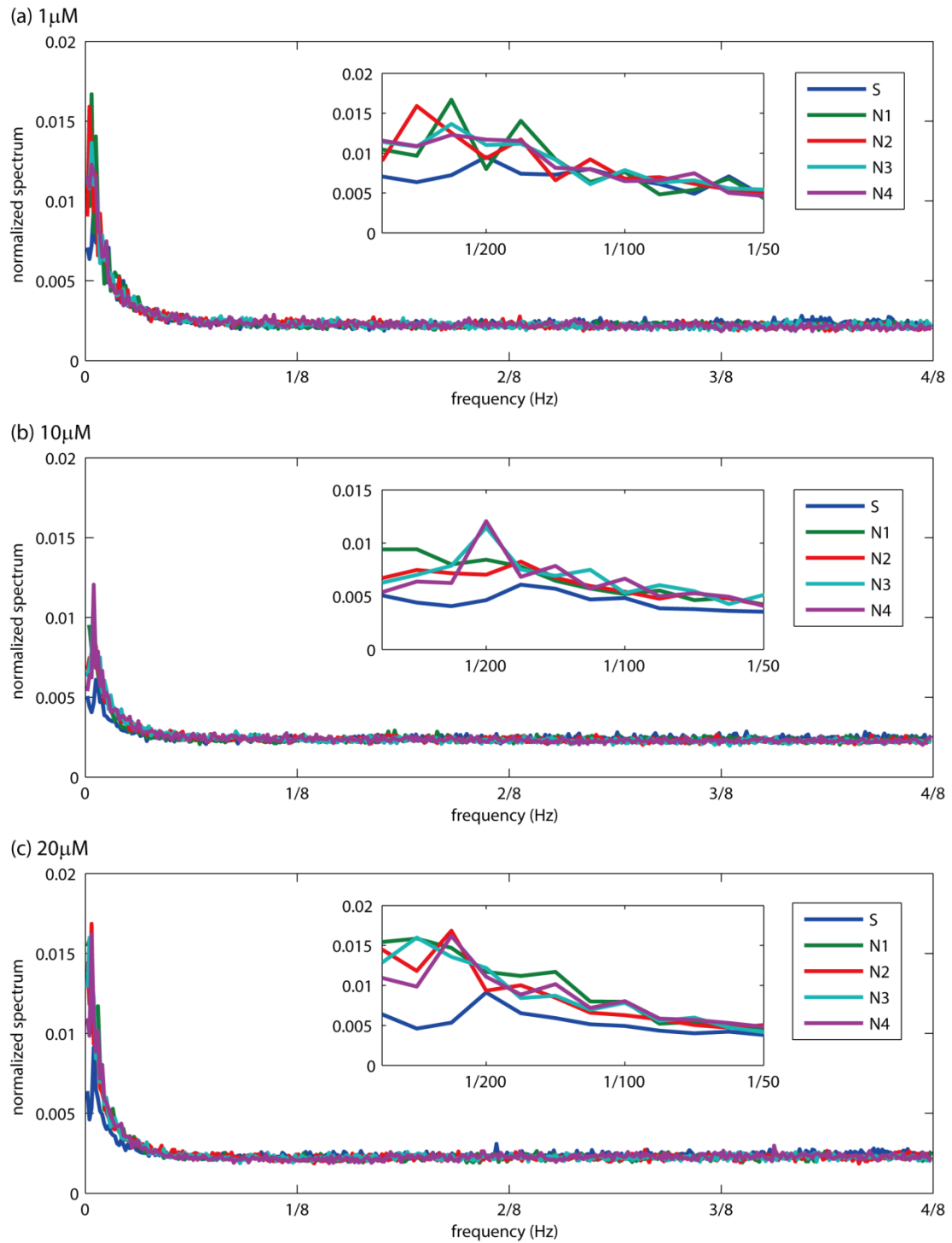


図 3.9 正規化フーリエスペクトル

3.3.3 アドレナリン受容体アゴニスト添加

3.3.3.1 スパイク解析

3.3.3.1.1 平均発火率

アドレナリン受容体アゴニスト添加による活動変化の概観を把握するため、図 3.10 (a), (b), (c) は、それぞれ α_1 , α_2 , β アドレナリン受容体アゴニストを試料に添加した際の平均発火率の全有効電極平均 (AFR) を示す。縦軸は平均発火率、横軸は時間を示し、NE の 1, 2, 3, 4 回目の添加は横軸の 15, 30, 45, 60 min に対応している。

α_1 アゴニストを添加した試料では、N2 から、区間内の発火率の最小値が S, N1 に比べて小さくなり、発火率の変化率が大きくなることが確認された。 α_2 アゴニストを添加した試料では、N1 から変化が始まり、N2 からは、S, N1 に比べて、周期の長い、周期的な活動が確認された。 β アゴニストを入れた試料では、顕著な変化は見られなかった。また、S の状態において、各試料は異なる周期で活動していることが確認された。

3.3.3.1.2 スパイク数比較

各状態における変化を定量的に評価するため、各状態における総スパイク数を算出し、比較を行った。図 3.11 に (a), (b), (c) はそれぞれ α_1 , α_2 , β アゴニストを試料に添加した際の、電極におけるスパイク数の平均値を示す ($N_{\alpha_1}=1$, $N_{\alpha_2}=1$, $N_{\beta}=1$)。横軸は各状態、縦軸はスパイク数を表している。 α_2 アゴニストを添加した試料においては、N2 以降、スパイク数が減少する傾向がみられた。 α_1 , β アゴニストを添加した試料については、顕著な変化はみられなかった。

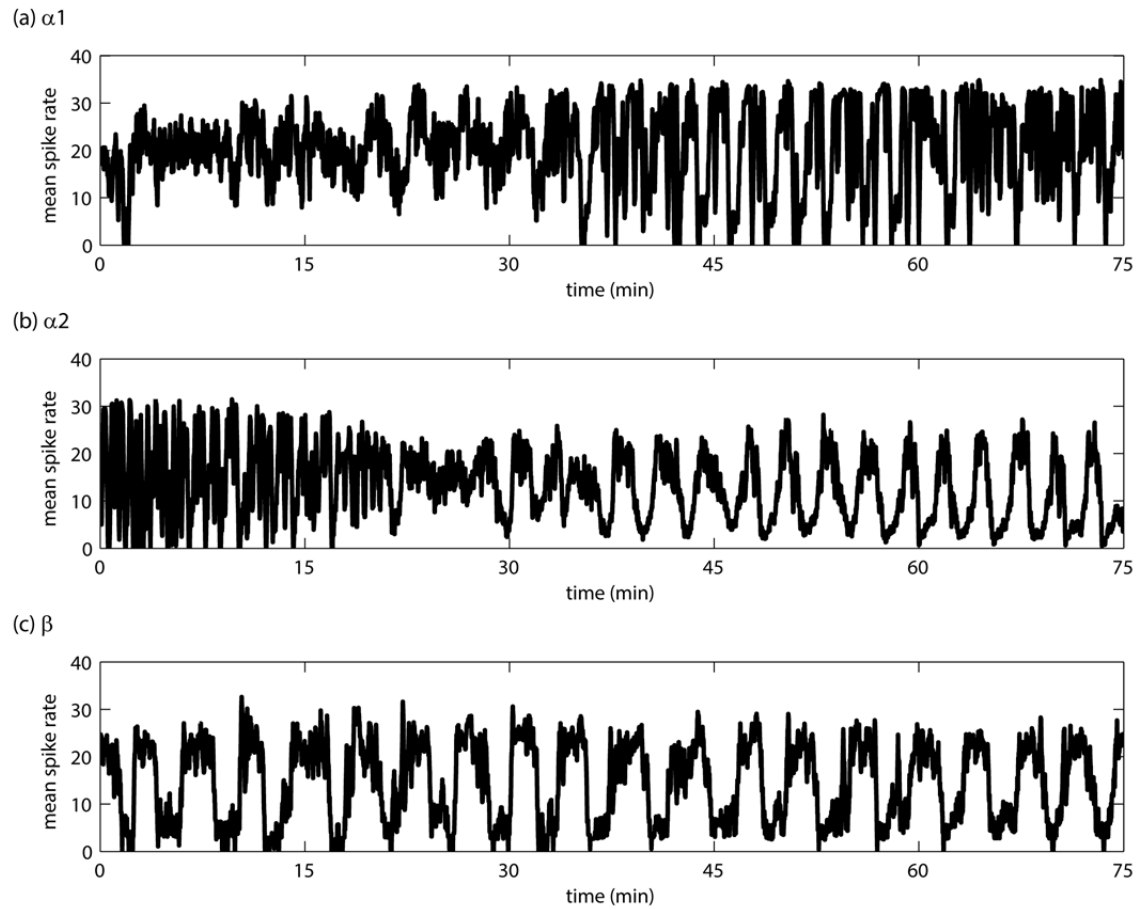


図 3.10 平均発火率

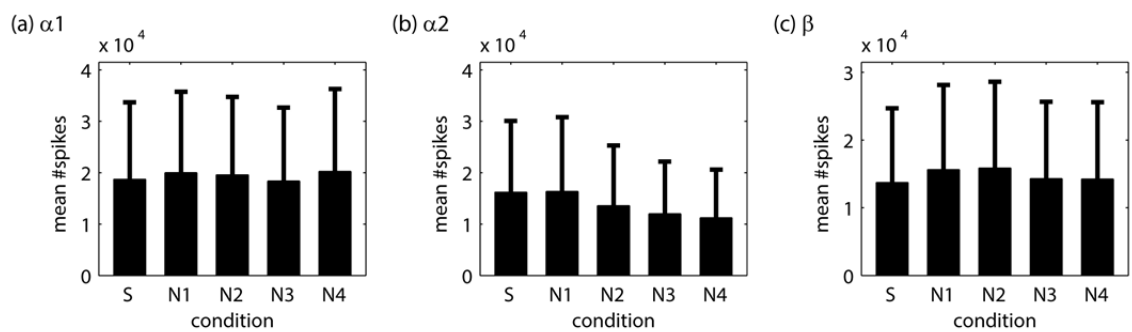


図 3.11 スパイク数

3.3.3.2 ネットワークバースト解析

ネットワークバースト活動を検出し、バースト数、バースト時間、バースト内スパイク数、バースト参加電極数、バースト間隔、バースト率に着目し、各状態間比較を行った。その結果を図 3.12 に示す ($N_{\alpha 1}=1$, $N_{\alpha 2}=1$, $N_{\beta}=1$)。 (a), (d), (g), (j), (m), (p) は $\alpha 1$, (b), (e), (h), (k), (n), (q) は $\alpha 2$, (c), (f), (i), (l), (o), (r) は β アゴニストを試料に対して添加した際のネットワークバーストに関する各特徴量を表している。横軸は各状態を表し、縦軸は (a), (b), (c) はバースト数, (d), (e), (f) はバースト時間, (g), (h), (i) はバースト内スパイク数, (j), (k), (l) はバースト参加電極数, (m), (n), (o) はバースト間隔, (p), (q), (r) はバースト率を表している。

$\alpha 2$ アゴニストを添加した試料は、バースト数、バースト間隔がアゴニスト添加の回数と比例して増加し、バースト時間、バースト内スパイク数、バースト参加電極数は減少していた。 $\alpha 1$, β アゴニストを添加した試料に関しては、顕著な変化はみられなかった。

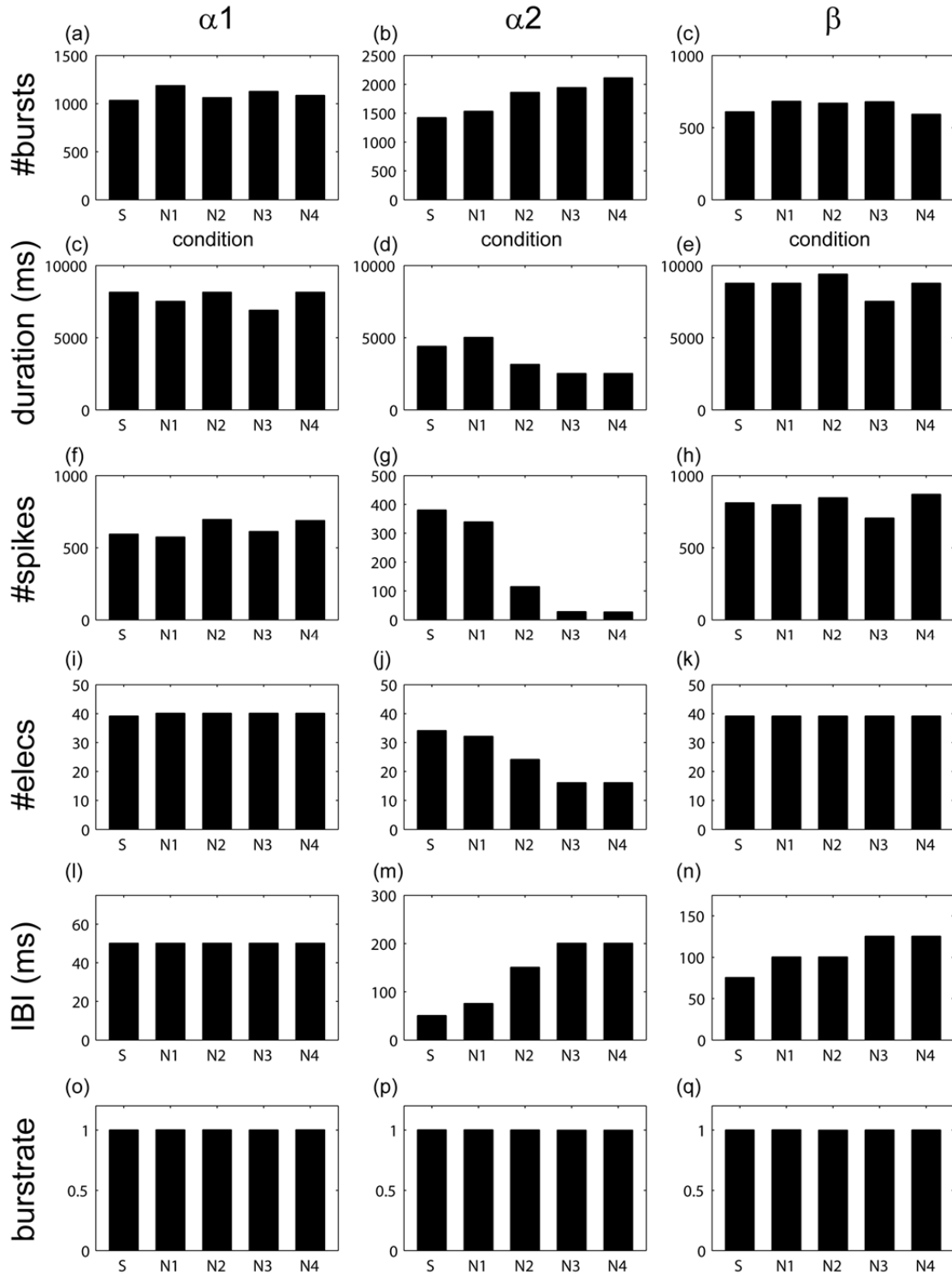


図 3.12 ネットワークバースト

3.3.3.3 フーリエスペクトル解析

活動パターンを評価するため、標準化したフーリエスペクトルを算出した。図 3.13 (a), (b), (c) に、試料に対して、それぞれ $\alpha 1$, $\alpha 2$, β アゴニストを添加した際の正規化スペクトルの結果を示す。横軸は周波数、縦軸は正規化されたフーリエスペクトルを表している。また各図の右上に周波数 $1/800 \sim 1/50$ の範囲を拡大した図を載せた。

$\alpha 1$ アゴニストを添加した試料では、N3 において $3/400$ Hz のパワーが大きくなっていた。 $\alpha 2$ アゴニストを添加した試料では、アゴニストを添加する毎に $5/800$ Hz のパワーが大きくなっていることが確認された。また、N4 において、 $17/800 \sim 64/800$ Hz のパワーが相対的に大きくなっていた。 β アゴニストを添加した試料では顕著な変化はみられなかった。

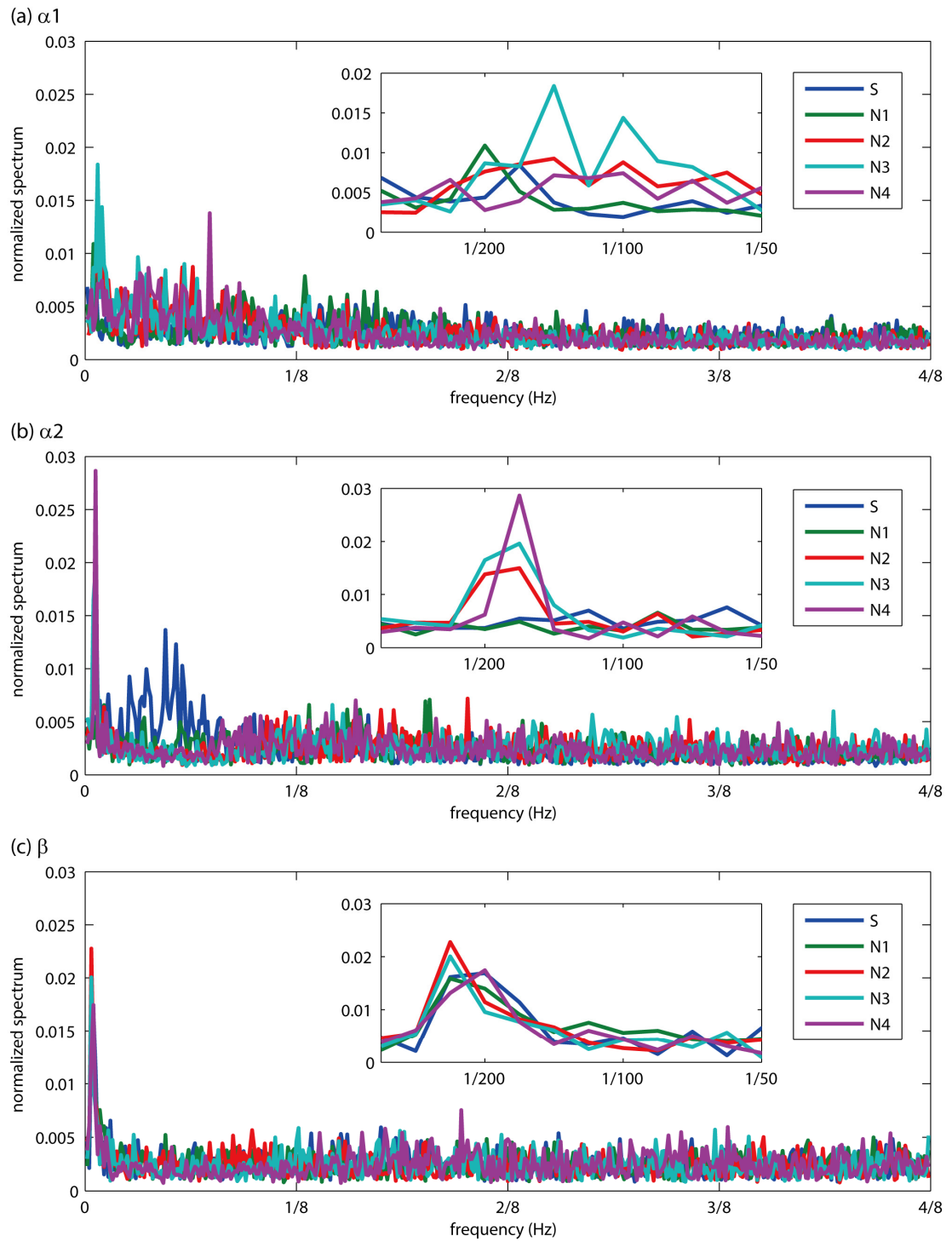


図 3.13 正規化フーリエスペクトル

3.4 考察

3.4.1 発達過程における NE 添加

3.4.1.1 NE 添加によるスパイク数の減少

平均発火率の変化から、各発達段階の試料はどれも NE を投与することで活動が抑制されることが確認された。また、NE の濃度が 20 μM 以上 となる N2 以降では大きな変化が見られない部分も共通していた。スパイク数を算出した結果、3WIV の試料においては、N2 のスパイク数が N4 のスパイク数に比べて有意に大きかった。以上の結果より、本実験系の培養神経回路網における NE の効果が飽和する濃度は大きくとも 30 μM と考えられる。また、NE の活動抑制効果については培養日数に関係なく現れていることが確認された。

3.4.1.2 NE 添加によるネットワークバーストとリズム形成への影響

いずれの発達段階においても、NE 添加後にネットワークバースト数が減少した。しかし、バースト数以外の特徴量に関しては、NE による効果が発達段階によって異なっていた。例えば、バースト時間は 3WIV の試料においては NE 添加によって増加したが、4WIV の試料においては減少していた。また、4WIV の試料における NE 添加後に見られた特徴的な周期活動は 2WIV、3WIV の試料では確認されなかった。

発達段階によって異なる NE の効果の要因としてまず考えられるのは、アドレナリン受容体の発達である。しかし、アドレナリン受容体の数は生後 3 週目以降では大きく変わらないこと (Happe et al. 2004; Pittman, Minneman, and Molinoff 1980) から、発達段階によって異なる効果はアドレナリン受容体の発達に起因していない可能性が高い。

ここで、培養神経回路網において培養 2 週目から 4 週目の発達によって大きく変化するものとしては、GABA 作動性シナプス数、ネットワーク構造が挙げられる。Ito らは GABA 作動性シナプス数が培養 1 週目から 4 週目にかけて増加していることを示した (Ito, Komatsu, and Gohara 2013)。また、Downes らは、培養 2 週目ではランダムネットワークの性質を持っていた培養神経回路網が成熟とともにスケールフリー性を持つことを示した (Downes et al. 2012)。NE 添加による培養日数依存性の効果

について GABA 受容体のアンタゴニストである bicuculline を用いて実験を行うことで, GABA 作動性神経細胞の寄与を評価することができると考えられる. また, ネットワーク構造の変化の寄与に関しては, 神経細胞モデルを用いた計算機シミュレーションによって評価できると考えられる (Izhikevich 2003; Maheswaranathan et al. 2012).

3.4.2 濃度を変化させた NE 添加

3.4.2.1 スパイク数の変化の濃度依存性

1 μ M, 10 μ M, 20 μ M のいずれの濃度の NE を添加してもスパイク数は減少していた。1 μ M, 10 μ M NE を添加した場合は、S に対して N1~N4, また N1 に対して N2~N4 で有意なスパイク数の減少があり、N2 以降では変化は見られなかった。また、S に対して N1~N4 のみ有意なスパイク数の減少がみられ、それ以外では有意な変化は見られなかった。つまり、1 μ M, 10 μ M NE を添加した場合は、30 分間かけてスパイク数が徐々に減少したのに対して、20 μ M NE を添加した場合は、15 分未満の間で急激にスパイク数が減少することが確認された。平均発火率のグラフから、20 μ M NE 添加後、およそ 2 分ほどで急激な減少が見られた。これらのことから、ある一定以上の濃度で NE を添加すると、数分以内に活動抑制効果が発生し、その濃度を下回る場合だと、およそ 30 分かけて当該効果が現れると考えられ、濃度によって反応時間の差が生まれることが示唆された。また、1 μ M, 10 μ M NE の添加によるスパイク数減少の度合いにも差があり、後者の方が大きかった。つまり、スパイク数の減少率は濃度に依存していることが示唆された。

3.4.2.2 ネットワークバースト特徴量変化の濃度依存性

いずれの濃度の NE を添加してもスパイク数と同様にネットワークバースト数が減少していた。また、他の特徴量に関しても、発達過程において見られた発達段階特異的な変化はなく、どの濃度の NE を添加しても減少していた。ここで、バースト数、バースト時間、バースト内スパイク数、バースト参加電極数、バースト率に関して、スパイク数の変化と同様、20 μ M NE を添加した場合は N1 の段階で急激な減少が確認された。それら特徴量に関しても、スパイク数の変化と同様、1 μ M, 10 μ M NE の添加による当該特徴量減少の度合いにも差があった。1 μ M NE 添加した試料のバースト数の平均値は減少しているが、標準偏差が大きいことから、減少が顕著に起こっていない試料、また減少が顕著に起こっている試料があることが推察される。以上より、試料によって NE の活動抑制効果が現れる濃度は異なることが示唆された。異なる理由としては、試料によって異なるネットワークの構造が考えられる。現在の本実験系では、同一の細胞懸濁液を用いたとしても、神経細胞、グリア細胞の配置については制御は困難である。そこで、微細加工技術を応用した細胞配置を行うことにより、ネットワーク構造と NE の効果の関係について検討できると考えられる。

3.4.2.3 周期的な活動発生への濃度依存性

正規化フーリエスペクトルの算出から、10 μ M, 20 μ M NE の添加によって、それぞれ 1/200 Hz, 3/800 Hz の周期的な活動が強調されたことが確認された。一方、1 μ M NE の添加によって、特定の周期をもつ活動の強調は確認できなかった。これらのことから、NE 添加による周期的な活動の発生にも濃度が寄与していることが考えられ、ある一定以上の濃度が添加されれば、周期的な活動が発生すると考えられる。また、試料が NE 添加前に保持していた周期的な活動の周波数に対して、強調される周波数が約 1/800 Hz 小さいことが 10 μ M, 20 μ M NE を添加した試料に共通していた。このことから、NE 添加によって、神経回路が持っているリズムに対して、およそ 1/800 Hz 小さい周波数の周期的な活動が強調されることが示唆された。

3.4.3 アドレナリン受容体アゴニスト添加

β アゴニストを添加した際、平均発火率、スパイク数、ネットワークバースト特徴量、正規化フーリエスペクトルとどの指標においても顕著な変化は現れていなかった。

$\alpha 1$ アゴニストを添加した際、平均発火率の変化量が N2 から大きくなり、特に N3 で最も大きかったが、スパイク数には顕著な変化は起きていなかった。つまり、スパイクの総数は同様のまま、周期活動の振幅は大きくなっていた。正規化フーリエスペクトルは、N3 において 3/400 Hz のパワーが大きくなっており、平均発火率の変化と矛盾ない結果となっていた。ネットワークバースト特徴量に関しては、いずれの指標においても特徴的な変化は起こっていなかった。

$\alpha 2$ アゴニストを添加した際、平均発火率は N1 から変化が起き、N2 から周期的な活動が強調された。正規化フーリエスペクトルは、N4 において 5/800 Hz のパワーが大きくなっており、平均発火率の変化と矛盾ない結果となっていた。また、スパイク数はアゴニスト添加に応じて減少していることが確認された。ネットワークバースト特徴量に関しては、アゴニスト添加によりバースト数とバースト間隔が増加し、バースト時間、バースト内スパイク数、バースト参加電極数が減少し、バースト率には変化がなかった。つまり、 $\alpha 2$ アゴニストを添加することによって、短いバーストが単発的に発生することが確認された。

これらの結果から、 $\alpha 1$ アゴニストはリズム形成には関与すること、 $\alpha 2$ アゴニストは培養神経回路網の活動抑制効果、リズム形成に関与することが考えられた。ここで、本実験における各試料数が 1 であること、S における活動が試料間でばらつきがあることから、本実験では確認されなかったが、 $\alpha 1$ アドレナリン受容体が活動抑制効果に、 β アドレナリン受容体が活動抑制効果とリズム形成に関わっていることは否定できない。また、同様にして本実験で確認されたアゴニストによる効果が再現性をもって発生するかを、試料数を追加して確認することが肝要である。

3.4.4 NE 添加による影響の総括

各発達段階に依らず、NE の複数添加によってスパイク数、ネットワークバースト数が減少していた。また、1 μ M, 10 μ M, 20 μ M と濃度を変化させても減少の効果は確認された。これらの結果から、NE はロバストな活動抑制効果を保持していることが示された。そして、濃度変化させた NE 添加の結果から、効果が現れる時間は濃度依存であること、NE の効果が現れる濃度は試料依存であることが示唆された。また、アドレナリン受容体アゴニストを添加してその影響を評価した結果、当該効果は主に $\alpha 2$ アドレナリン受容体に依るものであることが示唆されたが、今後は再現性の確認が肝要である。この NE の活動抑制効果は、2.4.2 での記述と同様、NE の抗てんかん作用に通じていると考えられ、その効果はロバストに現れることが確認され、今後の *in vitro* における NE を用いたネットワークレベルのダイナミクス評価の実験の基礎的事項となることが期待される。

3.5 結論

培養神経回路網に対する NE の添加の効果を系統的に評価するため、効果に対する発達段階の影響、効果の濃度依存性、関与するアドレナリン受容体の推定を行った。発達段階の影響に関しては、ダイナミクスが変化する培養開始後 2 週から 4 週の間の試料に共通して、NE の添加による活動抑制効果が現れた。また、ネットワークバーストのバースト数以外の特徴量に対する影響については、発達段階に応じて異なる反応が見られ、発達における GABA 作動性神経細胞の発達やネットワーク構造の変化が関与していることが示唆された。濃度依存性については、NE の濃度を 1 μM , 10 μM , 20 μM と 3 条件に分けて複数添加し、その影響に関して評価した。その結果、上記の濃度には依存せず活動抑制効果が確認された。しかし、その活動抑制効果の度合いについては濃度に依存していることが示唆され、その依存性については試料によって異なることも示唆された。関与する受容体に関しては、 $\alpha 1$, $\alpha 2$, β アドレナリン受容体のアゴニストをそれぞれ 1 試料の培養神経回路網に対して添加し、活動の変化を評価した。その結果、 $\alpha 1$ アドレナリン受容体アゴニスト添加は周期的な活動の強調に一部寄与すること、 $\alpha 2$ アドレナリン受容体アゴニスト添加は活動抑制効果と周期的な活動の強調に関与すること、 β アドレナリン受容体アゴニスト添加は活動に大きく影響与えないことが確認された。

以上の結果より、NE の発達段階、濃度に大きく依存しないロバストな活動抑制効果が見られた。

第4章 青斑核単独培養系の構築

4.1 概要	82
4.2 方法	83
4.2.1 デバイス作製	83
4.2.2 細胞培養	84
4.2.3 免疫組織化学染色	86
4.2.4 細胞外電位計測	87
4.2.5 実験プロトコル	87
4.2.6 スパイク解析	87
4.2.7 ネットワークバースト解析	87
4.2.8 移動エントロピー解析	88
4.3 結果	90
4.3.1 免疫組織化学染色	90
4.3.2 スパイク解析	91
4.3.3 ネットワークバースト解析	94
4.3.4 移動エントロピー解析	96
4.4 考察	99
4.4.1 青斑核由来培養神経回路の非同期的活動	99
4.4.2 青斑核由来培養神経細胞の活動特性	99
4.5 結論	101

4.1 概要

MEA を用いた青斑核と海馬の共培養系の構築のためには、青斑核と海馬の培養方法を確立する必要があるが、MEA 上で青斑核由来神経回路網を培養しそのダイナミクスを評価した例はない。これまでに、生体外で青斑核由来神経回路を培養した例は報告されている (Cao et al. 2010; Masuko et al. 1986; Rosenberg, Schweitzer, and Dichter 1985) が、パッチクランプを用いた活動計測であり、空間分解能、計測時間ともに長期的な活動評価する上では十分でない。そこで、それらの報告を参考に、MEA 上での青斑核の単独培養系の確立を目的として、青斑核の摘出、青斑核由来神経回路網の培養、当該神経回路網の活動計測と解析を行った。

通常 MEA 上の培養で用いられる海馬や大脳皮質に比べて青斑核の神経細胞数は少ないため、培養細胞密度を海馬や大脳皮質のものと同様にするため、生体適合性の高いシリコンゴム PDMS のリングを作製し、MEA と組み合わせたデバイスを作製した。そして、そのデバイスを用いて青斑核を培養、活動計測し、通常の MEA を用いて培養された海馬と大脳皮質が示すダイナミクスと比較し、青斑核由来培養神経回路網のダイナミクスについて評価した。ダイナミクスの評価には、スパイク、ネットワークバースト、移動エントロピーを用いた。スパイクは細胞レベルの活動を評価するため、ネットワークバーストは神経回路の同期性を評価するため、移動エントロピーは細胞間の結合強度を推定するため用いた。

4.2 方法

4.2.1 デバイス作製

細胞数の少ない青斑核を密に培養するため、生体適合性の高いシリコーンゴム PDMS のリング構造物と MEA を組み合わせた培養デバイスを作製した (図 4.1). PDMS リングは、1~2mm 厚、外円直径 7mm、内円直径 5mm のもので、主剤と硬化剤を 10 対 1 の配分で混合した Silpot 184 (東レ・ダウコーニング社) を硬化させた後、直径 7mm と 5mm のパンチ (新潟精機社) を利用して作製した. MEA は、Jimbo らの設計 (Jimbo et al. 2003, 1999) と同様、中央に 250 μm おきに 8 \times 8 の格子状に配置された、大きさ 30 μm \times 30 μm の電極を保持したものをを用いた. そして、作製した PDMS リングと MEA を顕微鏡下で位置合わせすることにより、培養デバイスを作製した. またデバイスは、0.1% Polyethyleneimine (和光純薬工業社) を用いて細胞接着性を向上させる表面処理を施した.

細胞数が十分得られる海馬と大脳皮質のためのデバイスは、PDMS リングを付けずに用いた.

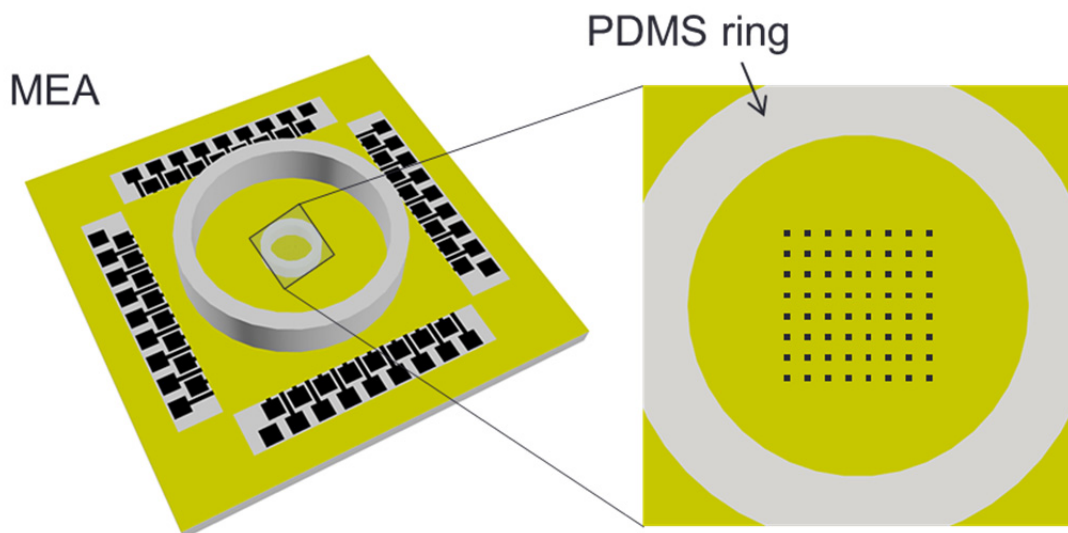


図 4.1 培養デバイス

4.2.2 細胞培養

青斑核由来神経回路網の活動を評価するため、当該神経回路網の培養に加えて、活動の比較対象として、海馬由来、大脳皮質由来神経回路網を培養した。以下、その手順について述べる。

4.2.2.1 青斑核培養

1～5 日齢 Wistar ラット新生児から摘出された全脳を、切片チョッパーMcIlwain Tissue Chopper (MICKLE Laboratory Engineering 社) を用いて 300 μ m 厚の脳スライスを作製した。Masuko らの手法 (Masuko et al. 1986) と Joseph らのアトラス (Joseph and Shirley 1994) を参考にし、青斑核を含む切片を顕微鏡下で摘出した (図 4.2; 図 4.3)。そして、当該切片を 0.25% Trypsin (Life Technologies 社) で酵素処理して単離させた。そして、培養デバイス上に、単離した細胞を約 5 万個播種した。基本培地には Minimum Essential Media (MEM; Life Technologies 社) に 14.5 mM D-glucose (Sigma-Aldrich 社), 2 % B-27 Supplement (Life Technologies 社), 2mM L-glutamine (Life Technologies 社), 25 unit/ml Penicillin-Streptomycin (Life Technologies 社) を添加した溶液を用いた。細胞播種時のみ、基本培地と馴化培地を 1:1 の比率で混合した溶液を用いた。馴化培地には基本培地を Wistar ラット新生児大脳皮質由来の神経回路の培養に 1～2 週間使用したものをを用いた。そして、全て 37 °C ・ 水蒸気飽和 ・ 5 % CO₂ 条件のインキュベータ内で培養し、3～4 日に 1 回半量培地交換を行った。以下、本培養神経回路網を LC と略記する。

4.2.2.2 海馬培養

1～5 日齢 Wistar ラット新生児から大脳皮質を摘出し、青斑核由来神経細胞の培養と基本培地、馴化培地以外は同様の方法で細胞単離し、培養した。基本培地には Neurobasal Medium (NB; Life Technologies 社) に 2 % B-27 supplement (Life Technologies 社), 0.5 mM glutamax (Life Technologies 社), 100 unit/ml Penicillin-Streptomycin (Life Technologies 社) を添加した溶液を用いた。馴化培地には基本培地を Wistar ラット新生児大脳皮質由来の神経回路の培養に 1～2 週間使用したものをを用いた。以下、本培養神経回路網を HP と略記する。

4.2.2.3 大脳皮質培養

胎齢 18 日の Wistar ラット胎児から大脳皮質を摘出し、青斑核由来神経細胞の培養

と基本培地，馴化培地以外は同様の方法で細胞単離し，培養した．基本培地には Dulbecco's Modified Eagle Medium (D-MEM; Life Technologies 社) に 10% Fetal Bovine Serum (FBS; コスモバイオ社)，5% Horse Serum (HS; Life Technologies 社)，100 unit/ml Penicillin-Streptomycin (Life Technologies 社) を添加した溶液を用いた．馴化培地には基本培地を Wistar ラット胎児大脳皮質由来の神経回路の培養に 1～2 週間使用したものを用いた．以下，本培養神経回路網を CX と略記する．

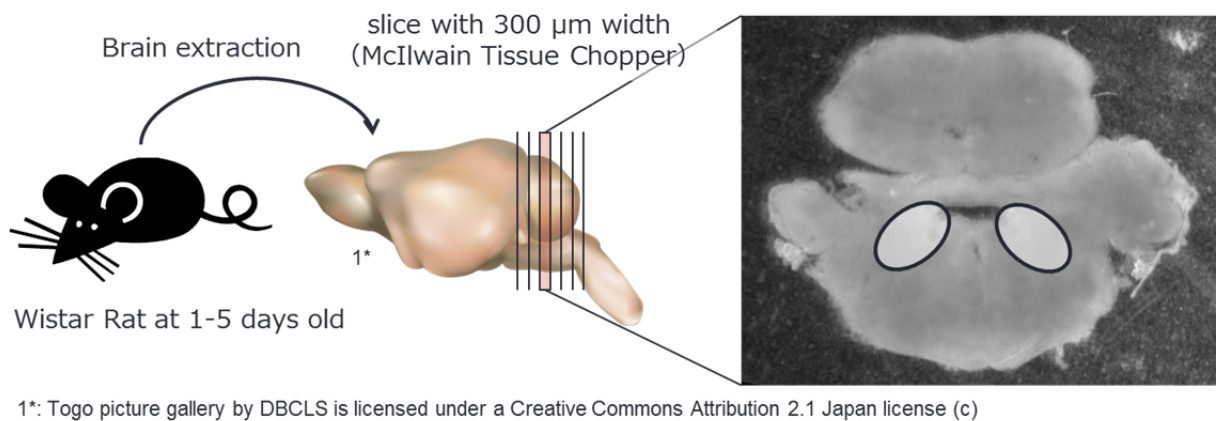


図 4.2 青斑核摘出

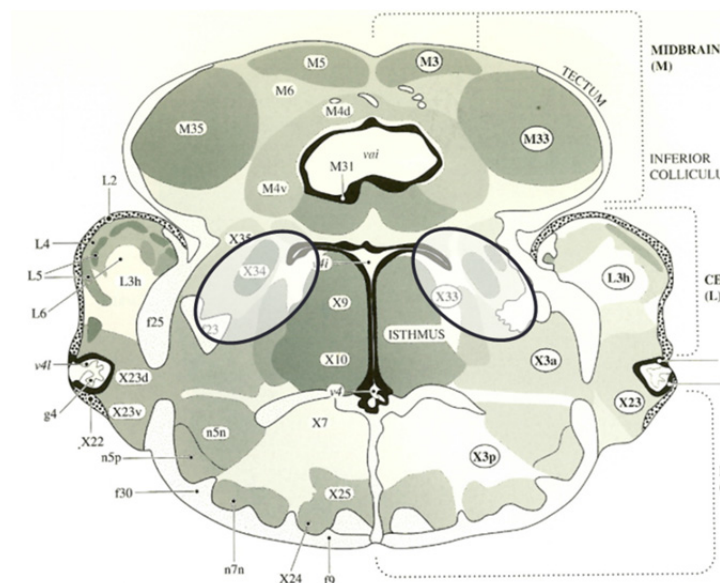


図 4.3 アトラス (Joseph and Shirley 1994)

4.2.3 免疫組織化学染色

青斑核の摘出を確認するため、免疫組織化学染色を行った。

まず、試料を固定する目的で、37°C に加温した固定液 4 % (V/V) Paraformaldehyde 含 Phosphate buffered saline (PBS) (和光純薬工業社) を加えて培養液を置換し、20～30 分間室温中で静置した。そして、細胞膜を可溶化してブロッキング剤や抗体の浸透性を高める膜貫通液 0.25 % (V/V) Triton-X100 (Calbiochem 社) と細胞内の非特異的抗原への 1 次抗体の結合を予め防ぐための 4 % (W/V) ブロックエース (大日本住友製薬社) を固定液と置換し、12 時間冷蔵庫内で静置し、ブロッキング処理を行った。そして、ノルアドレナリン作動性神経細胞のマーカーとなる Dopamine beta hydroxylase (DBH)、神経細胞のマーカーとなる β -tubulin を確認するため、Anti-DBH 抗体 (rabbit; Abcam 社) と Anti- β -tubulin 抗体 (mouse; Abcam 社) を 1:500 の割合で 0.4 % (W/V) ブロックエースによって希釈し、溶液を置換し、4 °C の冷蔵庫内で 1 日間、反応させて標識した。そして、各 1 次抗体に対応する 2 次抗体抗ウサギ Alexa Fluor 546 IgG (Molecular Probes 社) と抗マウス Alexa Fluor 488 IgG (Molecular Probes 社) を 1:1000 の割合で、また、細胞核を標識する 4',6-Diamidino-2-Phenylindole (DAPI; Sigma-Aldrich 社) を最終濃度 300nM となるよう 0.4 % (W/V) ブロックエースによって希釈し、室温で 1～2 時間反応させ標識した。そして、冷却 CCD カメラ C8800-21C (浜松ホトニクス社) を取り付けた位相差顕微鏡 IX-71 (オリンパス社) を用いて蛍光画像を取得した。

4.2.4 細胞外電位計測

2.2.2 と同様の方法で細胞外電位計測を行った。

4.2.5 実験プロトコル

青斑核，海馬，大脳皮質由来神経回路網を各 4 試料ずつ 21 日間培養し，それぞれ細胞外電位計測を 10 分間ずつ行った。

4.2.6 スパイク解析

4.2.6.1 スパイク検出

2.2.4.1 と同様の方法で，スパイク検出を行った。

4.2.6.2 スパイク数比較

LC, HP, CX における電極におけるスパイク数を算出し，それらの比較を Wilcoxon rank sum test で行った．多重比較の補正には Bonferroni 補正を用いた。

4.2.6.3 Inter-spike interval 算出

各試料のスパイクデータをもとに，連続するスパイク時刻の差分である，スパイクの間隔 ISI (Inter-spike interval) を算出した．また，0 ms から 1000 ms まで，5 ms の時間区画幅を用いて，ISI のヒストグラムを作成した。

4.2.7 ネットワークバースト解析

2.2.6 と同様の方法でネットワークバースト解析を行った。

4.2.8 移動エントロピー解析

4.2.8.1 移動エントロピー算出

電極間の結合強度を推定するため、Ito らの遅延付き多次元移動エントロピー (Ito et al. 2011) を算出した。

最初にスパイクデータを時間区間 (bin) 幅で区切り、bin 内にスパイクがある場合は 1、ない場合は 0 を保持する、2 値化スパイク列を作成した。そして、その 2 値化スパイク列をもとに、電極番号 J から I への移動エントロピー (TE; transfer entropy) $TE_{J \rightarrow I}$ を以下の式を用いて算出した。

$$TE_{J \rightarrow I}(d) = \sum p(i_{t+1}, i_t^{(k)}, j_{t+1-d}^{(l)}) \log_2 \frac{p(i_{t+1} | i_t^{(k)}, j_{t+1-d}^{(l)})}{p(i_{t+1} | i_t^{(k)})} \quad (6)$$

$$TE_{J \rightarrow I} = \max_{d=1, \dots, D} (TE_{J \rightarrow I}(d)) \quad (7)$$

ここで、 $p(a, b)$ は a と b の同時生起確率、 $p(a|b)$ は b が起こったときに a が起こる条件付き確率、 i_t, j_t は I, J の 2 値化スパイク列 i 番目の bin, k, l は移動エントロピーの次元、 $a_t^{(m)}$ は $(a_t, a_{t-1}, \dots, a_{t-m+1})$, d は遅延、 D は計算を行う遅延 bin 数を表す (図 4.4)。

電極番号 J と I のスパイクデータが独立であれば、 $p(i_{t+1} | i_t^{(k)}, j_{t+1-d}^{(l)})$ と $p(i_{t+1} | i_t^{(k)})$ は同じ値となるため、TE は 0 となる。TE はカルバックライブラー情報量であるため、独立でなければ、必ず正となる。

4.2.8.2 パラメータ感度分析

Ito らは移動エントロピーを検出する際、bin, k, l, D をそれぞれ 1 (ms), 2, 3, 30 と設定していた (Ito et al. 2011)。bin が 1ms と設定されていることに関しては、化学シナプスの伝達時間が数 ms であることから妥当であると考えられるが、それ以外のパラメータに関しては、本実験系における妥当性は不明確である。そこで、Ito らが用いたパラメータ値を基本パラメータ値として、本実験系におけるパラメータを設定するため、 k または l のみを 1 から 1 おきに 5 まで変化させた場合と D の

みを 1, 5, 10, 20, 30, 50, 100, 200 と変化させた場合で移動エントロピーを検出し、結果に対するパラメータの依存性を評価した。

4.2.8.3 ランダムスパイクデータとの比較

算出された移動エントロピーの評価を行うため、各部位のスパイクデータからそれぞれランダムスパイクデータを生成し、それらのランダムスパイクデータから移動エントロピーを算出し、元のスパイクデータから算出された移動エントロピーをそれぞれ比較した。

ランダムスパイクデータは定常ポアソン過程を用いて生成した。ポアソン過程は無記憶性のある指数関数を用いた確率過程であり、ランダムなデータを生成するために用いられる、スパイクの瞬間発生率を λ (spikes/s) とすると、ポアソン過程ではある短い時間幅 Δt (s) 内でスパイクが発生する確率が $\lambda \Delta t$ に従う。そこで、 λ を計測時間内に検出された電極における全スパイク数/計測時間(s)、 Δt を 0.0005(=0.5ms)として、電極毎にランダムスパイクデータを生成した。

移動エントロピーは、4.2.8.2 の結果をもとに設定したパラメータを用いて算出した。また、それらの比較は Wilcoxon rank sum test を用いて行った。

4.2.8.4 各部位の移動エントロピー比較

4.2.8.2 の結果をもとに設定したパラメータを用いて、LC, HP, CX の全試料における電極間の移動エントロピーを算出し、それらの比較を Wilcoxon rank sum test で行った。多重比較の補正には Bonferroni 補正を用いた。

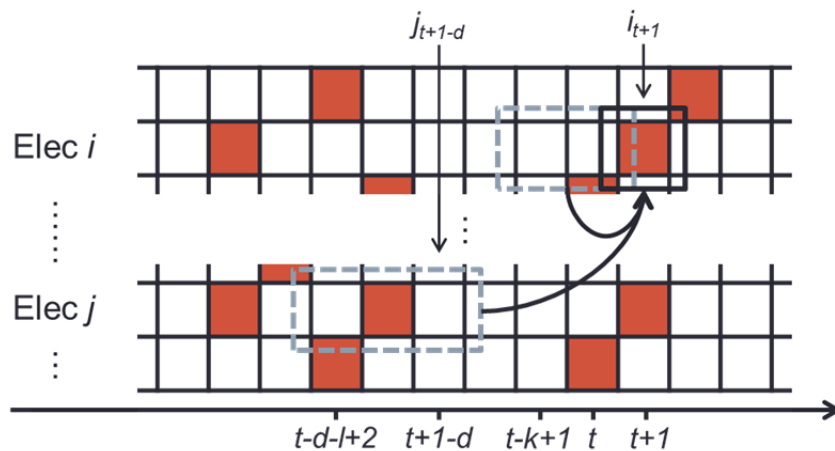


図 4.4 移動エントロピー

4.3 結果

4.3.1 免疫組織化学染色

図 4.5 に、免疫組織化学染色と核染色の結果を示す。ノルアドレナリン作動性神経細胞のマーカである DBH は緑色、核のマーカである DAPI は青色、神経細胞のマーカである β III-tubulin は赤色で示し、Merged は上記 3 つの画像を重ね合わせた画像である。DBH の結果から、ノルアドレナリン作動性神経細胞の存在が確認された。

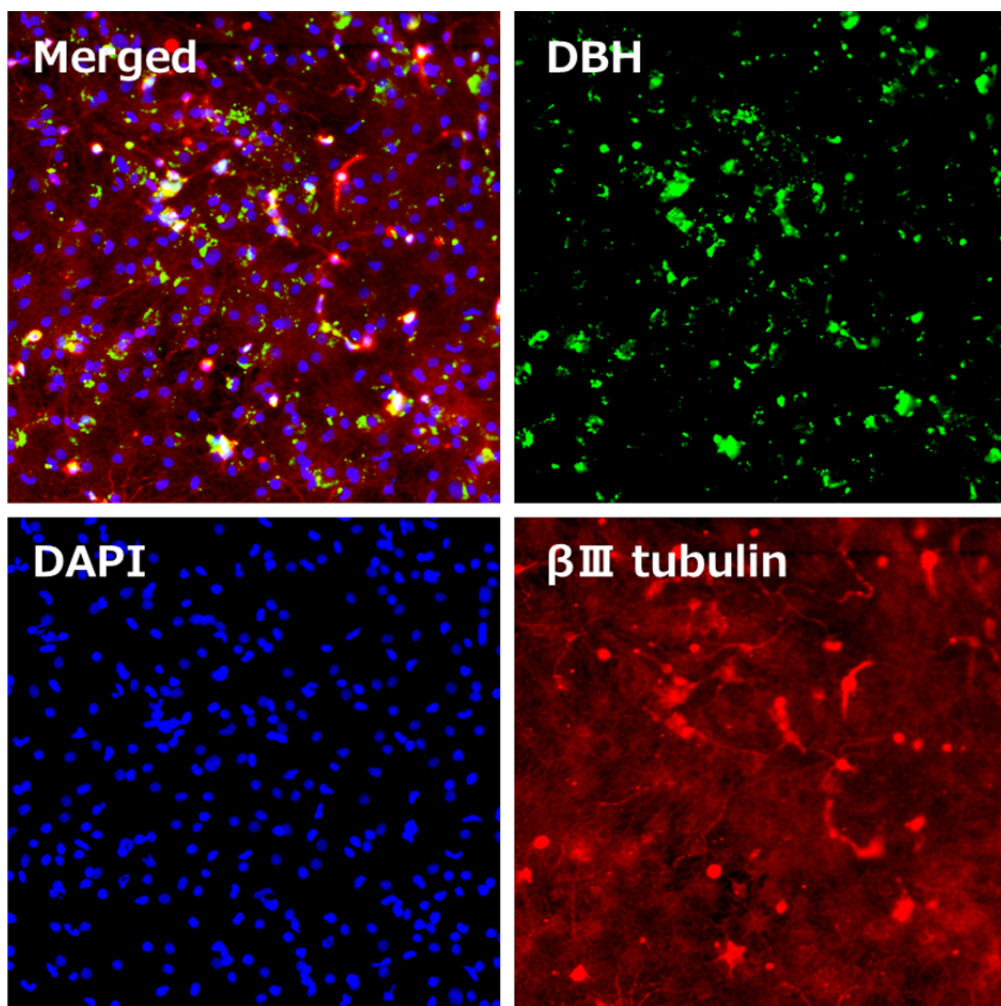


図 4.5 免疫組織化学染色

4.3.2 スパイク解析

4.3.2.1 平均発火率とラスタプロット

LC, HP, CX の活動の概観を把握するため、平均発火率とラスタプロットを作成した。図 4.6 に平均発火率、図 4.7 にラスタプロットを示す。図 4.6 (a), (b), (c) はそれぞれ LC, HP, CX の代表的な試料の平均発火率の全有効電極平均 (AFR) を示す。縦軸は平均発火率、横軸は時間を示している。図 4.7 (a), (b), (c) は、それぞれ LC, HP, CX の代表的な試料のラスタプロット、(d), (e), (f) はそれぞれ (a), (b), (c) の一部を拡大したラスタプロットを示している。縦軸は電極番号、横軸は時間、黒い点はスパイクを示している。

平均発火率において、CX の試料は LC, HP の試料に比べて、平均発火率の変化が起こっていなかった。また、LC, HP の試料に関しても、平均発火率は時間とともに変化するものの、顕著な周期的な活動は確認されなかった。

ラスタプロットにおいて、HP, CX の試料では、神経回路が全体的に同期する、ネットワークバーストが確認されたが、LC の試料においては、そのような同期活動は見られなかった。

4.3.2.2 スパイク数比較

各部位由来培養神経回路網の総スパイク数を算出し、比較を行った。図 4.8 (a), (b), (c) に、それぞれ LC, HP, CX の全試料におけるスパイク数の平均値を示す ($N_{LC}=4$, $N_{HP}=4$, $N_{CX}=4$)。横軸は脳部位、縦軸はスパイク数を表している。どの脳部位間においても、有意な差は見られなかった。

4.3.2.3 Inter-spike interval

各部位由来培養神経回路網の ISI を算出し、その比較、ヒストグラムの作成を行った。

図 4.9 に、LC, HP, CX の全試料の電極における ISI の平均値と標準偏差を示す。横軸は各脳部位、縦軸は ISI を表している。LC における ISI は HP, CX のものに比べて有意に大きかった。

図 4.10 (a), (b), (c) に、それぞれ LC, HP, CX の代表的な試料におけるスパイク間隔のヒストグラムを示す。横軸は ISI、縦軸は度数を表している。LC の ISI 分布は HP, CX の ISI 分布と異なっていることが確認された。

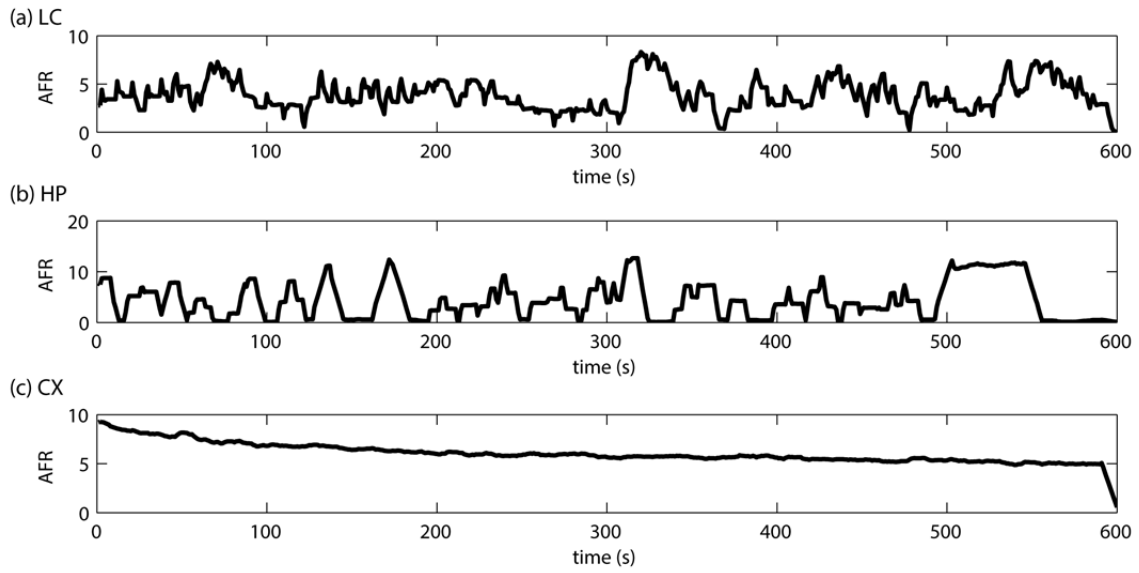


図 4.6 平均発火率

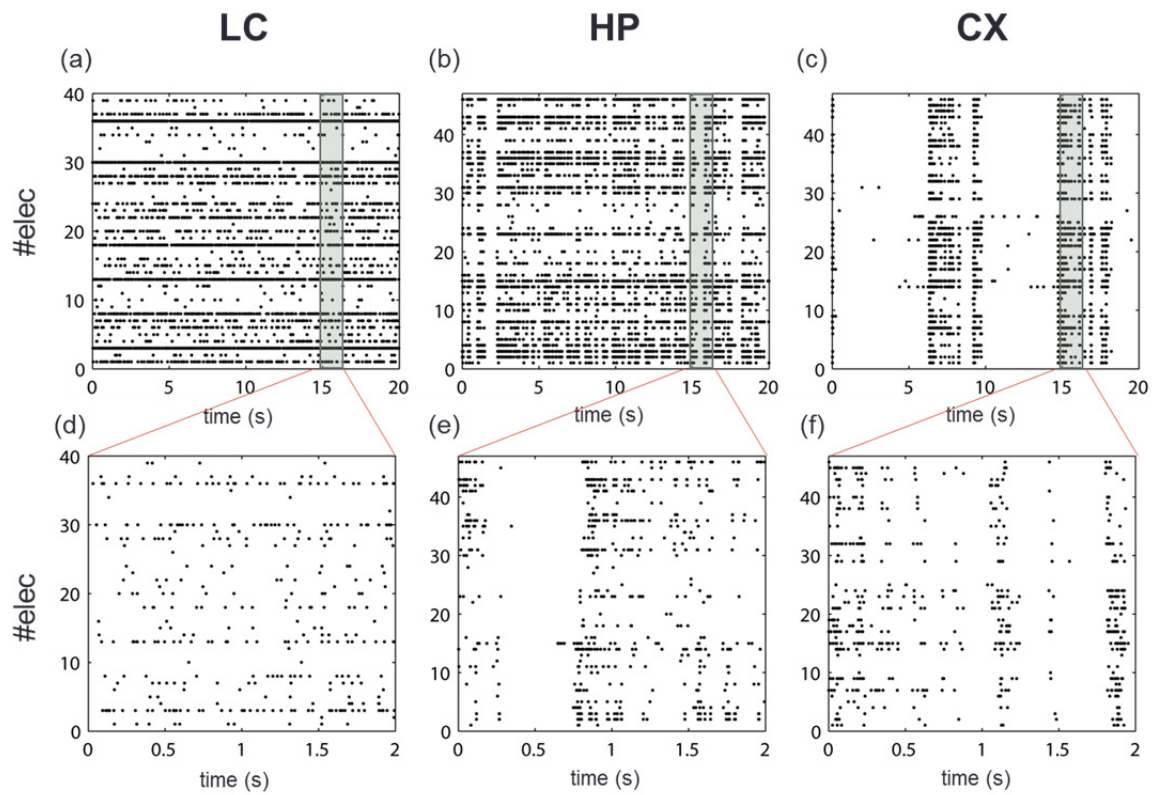


図 4.7 ラスタープロット

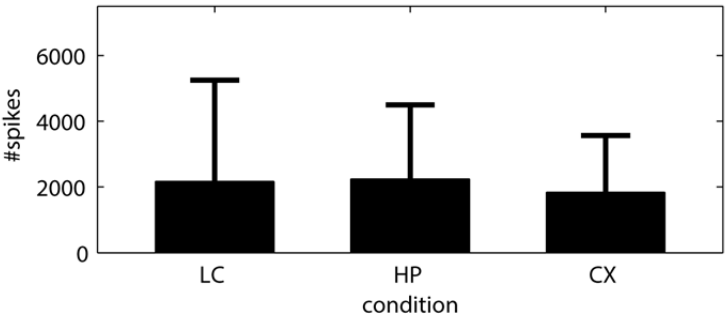


図 4.8 スパイク数

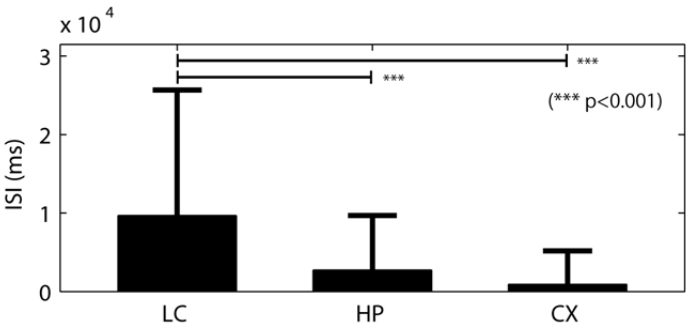


図 4.9 スパイク間隔

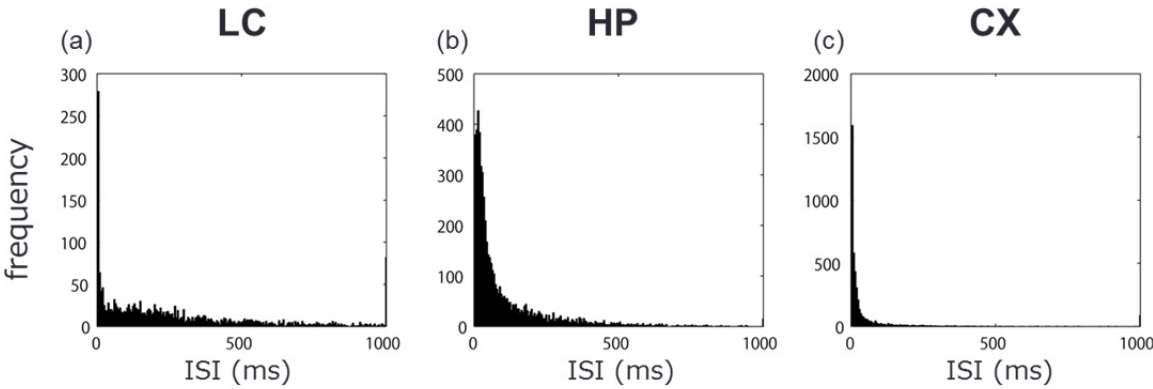


図 4.10 スパイク間隔のヒストグラム

4.3.3 ネットワークバースト解析

ネットワークバースト活動を検出し、バースト数、バースト時間、バースト内スパイク数、バースト参加電極数、バースト間隔、バースト率に着目し、各状態間比較を行った。その結果を図 4.11 に示す。横軸は各脳部位を表し、縦軸は (a) はバースト数、(b) はバースト時間、(c) はバースト内スパイク数、(d) はバースト参加電極数、(e) はバースト間隔、(f) はバースト率の試料平均を表している。

LC のバースト数は HP, CX のものに比べて小さいが、バースト時間、バースト内スパイク数、バースト間隔が HP, CX のものに比べて、値が 2 桁以上高く、極めて大きくなっていた。

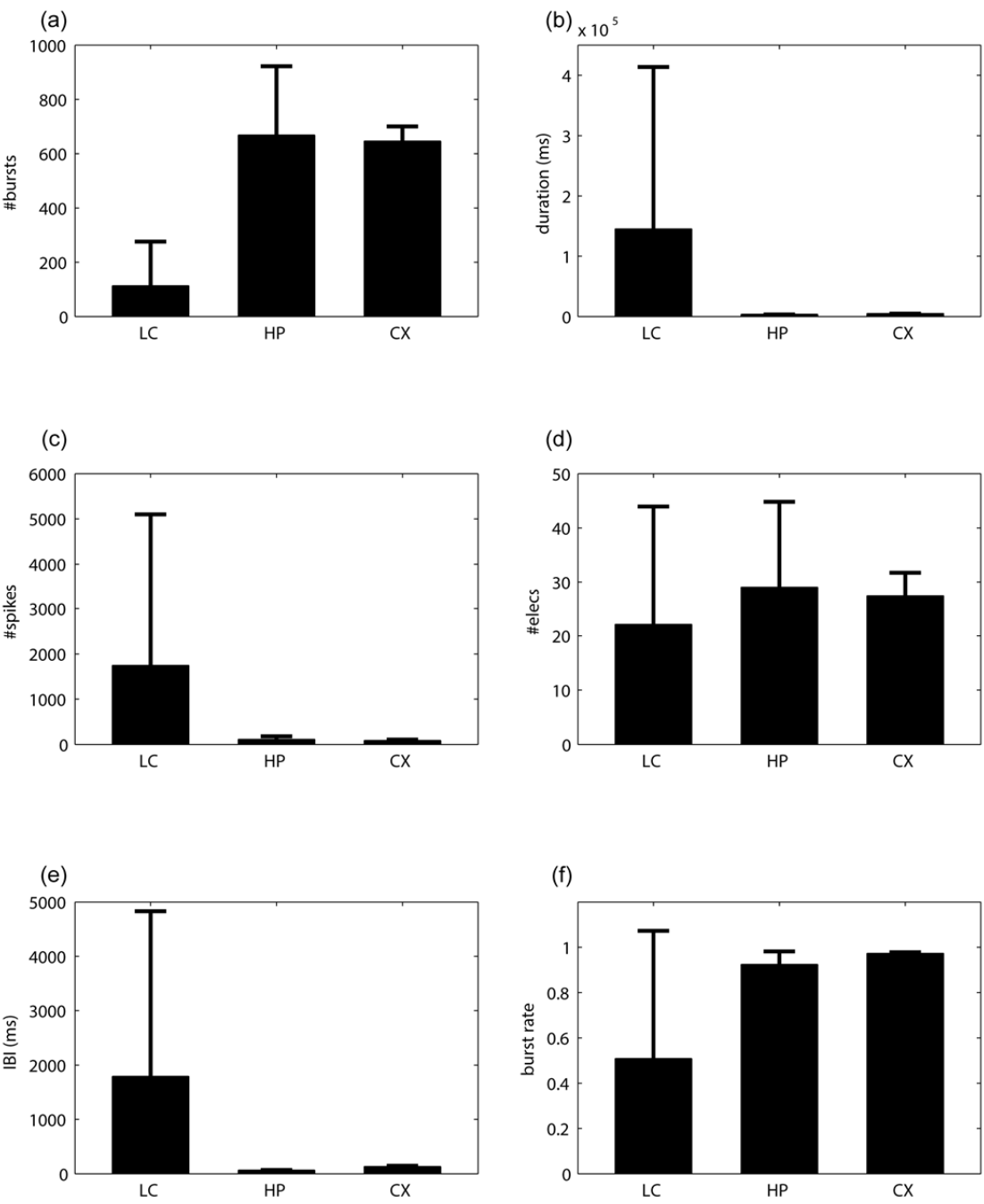


図 4.11 ネットワークバースト

4.3.4 移動エントロピー解析

4.3.4.1 パラメータ感度分析

基本パラメータ値をもとに、 k のみを 1 から 1 おきに 5 まで変化させた時、 l のみを 1 から 1 おきに 5 まで変化させた時、 D のみを 1, 5, 10, 20, 30, 50, 100, 200 と変化させた時の各部位における移動エントロピーをそれぞれ図 4.12 (a), (b), (c) に示す。

D の値が小さい場合、結合を考慮する範囲が小さくなるため、移動エントロピーは小さくなると考えられる。実際、LC と HP においては、 D が 5 ms 以下であると移動エントロピーが急激に減少しており、 D に関しては 5ms より大きい値が適切であると考えられる。また、いずれの値でも各部位の移動エントロピーの相対的な大小関係は変わらなかった。また、化学シナプスの伝達時間が数 ms 程度であることをふまえると、 D が 30 であることは妥当であると考えられる。これらの結果と考察、Ito らの先行研究 (Ito et al. 2011) をふまえて、本解析では、 k , l , D として、それぞれ 2, 3, 30 を用いることとした。

4.3.4.2 ランダムスパイクデータとの比較

LC, HP, CX のスパイクデータから生成されたランダムスパイクデータをもとに算出された移動エントロピーの平均値と標準偏差を、図 4.13 に示す。HP と CX に関しては、両グループにおいて、ランダムスパイクデータから算出された移動エントロピーは元のスパイクデータから算出された移動エントロピーに対して有意に低かった。

4.3.4.3 各部位の移動エントロピー比較

4.3.4.1 の結果をもとに設定したパラメータを用いて算出した、LC, HP, CX の全試料における移動エントロピーの平均値と標準偏差を、それぞれ片対数グラフとして図 4.14 に示す。横軸は脳部位、縦軸は \log (移動エントロピー) を表している。

LC の移動エントロピーは HP, CX のものに比べて有意に小さかった。値としては、4 桁以上異なっていた。

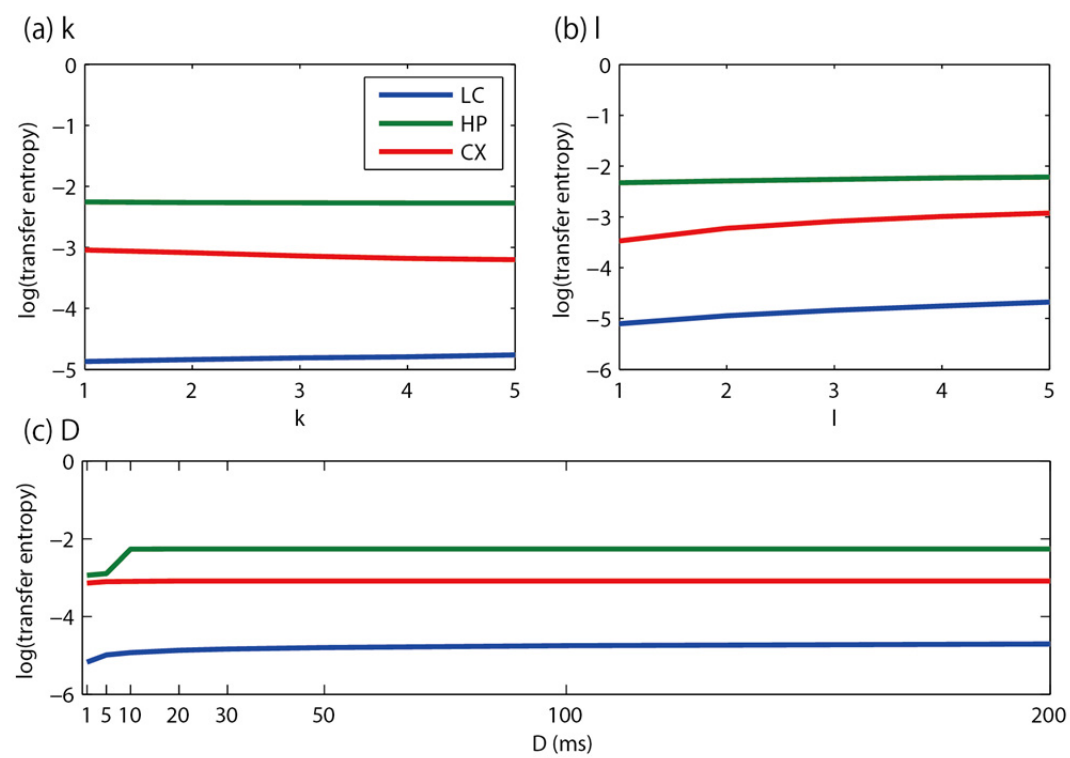


図 4.12 パラメータ感度分析

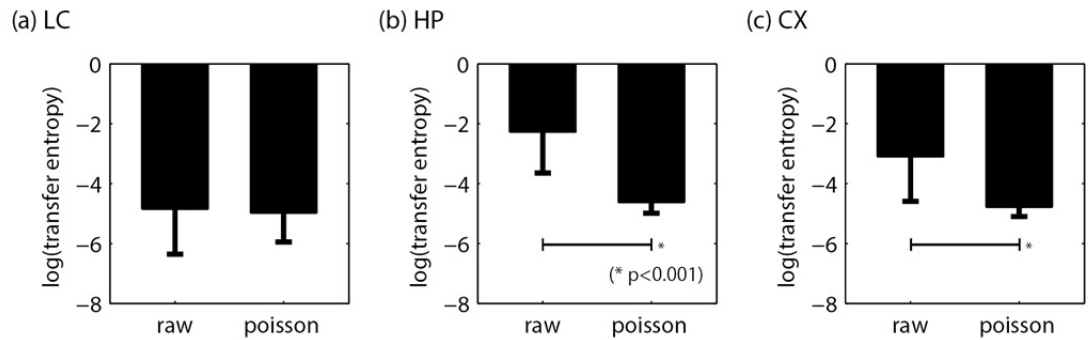


図 4.13 ランダムスパイクデータの移動エントロピー比較

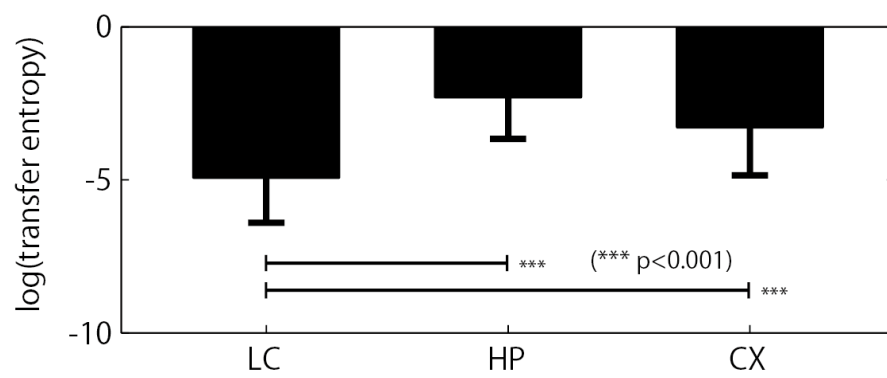


図 4.14 移動エントロピー

4.4 考察

4.4.1 青斑核由来培養神経回路の非同期的活動

ラスタプロットより、HP, CX が同期的な活動であるネットワークバーストを示していたのに対して、LC は非同期的な活動を示していた。しかし、ネットワークバースト解析の結果、LC のバースト数は少なかったが、バースト時間、バースト内スパイク数、バースト間隔の平均値は HP, CX のものに比べて 2 桁以上大きかった。これは、LC の神経細胞の一部が定常的に高頻度に活動していたため、アルゴリズム上、それをネットワークバーストとして誤検出してしてしまったため、と考えられる。そのため、本実験で利用したネットワークバースト検出手法は、LC の活動解析には適さないと考えられる。ここで、LC の移動エントロピーが HP, CX のものよりも 4 桁以上小さかったこと、ランダムスパイクデータから算出された移動エントロピーと値が大きく変わらなかったことは、LC の神経回路の結合が疎であることを示唆しており、ラスタプロットにおける定性的な評価と矛盾しない。

HP, CX ではネットワークバーストが確認され、LC では確認されなかった理由としては神経細胞の種類の差異が挙げられる。ネットワークバーストは興奮性シナプスにより生成される (Kamioka et al. 1996)。海馬や大脳皮質は主に興奮性神経伝達物質であるグルタミン酸作動性神経細胞から構成されており、青斑核は主に神経調節物質であるノルアドレナリン作動性神経細胞から構成されている (Berod et al. 1984)。これらのことから、LC ではネットワークバーストが確認されなかったと考えられる。

4.4.2 青斑核由来培養神経細胞の活動特性

LC, HP の平均発火率から特徴的な活動は確認されず、CX については発火率の変化率が小さく、直線的に平均発火率が変化していた。変化率が小さかった理由としては、平均発火率の計算方法と CX の活動頻度が要因だと考えられる。図 4.6 に示した平均発火率は 10 秒間のスパイクデータの平均として算出しており、CX が示すネットワークバーストが 10 秒に 1 回周期的に起こっていたため平均発火率を算出すると変化率が小さくなったと考えられる。海馬由来培養神経回路網に対して NE 添加した際の影響の定性的な把握に有用だった、本手法によって算出した平均発火率は、LC のダイナミクスの理解には有用でないと考えられる。

スパイク数に関しては、LC、HP、CX、それぞれの試料の平均値は大きく変わらなかったが、標準偏差は LC が最も大きかった。これは、HP、CX における個々の神経細胞に固有の活動特性があったとしても、ネットワークバーストにより活動が全体的に類似しているため、個々の活動が全体と類似しており、一方、LC では非同期的な活動を示しているため、個々の細胞の持つ活動特性がそのままその細胞の活動に反映されるためと考えられる。実際、青斑核内の神経細胞で定期的な発火を示すレギュラースパイキング細胞や短時間内に連続的に発火するバースティング細胞がいることが確認されている (Masuko et al. 1986)。

また、LC の ISI ヒストグラムは HP、CX のものとは異なっていた。図 4.15 (a), (b) に LC の ISI ヒストグラムを再掲、Aston-Jones らがラット生体内の青斑核の神経細胞から得た ISI ヒストグラム (Aston-Jones and Bloom 1981a) を示す。2つのヒストグラムが類似していることから、本実験系でノルアドレナリン作動性神経細胞の電気活動が計測できたことが示唆された。

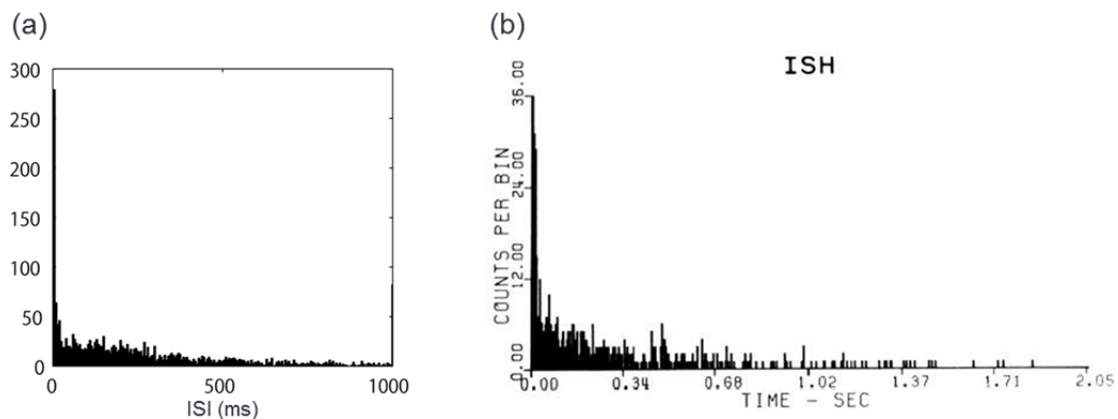


図 4.15 ISI ヒストグラム (b) (Aston-Jones and Bloom 1981a)

4.5 結論

MEA を用いた青斑核の単独培養系の確立とそのダイナミクス評価を目的に，MEA 上に青斑核を培養し，そのダイナミクスを，数多くの知見がある海馬と大脳皮質由来の培養神経回路網のダイナミクスと比較することで評価した．その結果，青斑核由来培養神経回路網は，海馬や大脳皮質由来培養神経回路網が示す特徴的な同期活動であるネットワークバーストを示さず，非同期的な活動を行っていた．また，結合強度を反映していると考えられる移動エントロピーの解析によって，青斑核の結合強度は，海馬や大脳皮質の結合強度に比べて，極めて小さいこと，青斑核由来培養神経回路網内の結合は疎であることが示された．また，ISI ヒストグラムが生体内で計測された青斑核から算出された ISI ヒストグラムと類似していたことから，本実験系における青斑核由来培養神経回路網はノルアドレナリン作動性神経細胞を有していることが示唆された．これらの結果より，MEA における青斑核の単独培養系を確立したと考えられる．

第5章 青斑核-海馬共培養系の構築

5.1 概要	103
5.2 方法	104
5.2.1 デバイス作製	104
5.2.2 細胞培養	113
5.2.3 細胞外電位計測	114
5.2.4 実験プロトコル	114
5.2.5 スパイク解析	114
5.2.6 ネットワークバースト解析	114
5.2.7 結合解析	115
5.3 結果	117
5.3.1 細胞培養	117
5.3.2 スパイク解析	118
5.3.3 ネットワークバースト解析	121
5.3.4 結合解析	123
5.4 考察	127
5.4.1 青斑核-海馬の短期的作用	127
5.4.2 青斑核-海馬の長期的作用	127
5.4.3 青斑核の同期活動	129
5.5 結論	130

5.1 概要

第 4 章で確立した青斑核の培養方法を応用し，MEA を用いた青斑核と海馬の共培養系の確立とそのダイナミクスの評価を行った．

具体的には，共培養用のデバイスを作製し，そのデバイス上で青斑核と海馬を共培養し，そのダイナミクスを，そのデバイスに海馬のみを培養した試料のダイナミクスと比較することにより評価した．

共培養のためのデバイスは，独自に設計し，フォトリソグラフィを用いて作製した MEA と PDMS 構造物から構成されており，2 つの培養区画と各区画をつなぐ微小通路から成り立っている．そのデバイス上の 2 つの区画に青斑核と海馬を培養した共培養の試料，1 つの区画に海馬のみを培養した単独培養の試料を用いて，ダイナミクスの評価を行った．ダイナミクスの評価には，スパイク，ネットワークバースト，相対スパイク時刻，移動エントロピーを用いた．スパイクは細胞レベルの活動を評価するため，ネットワークバーストは海馬由来培養神経回路網のネットワークレベルのダイナミクスに対する青斑核の影響を評価するため，相対スパイク時刻と移動エントロピーは細胞間の機能的な結合と結合強度を評価するため用いた．

5.2 方法

5.2.1 デバイス作製

青斑核と海馬の共培養系を構築するため、各部位を培養可能な 2 つの区画を持ち、区画間に微小な通路を複数持つ PDMS 構造物と当該構造物に対応した電極パターンを保持する MEA を組み合わせたデバイスを作製した (図 5.1). 以下、その作製の手順について述べる (図 5.2).

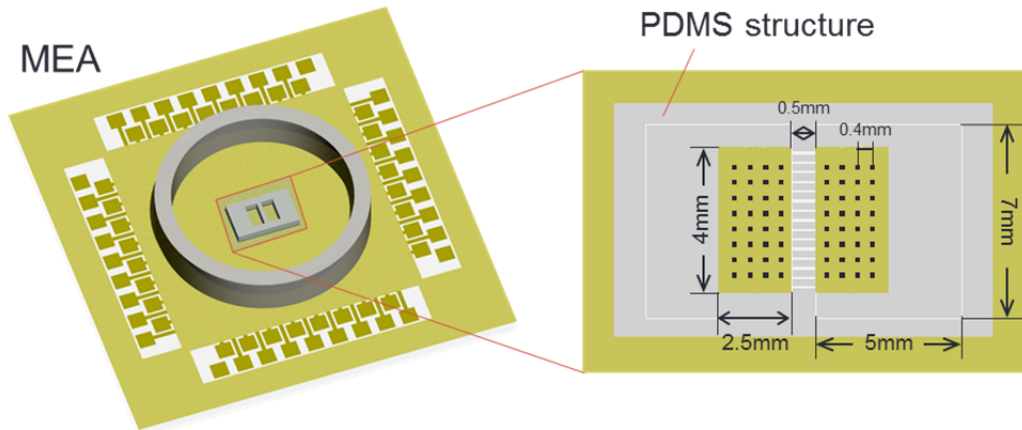


図 5.1 共培養デバイス

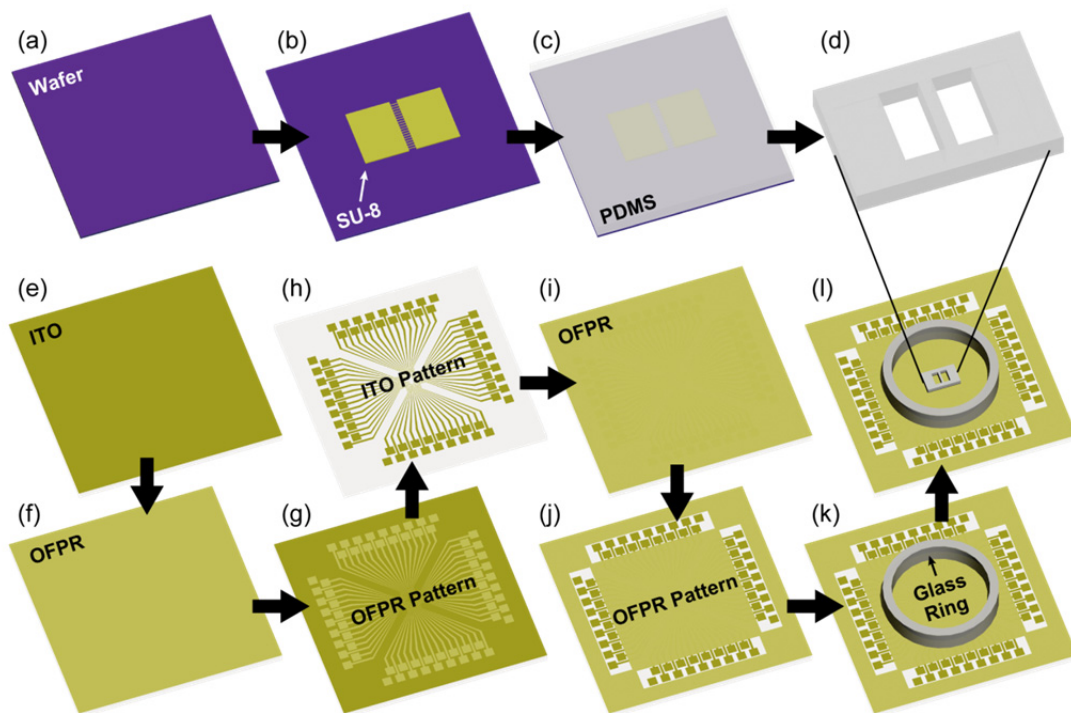


図 5.2 デバイス作製

5.2.1.1 MEA 作製

フォトリソグラフィを用いて、共培養デバイスを構成する MEA を作製した。本目では、MEA における電極パターンと必要部分以外を絶縁するためのパターンの設計、透明で導電性を保持する ITO (Indium-tin-oxide; 酸化インジウムスズ) 基板に対して MEA の電極や絶縁パターンを形成するために必要なフォトマスクの作製、そして、それらを用いて ITO 基板から MEA を作製する方法について述べる。

5.2.1.1.1 パターン設計

青斑核と海馬を培養する区画に対応させた独自の電極パターン (図 5.3) と、神経細胞の活動を計測する電極部分以外を絶縁するためのパターン (図 5.4) を設計した。各区画に対して、横 4 個×縦 8 個、計 32 個の電極を配置した。各区画における隣接する電極間距離はそれぞれ 400 μm で、電極自体は 一辺 50 μm の正方形とし、2 つの区画間は 750 μm 離れた。

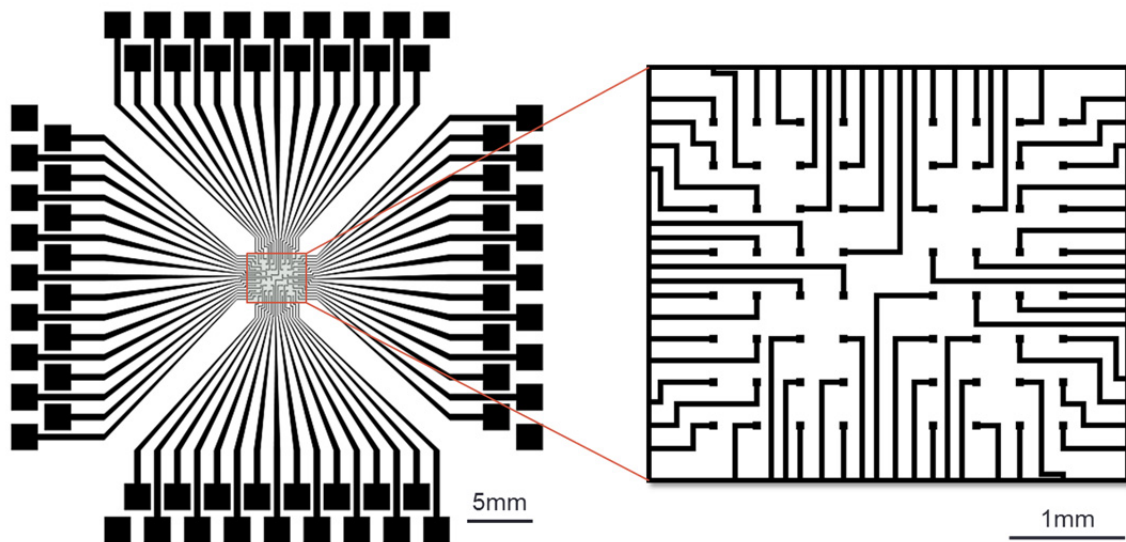


図 5.3 MEA 電極パターン

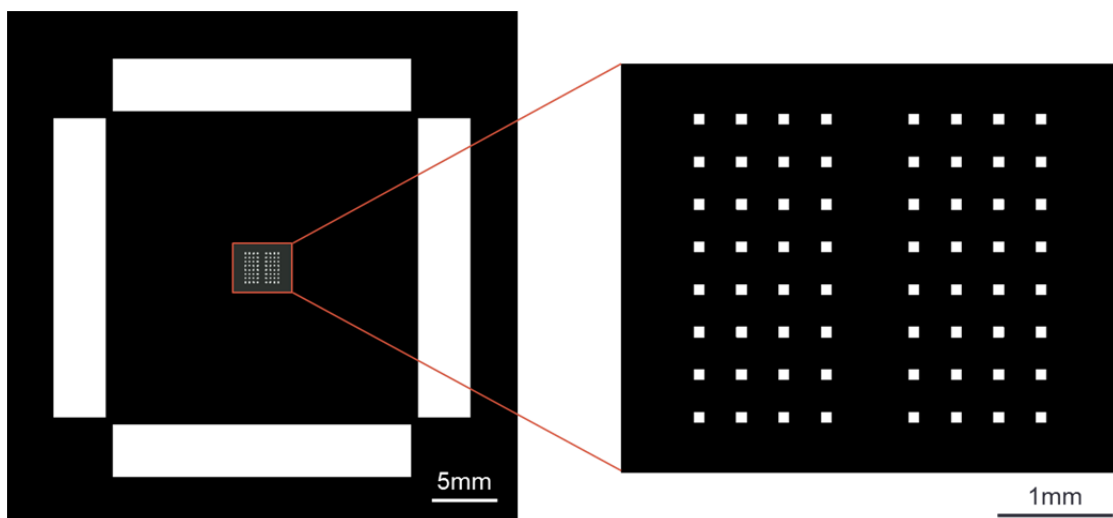


図 5.4 MEA 絶縁パターン

5.2.1.1.2 フォトマスク作製

5.2.1.1.1 で設計したパターンが転写されたフォトマスクを作製した (図 5.5)。具体的な手順について述べる。

まず、熱転写型プリンタ MD-5500 (アルプス電気社) を用いて 5.2.1.1.1 で設計したパターンを OHP (overhead projector) シート上に印刷した。次に、簡易マスク作製機 NM-505 (ナノテック社) にパターンを印刷した OHP シートを設置し、暗室内で、0.2 倍の縮尺で、エマルジョンマスク (コニカミノルタ社) 上にパターンを 2 秒間投影露光した (図 5.5)。最後に、エマルジョンマスクを現像するため、現像液 CDH-100 (コニカミノルタ社) に 3 分浸した後、定着液 CFL-881 (コニカミノルタ社) に 3 分間浸し、温水で洗浄した。

以上の工程を経て、フォトマスクを作製した。

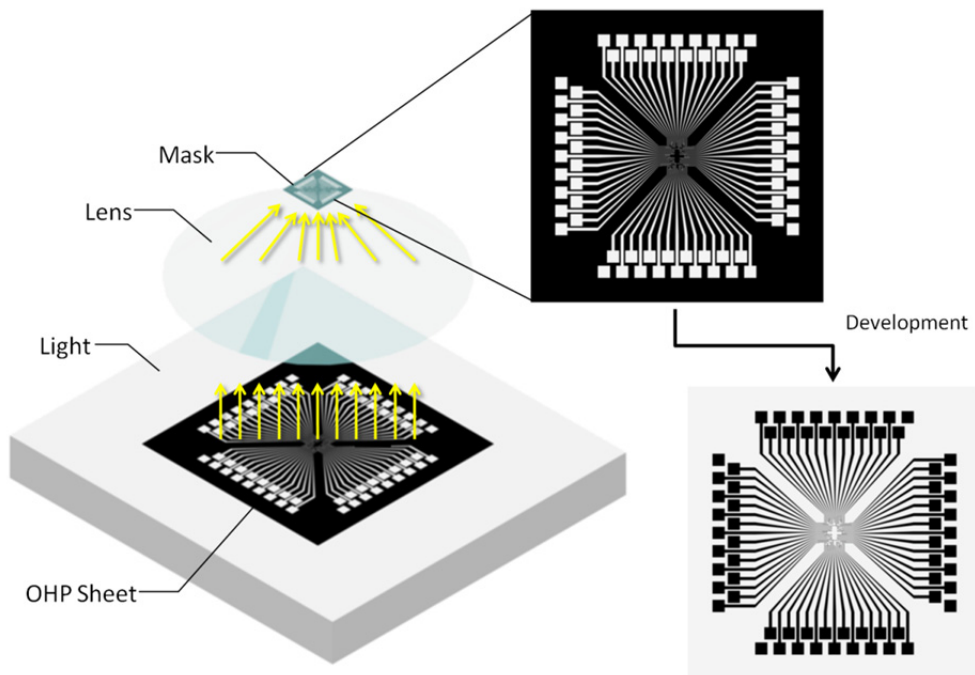


図 5.5 フォトマスク作製

5.2.1.1.3 MEA 作製

フォトリソグラフィを用いた MEA の作製方法について具体的な手順を以下に示す。

フォトレジストの接着を向上させるため、ITO 基板（三容真空社）の洗浄を行った。洗浄は、まず中性洗剤を薄めた洗浄用液を用いて超音波洗浄を 30 分間行い、水道水で 5 分間の超音波洗浄を 1 セットとして、それを 3 セット行った。そして、ソフトエッチングとして、水酸化ナトリウム水溶液（1mol/l）に 90 分以上浸した。その後、純水で 5 分間の超音波洗浄を 1 セットとして、3 セット行った。最後に、スピンドライによってガラス基板に付着した水分を取り除いた後、140℃に設定したホットプレート上で 5 分間加熱した。

次に、ITO 基板をエッチングするため、フォトレジスト OFPR-800LB 23Cp（東京応化工業社）を ITO に塗布した（図 5.2 (f)）。塗布には、ITO 基板に 2ml の OFPR をスピンコート（4500 rpm, 20 sec）し、110℃に設定したホットプレート上で 90 秒間加熱した。

ITO 基板に対して OFPR の電極パターンを形成させるため、ITO 基板を室温に冷まし、マスクアライナ MA-10 (Mikasa 社) に電極パターンが転写されたマスクをセットし、5 秒間露光した。OFPR 現像液 NMD-3（東京応化工業社）に浸し、60 秒間静置した後、30 秒間攪拌することで OFPR の現像を行った（図 5.2 (g)）。超純水内で ITO 基板を 30 秒間攪拌する過程を 2 回繰り返す、基板表面に残った現像液を洗い流した。スピンドライによってガラス基板に付着した水分を取り除いた後、140℃に設定したホットプレート上で 5 分間加熱した。

ITO 基板への電極パターンの形成は、室温まで自然冷却した ITO 基板をエッチャント（45ml HCl-12M）に入れ 3 分間静置させることで行った（図 5.2 (h)）。そして、ITO 基板を超純水で洗浄し、さらにアセトン（和光純薬工業社）で 1 分間洗浄した。

次に、絶縁のための OFPR 層を形成させるため、室温まで冷ました ITO 基板に OFPR を再度スピンコートし、110℃に設定したホットプレート上で 90 秒間加熱した（図 5.2 (i)）。そして、ITO 基板を室温に冷まし、絶縁パターンが転写されたマスクをマスクアライナにセットし、10 秒間露光した。その後、ITO 基板を現像液に入れ、60 秒間静置した後、30 秒間攪拌して絶縁パターンを形成させた（図 5.2 (j)）。そして、超純水に浸し、30 秒間攪拌する過程を 2 回繰り返す、現像液を洗い流した。ITO 基板を完全に乾燥させ、140℃に設定したホットプレート上で 5 分間加熱した。

MEA に対してガラスリングを付けるため、シリコーン（信越シリコーン社）を接着剤として ITO 基板上にガラスリングを接着させ、80℃に設定したホットプレート上で 90 分間加熱し、シリコーンを硬化させた（図 5.2 (k)）.

最後に、電極の界面インピーダンスを下げることを目的として、リング内に白金黒溶液を入れ、電圧を印加することによって電極表面に白金黒を析出させた.

5.2.1.2 PDMS 構造物 作製

フォトリソグラフィ、ソフトリソグラフィを用いて、2 つの培養区画を保持し、間に微小な連絡通路を保持した PDMS 構造物を作製した。本目では、構造物のパターン設計、構造物作製のための鋳型作製に必要なフォトマスク作製、フォトリソグラフィを用いた鋳型作製、ソフトリソグラフィを用いた PDMS 構造物作製の方法について述べる。

5.2.1.2.1 パターン設計

2 つの培養区画の大きさが、それぞれ横幅 5mm、縦幅 7mm、高さ 100 μm となるよう、通路部分は、トンネル横幅 500 μm 、トンネル縦幅 50 μm 、トンネル高さ 5 μm 、トンネル間隔 200 μm となるように設計した (図 5.1)。

5.2.1.2.2 フォトマスク作製

細胞体が通路に侵入することを阻止するため、通路部分の高さを培養区画部分の高さよりも小さくした。そのため、鋳型作製において、まず 5 μm の高さで通路部分を作製し、その後 100 μm の高さの培養区画部分を作製する必要がある、それに応じて 2 つのフォトマスクを作製した。1 つは、横幅 750 μm 、縦幅 50 μm の長方形を間隔 200 μm で 30 個縦に連続して配置したもので、もう 1 つは、横幅 3mm、縦幅 4mm の長方形を 2 つ、500 μm の間隔で横に配置したマスクである。それら 2 つのフォトマスクを 5.2.1.1.2 と同様の方法を用いて、作製した。

5.2.1.2.3 鋳型作製

作製したフォトマスクを用い、フォトレジスト層をパターンニングすることで鋳型を作製した。具体的な手順 (図 5.2 (a-b)) を以下に示す。

まず、レジストの接着を向上させるため、シリコンウェハの洗浄を行った。中性洗剤を薄めた洗浄用液を用いて超音波洗浄を 30 分間行い、水道水で 5 分間の超音波洗浄を 1 セットとして、それを 3 セット行った。そして、水酸化ナトリウム水溶液 (1mol/l) に 90 分以上浸した後、純水で 5 分間の超音波洗浄を 1 セットとして、それを 3 セット行い、150°C のホットプレート上に 2 時間静置し、乾熱処理した。

次に、通路部分の構造を作製するため、シリコンウェハに対してフォトレジストを塗布した。ネガ型フォトレジストである SU-8 3005 (日本化薬社) をシリコンウェハ

に塗布し、30 秒間 4500 rpm でスピニングし、プリベイクとして 90 °C のホットプレート上で 150 秒間静置させた。そして、通路部分のパターンを保持したフォトマスクとマスクアライナを用いて、シリコンウェハに対して露光し、SU-8 構造物を現像するため、SU-8 Developer（日本化薬社）に 90 秒間浸し、アセトンに 1 分間浸した。その後、SU-8 構造物のシリコンウェハ上への接着、固定の強化を図るため、シリコンウェハを 150°C のホットプレート上に 40 分間静置した。

続いて、培養区画部分の構造を作製するため、通路部分の構造物を保持したシリコンウェハに対して SU-8 3050（日本化薬社）を塗布し、30 秒間 700 rpm でスピニングし、プリベイクとして 90 °C のホットプレート上で 45 分間静置させた。そして、培養区画部分のパターンを保持したフォトマスクとマスクアライナを用いて、シリコンウェハに対して露光し、現像のため、SU-8 Developer に 900 秒間浸し、アセトンに 1 分間浸した。その後、ハードベイクとして、シリコンウェハを 150°C のホットプレート上に 40 分間静置した。

5.2.1.2.4 PDMS 構造物作製

作製した鋳型を用いて、PDMS 構造物を作製した。具体的な手順（図 5.2 (c-d)）を以下に示す。

主剤と硬化剤と 10:1 の割合で混合した PDMS (Silpot 184; 東レダウコーニング社) を鋳型上へ流し込み、鋳型を 85°C のホットプレート上に 1 時間静置することで、PDMS を硬化させた（図 5.2 (c)）。そして、硬化した PDMS 構造物をメスで切り取り、横幅 2.5mm、縦幅 4mm の穴あけパンチを用いて、通路付近に細胞播種のための空間を形成させた（図 5.2 (d)）。

5.2.1.3 デバイス作製

作製した MEA 上に、作製した PDMS 構造物を顕微鏡下で位置合わせし、静置させ、デバイスを作製した（図 5.2 (l)）。

5.2.2 細胞培養

作製したデバイスを用いて、各区画に青斑核と海馬を培養し、共培養を行った（図 5.6）。以後、この共培養系を LC + HP と略記する。また、海馬に対する青斑核の影響を評価するため、同様の設計のデバイスを用いて、青斑核は培養せず、1つの区画に海馬のみを培養した。以後、この培養系を HP と略記する。

青斑核と海馬の摘出方法は、それぞれ 4.2.2.1 と 4.2.2.2 に記述したものと同様のものである。培地に関しては、4.2.2.1 に記述した、青斑核の単独培養で用いた培地を用いた。

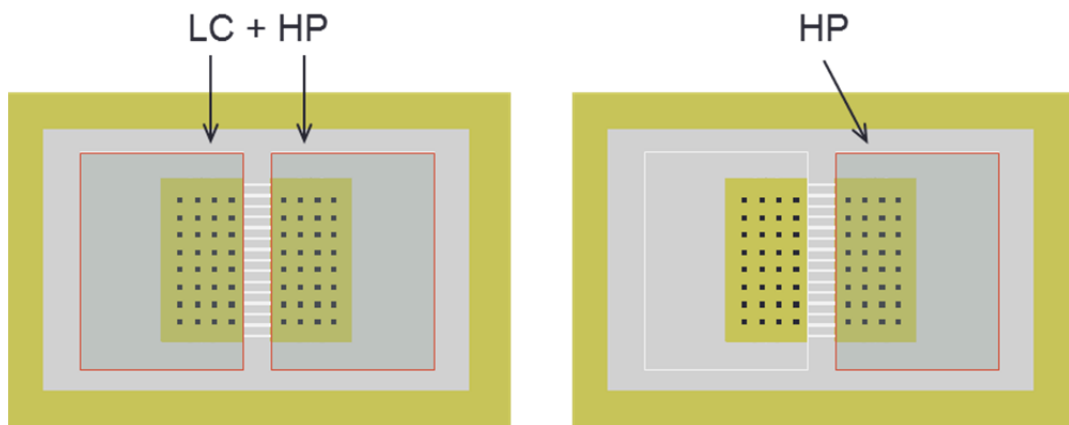


図 5.6 細胞培養

5.2.3 細胞外電位計測

2.2.2 と同様の方法で細胞外電位計測を行った。

5.2.4 実験プロトコル

青斑核と海馬の共培養系，海馬の単独培養系を，それぞれ 5 試料，1 試料，21～46 日間培養し，それぞれ細胞外電位計測を 10 分間ずつ行った．以後，共培養系は LC + HP (co)，共培養系における青斑核，海馬はそれぞれ LC (co)，HP (co)，単独培養系における海馬は HP (mono) と略記する．

5.2.5 スパイク解析

2.2.4.1 と同様の方法で，スパイク検出を行い，平均発火率を算出し，ラスタプロットを作成した．そして，LC+HP (co), HP (mono) のスパイク数を算出した．

5.2.6 ネットワークバースト解析

海馬側のスパイクデータのみを用いて，3.2.7 と同様の方法で，ネットワークバースト検出を行い，共培養系 5 試料，海馬単独培養系 1 試料におけるネットワークバースト特徴量の比較を行った．

5.2.7 結合解析

5.2.7.1 相対スパイク時刻解析

青斑核から海馬，海馬から青斑核への結合の概観を調べるため，2 電極間の相対的なスパイク時刻に関するヒストグラムを作成した（図 5.7）．以下，詳細について説明する．

ある電極 a, b 間の相対的なスパイク時刻 t_{ab}^r は，電極 a を基準として，電極 a, b におけるスパイク数とスパイク時刻をそれぞれ N_a , N_b と s_a^i, s_b^j ($i = 1, \dots, N_a, j = 1, \dots, N_b$) とし，以下のように算出した．

$$t_{ab}^r(i, j) = s_b^j - s_a^i \quad (8)$$

つまり，基準電極で検出されたスパイク時刻を基準として，比較したい電極で検出されたスパイク時刻の時間差を算出した．

そして，全スパイクデータを用いて，相対スパイク時刻を算出し，基準となるスパイク時刻に対して -100 ms から 100ms の間にあるスパイクのみを用いて，10 ms 幅でヒストグラムを作成した．さらに，青斑核から海馬，海馬から青斑核への方向移動エントロピーと 2 つのグループに分けて，それらグループ内での全ヒストグラムの平均ヒストグラムを作成した．青斑核から海馬への方向，海馬から青斑核への方向をそれぞれ LC to HP, HP to LC と略記する．

作成したヒストグラムが，例えば 0 よりも小さいところにピークを持つものである場合，電極 a のスパイクは電極 b のスパイクの後に発生することが多いことを意味する，といったように結合の概観を知ることが可能となる．

5.2.7.2 移動エントロピー解析

5.2.7.2.1 移動エントロピー算出

青斑核から海馬，海馬から青斑核への結合強度を推定するため，青斑核と海馬の両培養区画間の電極の組み合わせ全てに対して，4.2.8.1 と同様の方法で移動エントロピーを算出した．

5.2.7.2.2 パラメータ感度分析

本実験系におけるパラメータ値を決定するため，両培養区画間の電極の組み合わせ

全てに対して、4.2.8.2 と同様の方法を用いて、結果に対するパラメータの依存性を評価した。

5.2.7.2.3 ランダムスパイクデータとの比較

算出された移動エントロピーの評価を行うため、4.2.8.3 と同様の方法を用いて、スパイクデータからそれぞれランダムスパイクデータを生成し、それらのランダムスパイクデータから移動エントロピーを算出した。青斑核から海馬、海馬から青斑核への方向移動エントロピーと 2 つのグループ (LC to HP, HP to LC) に分けて、ランダムスパイクデータから算出された移動エントロピーと元のスパイクデータから算出された移動エントロピーをそれぞれ比較した。それらの比較は Wilcoxon rank sum test を用いて行った。

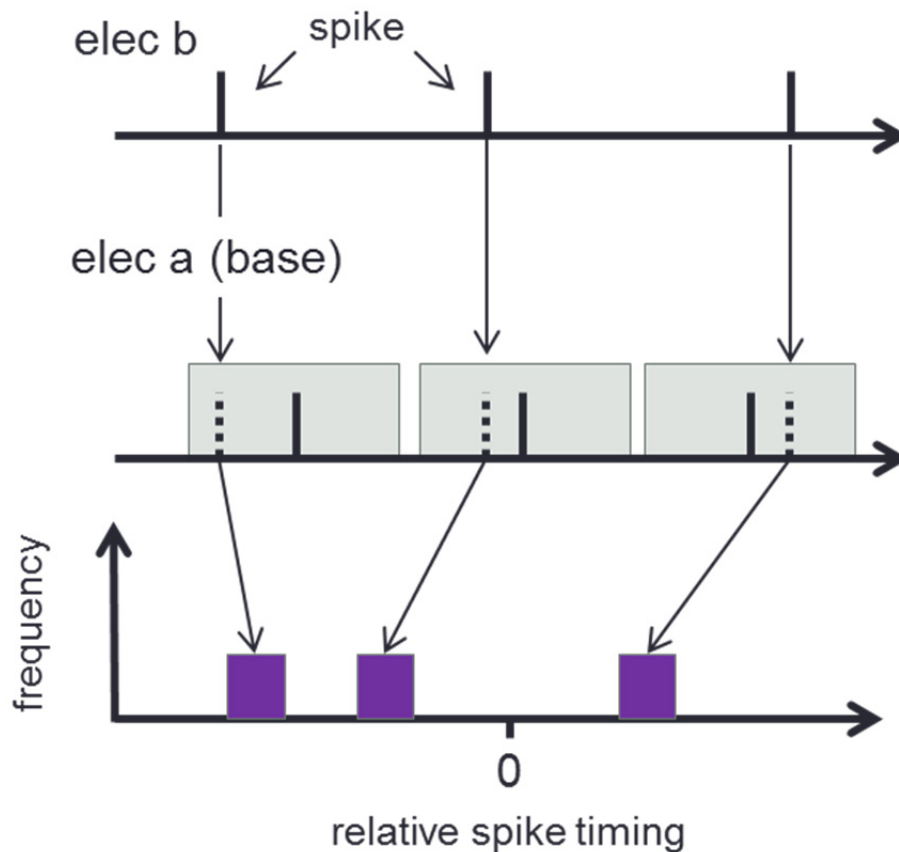


図 5.7 相対スパイク時刻ヒストグラムの作成

5.3 結果

5.3.1 細胞培養

図 5.8 に作製したデバイスの概観を示す。また、図 5.9 に培養 35 日目の青斑核と海馬の共培養デバイス中央の位相差画像を示す。左側の区画が青斑核，右側の区画が海馬であり，両区画で細胞が培養され，微小通路に神経突起を伸長していることが確認できる。

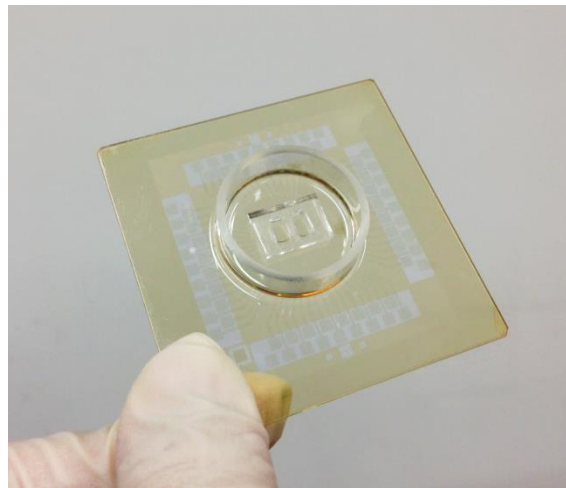


図 5.8 作製したデバイス

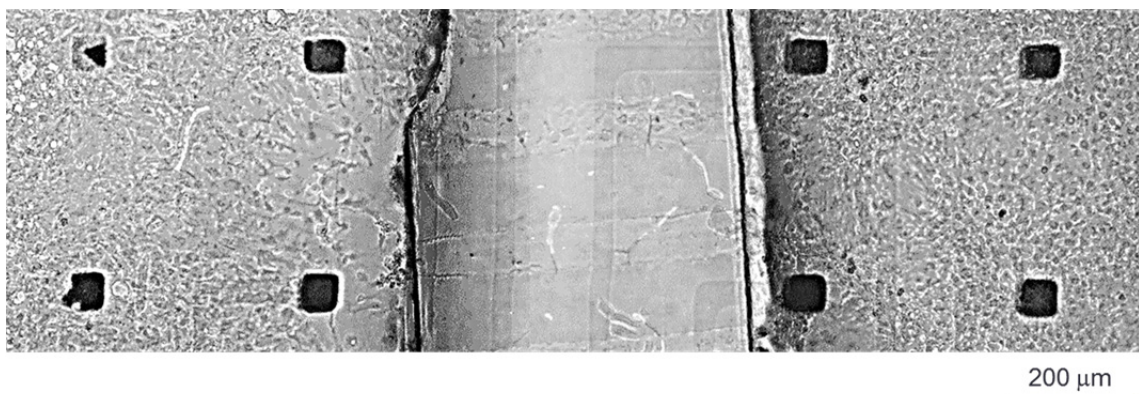


図 5.9 位相差画像

5.3.2 スパイク解析

5.3.2.1 ラスタープロット

LC + HP (co), HP (mono) の活動の概観を把握するため、平均発火率とラスタープロットを作成した。図 5.10 (a), (b), (c) はそれぞれ LC (co), HP (co), HP (mono) の代表的な試料における平均発火率の全有効電極平均 (AFR) を示す。縦軸は平均発火率、横軸は時間を示している。図 5.11 (a), (b) はそれぞれ LC + HP (co), HP (mono) の代表的な試料のラスタープロット、(c), (d) はそれぞれ (a), (b) の一部を拡大したラスタープロットを示している。縦軸は電極番号、横軸は時間、黒い点はスパイクを示している。(a), (b), (d), (e) の図の中央に引かれている黒線は、培養区画の区切りを示しており、黒線より上は青斑核、黒線より下は海馬側の区画における電極であることを表している。

平均発火率において、LC (co), HP (co), HP (mono) は 600 秒の間に発火率のピークをそれぞれおよそ 2 つ, 1 つ, 5 つ示していた。また、HP (mono) に比べて、HP (co) の活動のベースラインは低くなっていることが確認された。

ラスタープロットにおいて、青斑核と海馬の共培養の 2 試料は、海馬単独培養の試料よりも海馬の活動が抑制されていることが確認できた。そして、どの試料においても、時間の長短、参加電極数の差異はあるものの、ネットワークバーストが確認された。

5.3.2.2 スパイク数比較

共培養系と単独培養系における各区画の総スパイク数を算出した(図 5.12)。図 5.12 に、それぞれ LC (co), HP (co), HP (mono) の試料におけるスパイク数の平均値と標準偏差を示す。横軸は区画、縦軸はスパイク数を表している。ラスタープロットでの定性的な評価と矛盾せず、HP (mono) より HP (co) のスパイク数は有意に低かった。また、LC (co) のスパイク数は HP (co) より有意に多かった。

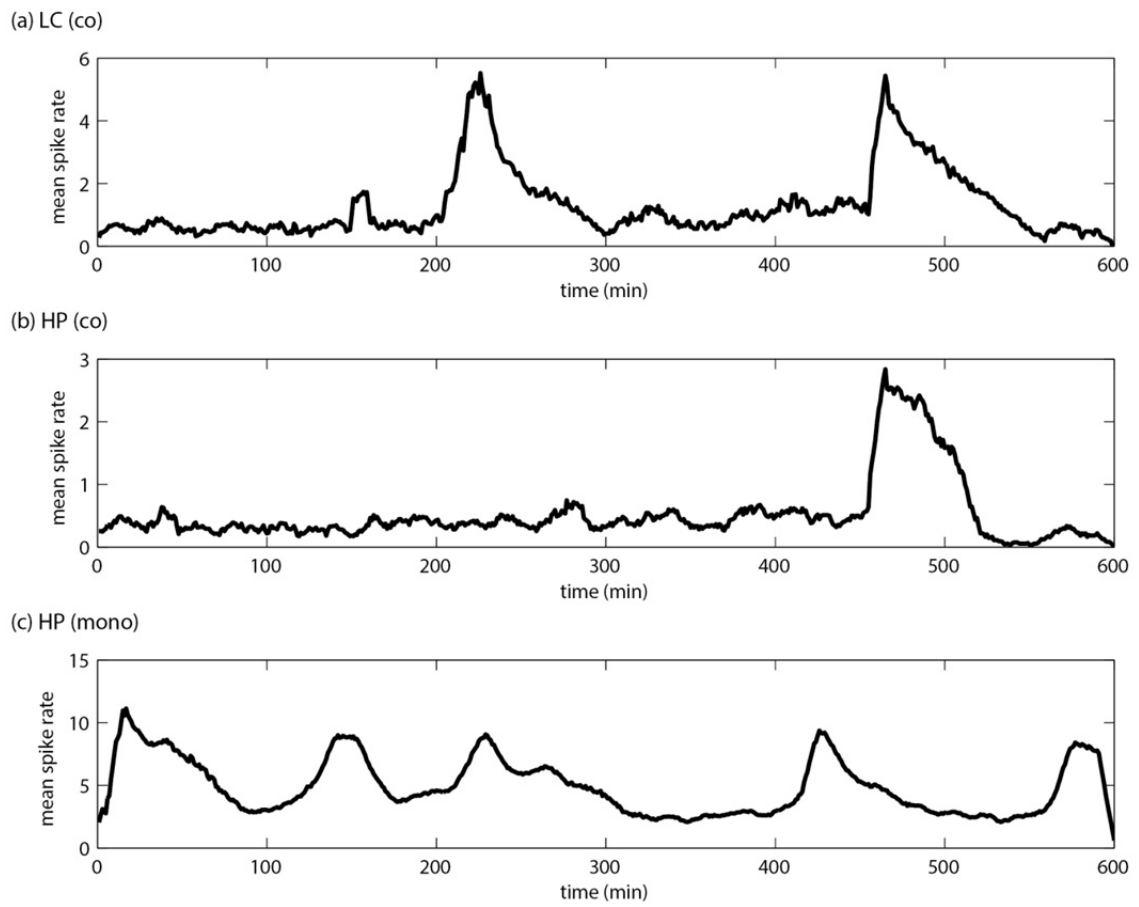


図 5.10 平均発火率

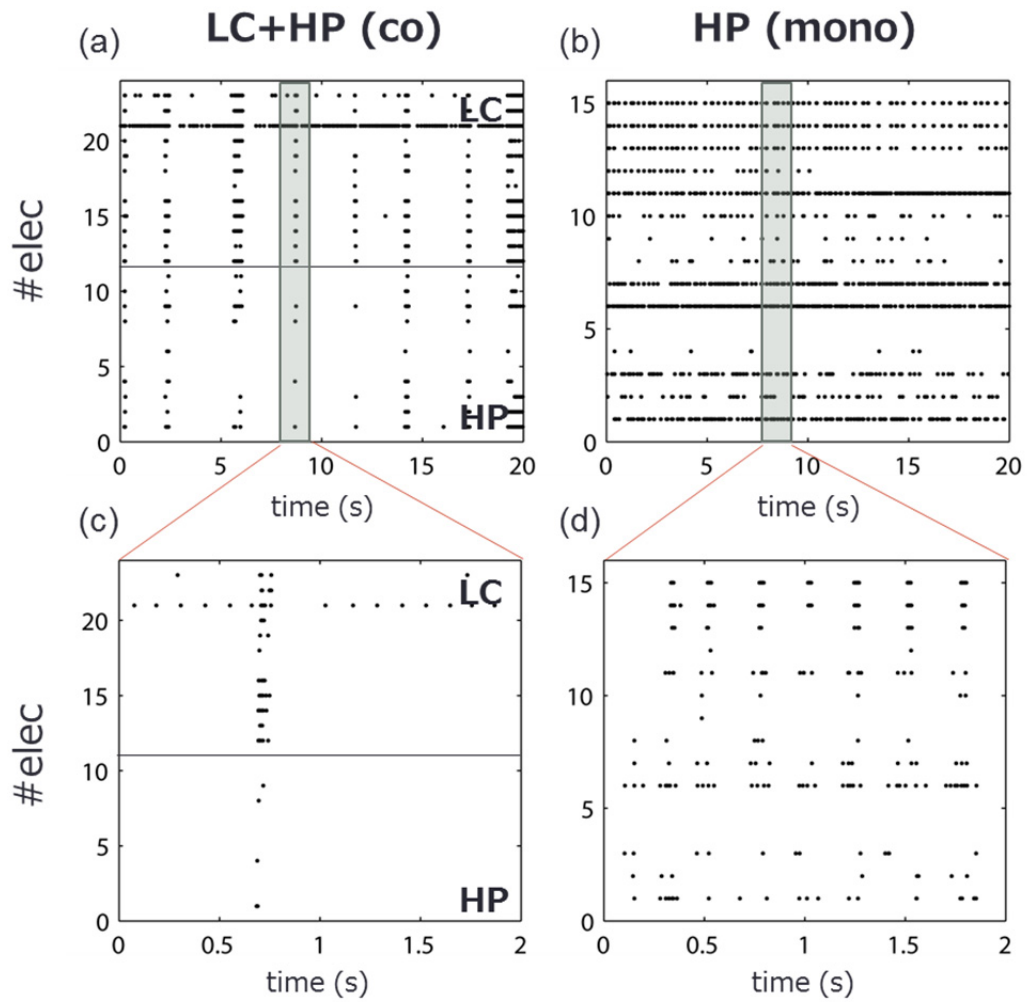


図 5.11 ラスタープロット

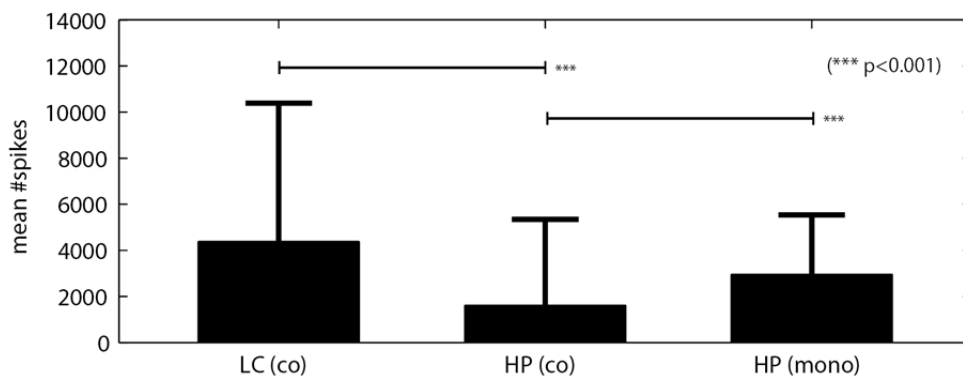


図 5.12 スパイク数

5.3.3 ネットワークバースト解析

ネットワークバースト活動を検出し、バースト数、バースト時間、バースト内スパイク数、バースト参加電極数、バースト間隔、バースト率に着目し、各状態間比較を行った。その結果を図 5.13 に示す。横軸は各区画を表し、縦軸は (a) はバースト数、(b) はバースト時間、(c) はバースト内スパイク数、(d) はバースト参加電極数、(e) はバースト間隔、(f) はバースト率の試料平均を表している。

バースト数、バースト率は HP (mono) に比べて HP (co) が低かった。バースト時間、バースト内スパイク数、バースト参加電極数に関しては、HP (co) の方が HP (mono) に比べて有意に小さかった。バースト間隔に関しては、HP (co) の方が HP (mono) に比べて有意に大きかった。

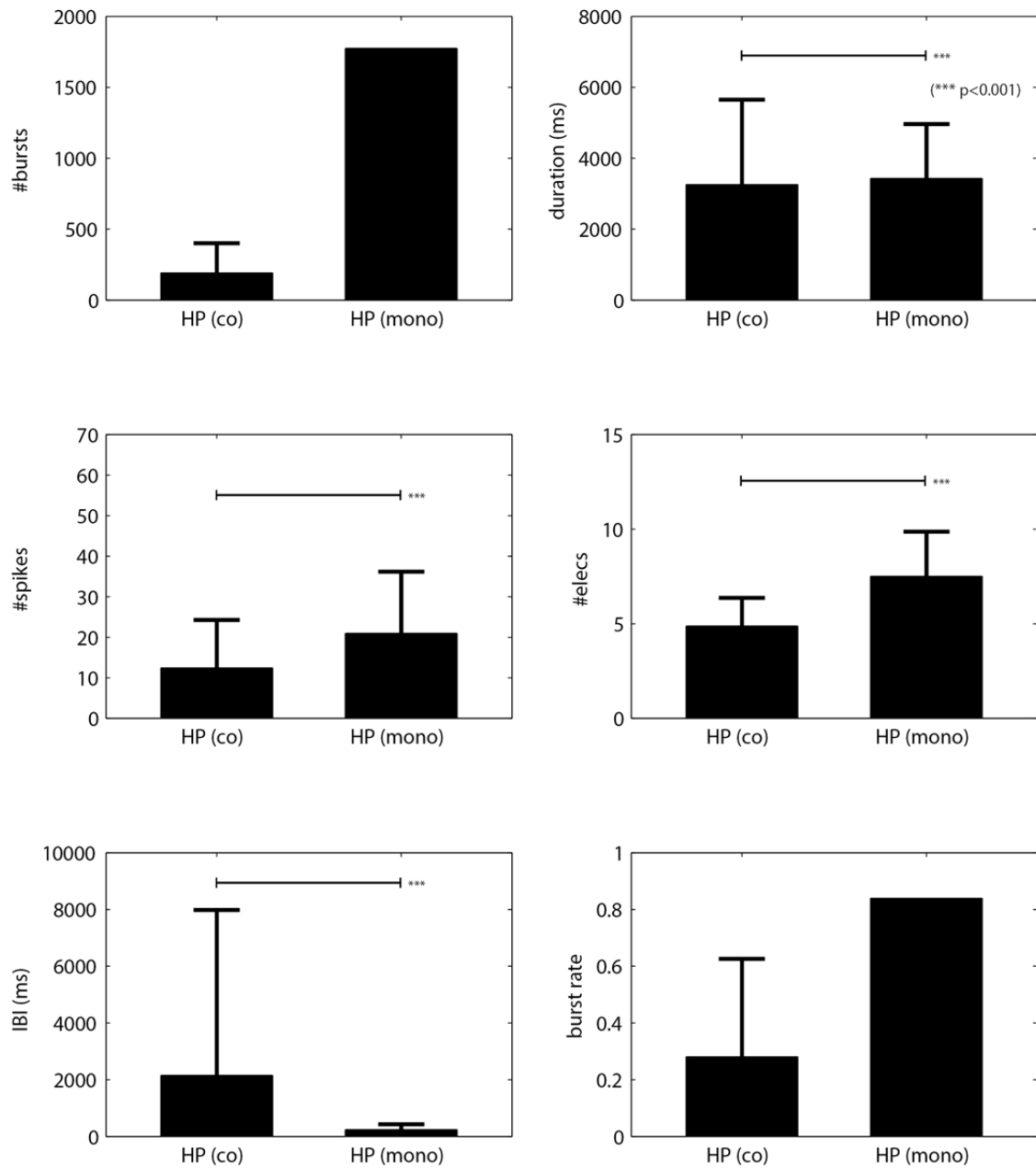


図 5.13 ネットワークバースト

5.3.4 結合解析

5.3.4.1 相対スパイク時刻解析

相対スパイク時刻を算出し、そのヒストグラムを作成した。図 5.14 (a), (b) には、それぞれ LC to HP, LC to HP の全ヒストグラム (N=642) の平均相対スパイク時刻ヒストグラムを示した。横軸は相対スパイク時刻、縦軸は平均度数を表している。LC to HP のヒストグラムでは、およそ -10 ms の時刻にピークが形成されていた。また、HP to LC のヒストグラムでは、およそ 10 ms の時刻にピークが形成されていた。

5.3.4.2 移動エントロピー解析

5.3.4.2.1 パラメータ感度分析

基本パラメータ値をもとに、 k のみを 1 から 1 おきに 5 まで変化させた時、 l のみを 1 から 1 おきに 5 まで変化させた時、 D のみを 1, 5, 10, 20, 30, 50, 100, 200 と変化させた時の各部位における移動エントロピーの全組み合わせ (N=642) を用いた平均値をそれぞれ図 5.15 (a), (b), (c) に示す。

D の値が小さい場合、結合を考慮する範囲が小さくなるため、移動エントロピーは小さくなると考えられる。実際、LC to HP, LC to HP のどちらにおいても、 D が 10 ms 以下になると移動エントロピーが減少しており、本実験系においては D に関しては 10ms より大きい値が適切であると考えられる。また、いずれの値でも各部位の移動エントロピーの相対的な大小関係は変わらなかった。これらの結果と考察、Ito らの先行研究 (Ito et al. 2011) をふまえて、本解析では、 k , l , D として、それぞれ 2, 3, 30 を用いることとした。

5.3.4.2.2 ランダムデータとの比較

全スパイクデータから生成されたランダムスパイクデータをもとに算出された、LC to HP, HP to LC の両グループにおける移動エントロピーの平均値と標準偏差を図 4.13 に示す。両グループにおいて、ランダムスパイクデータから算出された移動エントロピーは元のスパイクデータから算出された移動エントロピーに対して有意に低かった。

5.3.4.2.3 各部位の移動エントロピー比較

5.3.4.2.1 の結果をもとに設定したパラメータを用いて算出した、LC to HP, HP to

LC における全組み合わせにおける移動エントロピーの平均値と標準偏差を、それぞれ片対数グラフとして図 4.14 に示す。LC to HP の移動エントロピーは HP to LC の移動エントロピーに比べて有意に小さかった。

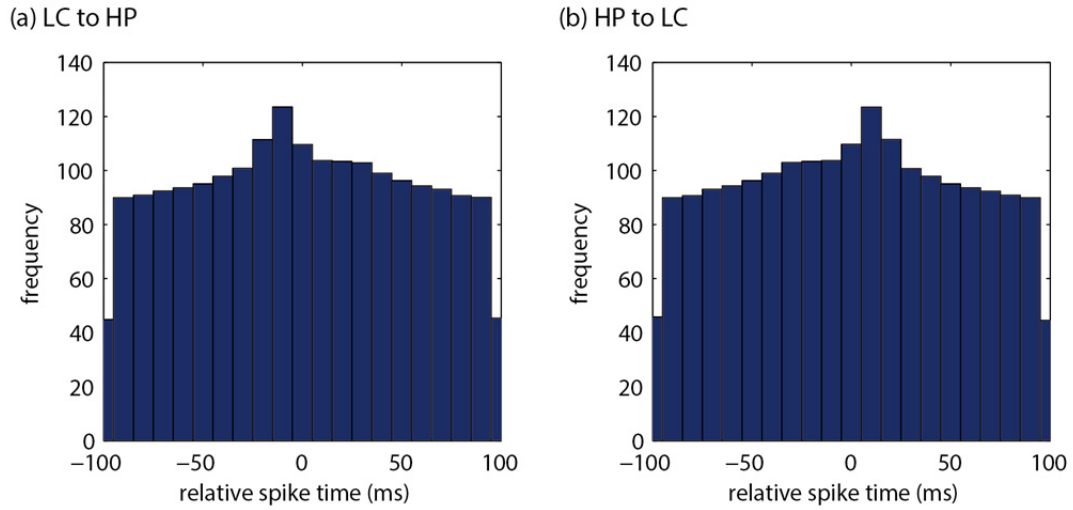


図 5.14 相対スパイク時刻ヒストグラム

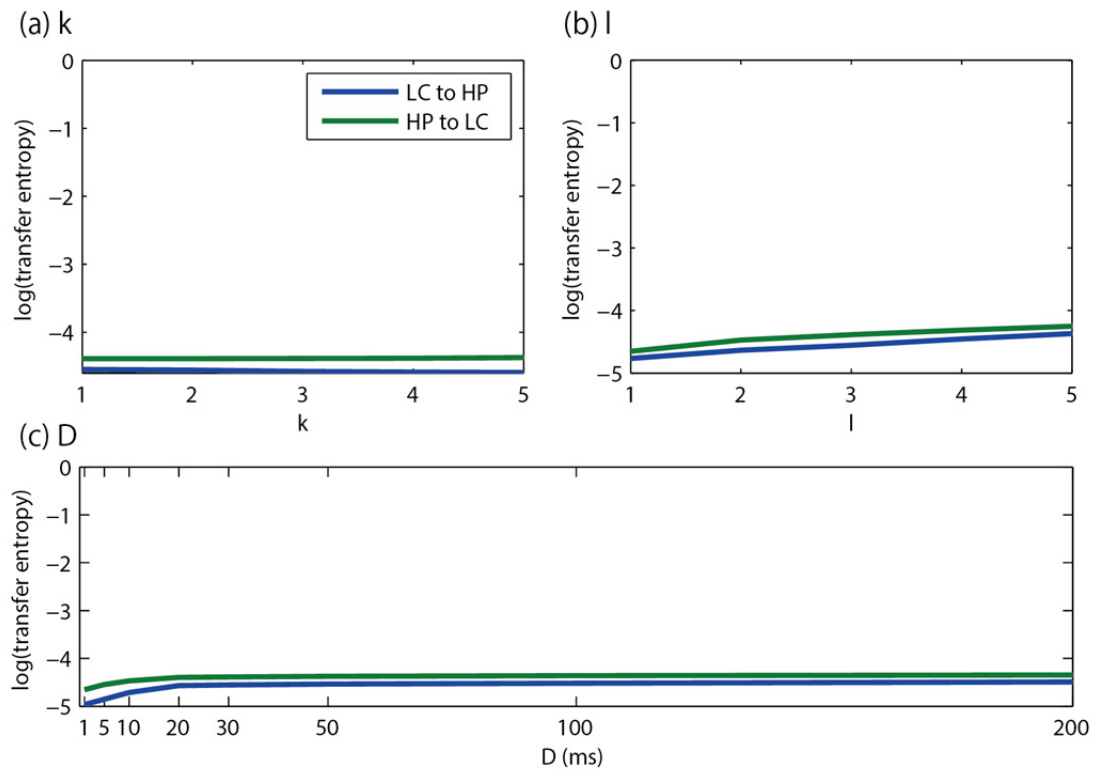


図 5.15 移動エントロピー パラメータ感度分析

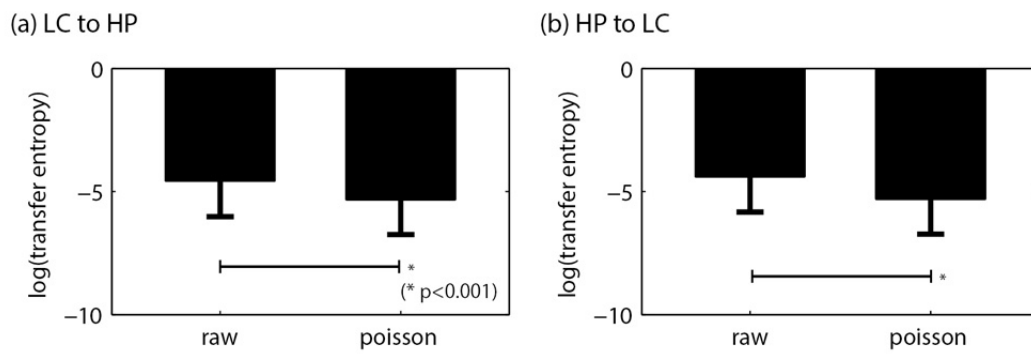


図 5.16 移動エントロピー ランダムスパイクデータ

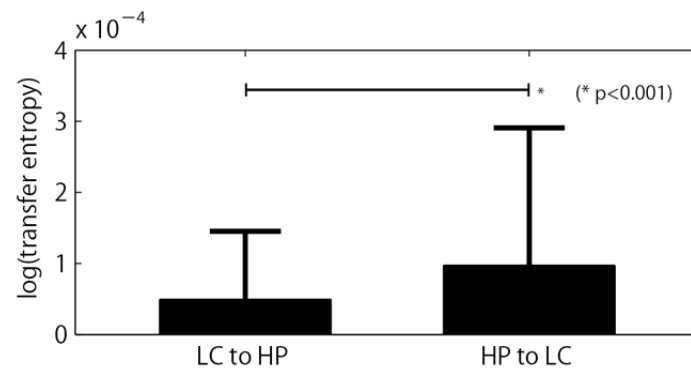


図 5.17 移動エントロピー

5.4 考察

5.4.1 青斑核-海馬の短期的作用

LC to HP の平均相対スパイク時刻ヒストグラムはおよそ -10ms の時刻にピークを形成しており、逆に HP to LC の平均相対スパイク時刻ヒストグラムはおよそ -10ms の時刻にピークを形成していた。これは、HP (co) の活動が LC (co) の活動よりも先行することが多いことを示している。また、LC to HP の移動エントロピーと、HP to LC の移動エントロピーをグループ化し、値を比較したところ、後者の方が有意に大きかった。これらの結果から、海馬から青斑核への結合が強いこと、ミリ秒オーダーの短期的な作用が存在することが示された。海馬から青斑核への結合については、海馬が主にグルタミン酸作動性神経細胞で構成されることから、海馬側から青斑核側への興奮性結合が存在して結合強度としてあらわれたと考えられる。その寄与は、海馬側にのみ電位依存性ナトリウムイオンチャネル阻害剤であるテトロドトキシン (TTX) を添加することによって、検証可能である。

平均相対スパイク時刻ヒストグラムにおいてピークを形成している部分以外は顕著な変化がなかったことから、青斑核から海馬への結合は疎であること、ミリ秒オーダーの短期的な作用が存在しないこと、もしくは極めて小さいことが示唆された。また、青斑核には GABA 作動性神経細胞も存在すること (Iijima et al. 1988) が知られているが、その短期的作用は大きくないということが示唆された。

5.4.2 青斑核-海馬の長期的作用

平均発火率の結果から HP (co) の活動のベースラインは HP (mono) のものよりも低かった。また、平均発火率のピーク数は HP (co), HP (mono) がそれぞれおよそ 1 つ, 5 つであった。周期に変換すると、HP (mono) に関してはおよそ 100 秒の周期活動を示していた。また、HP (co) に関してはより長い時間の計測が必要であるが、周期的に活動していたとしても 600 秒以上の周期活動だと考えられる。ここで、第 2 章における海馬由来培養神経回路網に対する NE 添加実験においては、およそ 200 秒の周期活動の強調は確認されたが、600 秒以上の周期を持つ活動は確認されなかった。また、第 3 章における培養 2 週間の海馬由来培養神経回路網に対する NE 添加実験においては、添加後に活動の周期が不安定になり、600 秒以上確認されない時間

帯が存在していた。これらの結果から、共培養系では、発達過程において青斑核由来神経回路から放出される NE が海馬由来神経回路に対して長期的に作用し、活動の周期が不安定になる効果が持続している可能性が考えられる。それを検証するためには、計測時間を長くして HP (co) における平均発火率の変化を確認すること、HP (co) にアドレナリン受容体アンタゴニストを添加して経時的に神経回路の発達過程における活動を評価すること、海馬由来神経細胞を活動が安定する 4 週間ほど培養した後に青斑核を共培養して活動を評価することが有用であると考えられる。

共培養系における海馬のスパイク数、ネットワークバースト数は、単独培養系に比べて少なかった。また、バースト時間、バースト参加電極数も単独培養系に比べて低く、バースト率の平均値も、本実験における海馬の単独培養系と第 2 章や第 3 章における海馬の単独培養系が 1 に近い値を示すのに対して、0.3 と低かった。さらに、第 4 章に記述した青斑核の単独培養系と海馬の単独培養系におけるスパイク数には顕著な差は見られなかったが、共培養系における青斑核の活動は共培養系の海馬より活発であった。これらの共培養デバイスを用いた海馬の単独培養系の結果に加え、第 2～4 章における海馬や青斑核の単独培養系の結果を総合的にふまえると、共培養系の海馬は単独培養系の海馬に比べて活動が抑制されていることが示唆された。

この活動抑制効果については青斑核の NE 作動性神経細胞の関与が考えられる。第 2 章や第 3 章で示されたように、NE は海馬の培養神経回路網に対して抑制効果を示すことから、共培養系における青斑核の活動によって海馬に対して NE が放出され、当該効果が現れたと考えられる。NE の効果であるかを検証するためには、アドレナリン受容体のブロッカーを添加する実験が有用であると考えられる。また、青斑核は NE に加えて、共存伝達物質として神経ペプチドを放出することから (Olpe and Steinmann 1991)、当該効果に関しては神経ペプチドの関与も否定できない。そこで、ペプチドが作用する受容体に対するアンタゴニストを用いる実験も有用であると考えられる。

そして、活動抑制効果は、5.4.1 の考察と NE の効果が現れるまで少なくとも数分かかるといった第 2 章や第 3 章の結果から、ミリ秒オーダーの短期的な作用ではなく、それよりも大きい分、時、日オーダーの長期的な作用であると考えられる。長期的な作用は、青斑核-海馬共培養系にアドレナリン受容体やペプチドが作用する受容体のアンタゴニストを長期間添加する実験を行うことで検証可能であると考えられる。

5.4.3 青斑核の同期活動

第4章に記述したとおり青斑核の単独培養系では活動は非同期的であったのに対して、ラスタープロットから確認されるように共培養系では青斑核は同期的な活動を示していた。ランダムスパイクデータから算出された移動エントロピーに対して、元のスパイクデータから算出した移動エントロピーが有意に高かったのは、その同期活動が要因として考えられる。青斑核は主に NE 作動性神経細胞で構成されることをふまえると、同期活動は海馬の興奮性結合に起因するものと考えられる。その検証としては、海馬側に TTX を添加すること、海馬から青斑核への結合を抑える PDMS 構造物を用いることが考えられる。後者については、矢尻を模した構造物を用いることによって結合の方向を制御することが可能であること (Feinerman, Rotem, and Moses 2008; Peyrin et al. 2011) から、PDMS 構造物における微小通路部分を直線ではなく、矢尻の形状とすることで実現可能であると考えられる。

5.5 結論

MEA を用いた青斑核と海馬の共培養系の確立とそのダイナミクス評価を目的に、独自に設計し作製した MEA と PDMS 構造物を組み合わせた、2 つの培養区画と区画間をつなぐ微小通路を有するデバイスを作製し、そのデバイスを用いて、青斑核と海馬を共培養し、そのダイナミクスを、海馬のみを培養した試料のダイナミクスと比較することで評価した。

共培養系における両培養区画の結合を評価するための相対スパイク時刻、移動エントロピーに関する解析結果より、海馬から青斑核へのミリ秒オーダーの機能的結合を有していることが示された。また、共培養系における海馬のスパイク数、ネットワークバースト数は、海馬の単独培養系における両指標に比べて、小さく、活動が抑制されていることが確認された。その抑制効果には NE が寄与していることが示唆された。

以上の結果より、青斑核と海馬の共培養系が確立できたと考えられ、これまで不明であったネットワークレベルでの青斑核と海馬のダイナミクスと相互作用が明らかとなった。

第6章 結論と今後の展望

6.1 結論	132
6.2 今後の展望	135
6.2.1 青斑核の神経修飾作用メカニズム解明への貢献	135
6.2.2 迷走神経刺激作用メカニズムの解明への貢献	135

6.1 結論

覚醒，注意，記憶といった多様な脳機能に関与し，難治性てんかんの治療法である迷走神経刺激療法の作用メカニズムにおいて重要な役割を果たす青斑核と情報処理を司り，てんかん焦点になる傾向がある海馬の局所的な相互作用を評価するため，MEAとPDMS構造物から構成されるマイクロデバイスを用いた共培養系の構築を本研究の目的とした．そして，その目的を達成するため，以下の項目を行った．

1. 成熟した培養神経回路網に対するノルアドレナリンの添加

青斑核と海馬の *in vitro* 共培養系のダイナミクス評価に対して，海馬に対するネットワークレベルでのノルアドレナリンの効果に関する基礎的な知見を得るため，MEA上に培養された成熟した海馬由来神経回路網に対してノルアドレナリンを添加し，その影響を評価した．

その結果，ノルアドレナリンを添加することにより，スパイク数，単電極バースト数，ネットワークバースト数など活動に関する指標が有意に減少するといった活動抑制効果が確認された．また，平均発火率，標準化されたフーリエスペクトルの算出により，ノルアドレナリン添加によって，活動のベースラインが下がり，およそ 200 秒周期の活動パターンが強調される，周期的な活動の強調を促す効果が確認された．

2. ノルアドレナリンの効果に関する系統的な評価

系統的にノルアドレナリンの効果の評価するため，培養神経回路網のダイナミクスが変化する発達過程における影響，ノルアドレナリンの濃度変化に対する影響の評価を行った．

その結果，発達段階の影響に関しては，ダイナミクスが変化する培養開始後 2 週から 4 週の間を試料に共通して，ノルアドレナリンの添加による活動抑制効果が現れた．また，ネットワークバーストのバースト数以外の特徴量に対する影響については，発達段階に応じて異なる反応が見られ，発達における GABA 作動性神経細胞の発達やネットワーク構造の変化が関与していることが示唆された．濃度依存性については，ノルアドレナリンの濃度を 1 μ M, 10 μ M, 20 μ M と 3 条件に分けて複数添加したが，条件に依存せず，つまり濃度には依存せず活動抑制効果が確認された．しかし，その

活動抑制効果の度合いについては濃度に依存していること、その依存性については試料によって異なることが示唆された。

これらの結果より、ノルアドレナリンが保持する、発達段階や濃度に大きく依存しないロバストな活動抑制効果が確認された。

3. 青斑核単独培養系の構築

青斑核と海馬の *in vitro* 共培養系の構築に向けて、培養方法が確立されていなかった MEA を用いた青斑核の培養系を確立し、単独培養系におけるダイナミクスを評価した。

その結果、青斑核由来培養神経回路網は、海馬や大脳皮質由来培養神経回路網が示す特徴的な同期活動であるネットワークバーストを示さず、非同期的な活動を行っていた。また、移動エントロピー解析によって、青斑核の結合強度は、海馬や大脳皮質の結合強度に比べて、極めて小さいこと、青斑核由来培養神経回路網内の結合は疎であることが示された。また、免疫組織化学染色の結果と ISI ヒストグラムが生体内で計測された青斑核から算出された ISI ヒストグラムと類似していたことから、本実験系における青斑核由来培養神経回路網はノルアドレナリン作動性神経細胞を有しており、その電気活動が評価可能であることが示された。

これらの結果より、MEA における青斑核の単独培養系が構築されたと考えられる。

4. 青斑核-海馬共培養系の構築

独自に設計し、作製した MEA と生体適合性の高いシリコーンゴム PDMS 構造物を組み合わせたデバイスを作製し、青斑核と海馬の共培養を行い、そのダイナミクスについて評価した。

共培養系における両培養区画の結合を評価するための相対スパイク時刻、移動エントロピーに関する解析結果より、海馬から青斑核へのミリ秒オーダーの機能的結合を有していることが示された。また、共培養系における海馬のスパイク数、ネットワークバースト数は、海馬の単独培養系における両指標に比べて、小さく、活動が抑制されていることが確認された。その抑制効果にはノルアドレナリンが寄与していることが示唆された。

これらの結果より、青斑核と海馬の共培養系が構築されたと考えられる。

以上をまとめると、第2章「成熟した培養神経回路網に対するノルアドレナリンの添加」と第3章「ノルアドレナリンの効果に関する系統的な評価」より、ノルアドレナリンの細胞レベルのみならず、ネットワークレベルのロバストな活動抑制効果が明らかになった。また、培養4週以降の試料に対しては周期活動の強調効果を有していることが明らかとなった。そして、第4章「青斑核単独培養系の構築」より、MEAを用いた青斑核の単独培養系が構築され、青斑核由来の培養神経回路網は、ネットワークとして非同期的な活動を示し、細胞間の結合が疎であるといった特有の性質が明らかになった。さらに、第5章「青斑核-海馬共培養系の構築」では、独自のデバイスと第4章の知見を活かして、青斑核と海馬の共培養系の構築を行った。そして、第2～4章で得た、ネットワークレベルの活動に対するノルアドレナリンの効果と青斑核の活動と共培養系における活動を比較することにより、共培養系における海馬由来の培養神経回路網は活動が抑制されること、共培養系における青斑核由来の培養神経回路網は同期的に活動することが初めて明らかになった。

これらの一連の研究で得られた知見は、青斑核の機能を神経細胞レベルに加えて神経回路レベルで理解する基礎となることが期待される。

6.2 今後の展望

本研究を通して得られた知見は、青斑核の修飾作用メカニズムの解明、迷走神経刺激作用メカニズムの解明に貢献することが期待される。

6.2.1 青斑核の神経修飾作用メカニズム解明への貢献

青斑核が放出するノルアドレナリンは多様な神経調節機能を保持している。そこで、ノルアドレナリン添加によって得られた知見は、本研究における共培養系のダイナミクスの考察に対して貢献したように、今後も培養神経回路網を用いた実験系に直接的に貢献することが期待できる。

また、構築した青斑核と海馬の共培養系を用いることで、ノルアドレナリンの直接的な作用のみならず、ノルアドレナリン作動性神経細胞によるノルアドレナリン取り込みや青斑核が放出する神経ペプチドの影響を評価可能であると考えられる。また、培養する部位を海馬から他の部位に変更することも容易で、目的に応じて特定の部位への修飾作用の評価が可能であると考えられ、本実験系を用いることによって、多様な調節機能の解明に寄与できると考えられる。

6.2.2 迷走神経刺激作用メカニズムの解明への貢献

MEA を用いた本共培養系は、非侵襲的な電気計測を行うことから、迷走神経刺激療法で確認されている短期のみならず長期の効果のメカニズムについても、その詳細を調べることが可能であると考えられる。また、MEA は電気刺激も可能であることから、青斑核側への電気刺激による海馬への影響も評価可能であると考えられる。また、MEA を用いていることと *in vitro* である利点として、ネットワークレベルの活動と対応付けた形で、NE の修飾作用に関わる関連する遺伝子、タンパク質、受容体、シグナル伝達を特定することが可能であると考えられる。

謝辞

研究構想から実験結果に関するディスカッションに至るまで、多くのご助言を受け賜りました指導教員である

東京大学大学院 工学系研究科 教授 神保 泰彦 先生
に深く御礼申し上げます。神保先生とのディスカッションは本研究を遂行する上で大きなモチベーションとなりました。有意義な時間を誠にありがとうございました。

同研究室にて数理手法を中心に、多くのご助言を頂きました

東京大学 先端科学技術研究センター 准教授 小谷 潔 先生
に深く御礼申し上げます。小谷先生の鋭い洞察力から発せられるご助言には多くの学びがあり、私が成長する多くの機会となりました。

学位論文作成にあたり、それぞれのご専門からご助言頂きました

東京大学大学院 総合文化研究科 教授 石井 直方 先生
東京大学大学院 新領域創成科学研究科 教授 鳥居 徹 先生
東京大学 先端科学技術研究センター 講師 高橋 宏知 先生
に深く感謝申し上げます。

同じ研究室に在籍している皆様とは様々な話題について共に学び、議論することで有意義な時間を過ごすことができました。感謝申し上げます。

そして、最後に、物事の表層にとらわれず本質を見抜くように私のことを育ててくださった

吉田 彰子 様

吉田 博則 様

に心より感謝申し上げます。

皆様のおかげでここに本論文をまとめるに至りました。この場を借りて、深く御礼申し上げます。

参考文献

- Aladjalova, N. a. 1957. "Infra-Slow Rhythmic Oscillations of the Steady Potential of the Cerebral Cortex." *Nature* 179:957–59.
- Anlezark, G. M., T. J. Crow, and A. P. Greenway. 1973. "Impaired Learning and Decreased Cortical Norepinephrine after Bilateral Locus Coeruleus Lesions." *Science* 181(4100):682–84.
- Aston-Jones, G., and FE Bloom. 1981a. "Activity of Norepinephrine-Containing Locus Coeruleus Neurons in Behaving Rats Anticipates Fluctuations in the Sleep-Waking Cycle." *The Journal of Neuroscience* 1(8):876–86.
- Aston-Jones, G., and FE Bloom. 1981b. "Nonrepinephrine-Containing Locus Coeruleus Neurons in Behaving Rats Exhibit Pronounced Responses to Non-Noxious Environmental Stimuli." *The Journal of Neuroscience* 1(8):887–900.
- Bandyopadhyay, Susanta, and John J. Hablitz. 2007. "Dopaminergic Modulation of Local Network Activity in Rat Prefrontal Cortex." *Journal of neurophysiology* 97:4120–28.
- Baulac, Stéphanie et al. 2001. "First Genetic Evidence of GABAA Receptor Dysfunction in Epilepsy: A Mutation in the $\gamma 2$ -Subunit Gene." *Nature Genetics* 28(1):46–48.
- Bear, Mark F. et al. 2007. カラー版 ベアー コノーズ パラディーソ 神経科学—脳の探求—. 西村書店.
- Bear, Mark F., Barry W. Connors, and Michael A. Paradiso. 2006. *Neuroscience: Exploring the Brain, 3rd Edition*. Lippincott Williams and Wilkins.
- Beggs, John M., and Dietmar Plenz. 2003. "Neuronal Avalanches in Neocortical Circuits." *The Journal of neuroscience* 23(35):11167–77.
- Ben-Menachem, Elinor. 2002. "Vagus-Nerve Stimulation for the Treatment of Epilepsy." *The Lancet Neurology* 1(8):477–82.
- Berdichevsky, Yevgeny, Helen Sabolek, John B. Levine, Kevin J. Staley, and Martin L. Yarmush. 2009. "Microfluidics and Multielectrode Array-Compatible Organotypic Slice Culture Method." *Journal of neuroscience methods* 178(1):59–
-

- 64.
- Bergles, DE E., VA A. Doze, D. V Madison, and S. J. Smith. 1996. "Excitatory Actions of Norepinephrine on Multiple Classes of Hippocampal CA1 Interneurons." *The Journal of Neuroscience* 16(2):572–85.
- Berod, A., M. Chat, L. Paut, and M. Tappaz. 1984. "Catecholaminergic and GABAergic Anatomical Relationship in the Rat Substantia Nigra, Locus Coeruleus, and Hypothalamic Median Eminence: Immunocytochemical Visualization of Biosynthetic Enzymes on Serial Semithin Plastic-Embedded Sections." *The journal of histochemistry and cytochemistry: official journal of the Histochemistry Society* 32(12):1331–38.
- Bockenhauer, Detlef et al. 2009. "Epilepsy, Ataxia, Sensorineural Deafness, Tubulopathy, and KCNJ10 Mutations." *The New England journal of medicine* 360(19):1960–70.
- Bouret, Sebastien, and Susan J. Sara. 2002. "Locus Coeruleus Activation Modulates Firing Rate and Temporal Organization of Odour-Induced Single-Cell Responses in Rat Piriform Cortex." *The European journal of neuroscience* 16(12):2371–82.
- Buckmaster, Paul S., Guo Feng Zhang, and Ruth Yamawaki. 2002. "Axon Sprouting in a Model of Temporal Lobe Epilepsy Creates a Predominantly Excitatory Feedback Circuit." *The Journal of Neuroscience* 22(15):6650–58.
- Cao, Jun-Li et al. 2010. "Essential Role of the cAMP-cAMP Response-Element Binding Protein Pathway in Opiate-Induced Homeostatic Adaptations of Locus Coeruleus Neurons." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 107(39):17011–16.
- Carter, Matthew E. et al. 2010. "Tuning Arousal with Optogenetic Modulation of Locus Coeruleus Neurons." *Nature Neuroscience* 13(12):1526–33.
- Chiappalone, M. et al. 2005. "Burst Detection Algorithms for the Analysis of Spatio-Temporal Patterns in Cortical Networks of Neurons." *Neurocomputing* 65-66:653–62.
- Chiappalone, Michela, Marco Bove, Alessandro Vato, Mariateresa Tedesco, and Sergio Martinoia. 2006. "Dissociated Cortical Networks Show Spontaneously Correlated Activity Patterns during in Vitro Development." *Brain research* 1093(1):41–53.

-
- Clinckers, Ralph et al. 2010. "Pharmacological and Neurochemical Characterization of the Involvement of Hippocampal Adrenoreceptor Subtypes in the Modulation of Acute Limbic Seizures." *Journal of neurochemistry* 115(6):1595–1607.
- Damoiseaux, J. S. et al. 2006. "Consistent Resting-State Networks across Healthy Subjects." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 103(2):13848–53.
- DiPilato, Lisa M., Xiaodong Cheng, and Jin Zhang. 2004. "Fluorescent Indicators of cAMP and Epac Activation Reveal Differential Dynamics of cAMP Signaling within Discrete Subcellular Compartments." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101(47):16513–18.
- Downes, Julia H. et al. 2012. "Emergence of a Small-World Functional Network in Cultured Neurons." *PLoS computational biology* 8(5):e1002522.
- Dworak, Bradley J., and Bruce C. Wheeler. 2009. "Novel MEA Platform with PDMS Microtunnels Enables the Detection of Action Potential Propagation from Isolated Axons in Culture." *Lab on a chip* 9(3):404–10.
- Escayg, A. et al. 2000. "Coding and Noncoding Variation of the Human Calcium-Channel beta4-Subunit Gene CACNB4 in Patients with Idiopathic Generalized Epilepsy and Episodic Ataxia." *American journal of human genetics* 66(5):1531–39.
- Feinerman, Ofer, Assaf Rotem, and Elisha Moses. 2008. "Reliable Neuronal Logic Devices from Patterned Hippocampal Cultures." *Nature Physics* 4:967–73.
- Filippov, Igor V., William C. Williams, and Valeri a. Frolov. 2004. "Very Slow Potential Oscillations in Locus Coeruleus and Dorsal Raphe Nucleus under Different Illumination in Freely Moving Rats." *Neuroscience Letters* 363:89–93.
- Foley, JO, and FS DuBois. 1937. "Quantitative Studies of the Vagus Nerve in the Cat. I. The Ratio of Sensory to Motor Fibers." *Journal of Comparative Neurology* 67:49–67.
- Foote, S. L., G. Aston-Jones, and F. E. Bloom. 1980. "Impulse Activity of Locus Coeruleus Neurons in Awake Rats and Monkeys Is a Function of Sensory Stimulation and Arousal." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 77(5):3033–37.
-

-
- Fornai, Francesco, Riccardo Ruffoli, Filippo S. Giorgi, and Antonio Paparelli. 2011. "The Role of Locus Coeruleus in the Antiepileptic Activity Induced by Vagus Nerve Stimulation." *The European journal of neuroscience* 33(12):2169–78.
- Friedman, Nir et al. 2012. "Universal Critical Dynamics in High Resolution Neuronal Avalanche Data." *Physical Review Letters* 108(20):208102.
- Fukuda, Junji et al. 2006. "Micromolding of Photocrosslinkable Chitosan Hydrogel for Spheroid Microarray and Co-Cultures." *Biomaterials* 27(30):5259–67.
- Gibbs, M. E., D. S. Hutchinson, and R. J. Summers. 2010. "Noradrenaline Release in the Locus Coeruleus Modulates Memory Formation and Consolidation; Roles for A- and B-Adrenergic Receptors." *Neuroscience* 170(4):1209–22.
- Groves, Duncan A., and Verity J. Brown. 2005. "Vagal Nerve Stimulation: A Review of Its Applications and Potential Mechanisms That Mediate Its Clinical Effects." *Neuroscience and biobehavioral reviews* 29(3):493–500.
- Gutkind, J. S. 1998. "The Pathways Connecting G Protein-Coupled Receptors to the Nucleus through Divergent Mitogen-Activated Protein Kinase Cascades." *Journal of Biological Chemistry* 273(4):1839–42.
- Hagan, J. J. et al. 1999. "Orexin A Activates Locus Coeruleus Cell Firing and Increases Arousal in the Rat." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 96(19):10911–16.
- Hahn, Gerald et al. 2010. "Neuronal Avalanches in Spontaneous Activity in Vivo." *Journal of neurophysiology* 104(6):3312–22.
- Haldeman, Clayton, and John Beggs. 2005. "Critical Branching Captures Activity in Living Neural Networks and Maximizes the Number of Metastable States." *Physical Review Letters* 94(5):058101.
- Hammond, Edward J., Basim M. Uthman, Steven a. Reid, and B. J. Wilder. 1992. "Electrophysiological Studies of Cervical Vagus Nerve Stimulation in Humans: I. EEG Effects." *Epilepsia* 33(6):1013–20.
- Handforth, A. et al. 1998. "Vagus Nerve Stimulation Therapy for Partial-Onset Seizures: A Randomized Active-Control Trial." *Neurology* 51(1):48–55.
- Happe, H. .. et al. 2004. "Alpha-2 Adrenergic Receptor Development in Rat CNS: An Autoradiographic Study." *Neuroscience* 123(1):167–78.
-

-
- Hasselmo, M. E., C. Linster, M. Patil, D. Ma, and M. Cekic. 1997. "Noradrenergic Suppression of Synaptic Transmission May Influence Cortical Signal-to-Noise Ratio." *Journal of neurophysiology* 77:3326–39.
- Hasselmo, ME, and Christiane Linster. 1997. "Noradrenergic Suppression of Synaptic Transmission May Influence Cortical Signal-to-Noise Ratio." *Journal of neurophysiology* 3326–39.
- Hobbs, Jon P., Jodi L. Smith, and John M. Beggs. 2010. "Aberrant Neuronal Avalanches in Cortical Tissue Removed from Juvenile Epilepsy Patients." *Journal of clinical neurophysiology: official publication of the American Electroencephalographic Society* 27(6):380–86.
- Hobson, J., R. McCarley, and P. Wyzinski. 1975. "Sleep Cycle Oscillation: Reciprocal Discharge by Two Brainstem Neuronal Groups." *Science* 189(4196):55–58.
- Hord, E. Daniel., M. Steve. Evans, Sajjad Mueed, Bola Adamolekun, and Dean K. Naritoku. 2003. "The Effect of Vagus Nerve Stimulation on Migraines." *The Journal of Pain* 4(9):530–34.
- Iijima, K., K. Ohtomo, and K. Ijima. 1988. "Immunocytochemical Study Using a GABA Antiserum for the Demonstration of Inhibitory Neurons in the Rat Locus Ceruleus." *The American journal of anatomy* 181(1):43–52.
- Ikegaya, Yuji et al. 2004. "Synfire Chains and Cortical Songs: Temporal Modules of Cortical Activity." *Science* 304(5670):559–64.
- Ikegaya, Yuji, Morgane Le Bon-Jego, and Rafael Yuste. 2005. "Large-Scale Imaging of Cortical Network Activity with Calcium Indicators." *Neuroscience research* 52(2):132–38.
- Imbrici, Paola et al. 2004. "Dysfunction of the Brain Calcium Channel CaV2.1 in Absence Epilepsy and Episodic Ataxia." *Brain: a journal of neurology* 127(Pt 12):2682–92.
- Ito, Daisuke, Takumi Komatsu, and Kazutoshi Gohara. 2013. "Measurement of Saturation Processes in Glutamatergic and GABAergic Synapse Densities during Long-Term Development of Cultured Rat Cortical Networks." *Brain research* 1534:22–32.
- Ito, Shinya et al. 2011. "Extending Transfer Entropy Improves Identification of
-

-
- Effective Connectivity in a Spiking Cortical Network Model.” *PLoS ONE* 6(11):e27431.
- Izhikevich, E. M. 2003. “Simple Model of Spiking Neurons.” *IEEE transactions on neural networks / a publication of the IEEE Neural Networks Council* 14(6):1569–72.
- Jimbo, Y., T. Tateno, and H. P. Robinson. 1999. “Simultaneous Induction of Pathway-Specific Potentiation and Depression in Networks of Cortical Neurons.” *Biophysical journal* 76(2):670–78.
- Jimbo, Yasuhiko, Nahoko Kasai, Keiichi Torimitsu, Takashi Tateno, and Hugh P. C. Robinson. 2003. “A System for MEA-Based Multisite Stimulation.” *IEEE transactions on bio-medical engineering* 50(2):241–48.
- Joseph, Altman, and Bayer A. Shirley. 1994. *Atlas of Prenatal Rat Brain Development*. CRC Press.
- Kamioka, Hiroyuki, Eisaku Maeda, Yasuhiko Jimbo, Hugh P. C. Robinson, and Akio Kawana. 1996. “Spontaneous Periodic Synchronized Bursting during Formation of Mature Patterns of Connections in Cortical Cultures.” *Neuroscience Letters* 206(2-3):109–12.
- Krahl, Scott E., and Kevin B. Clark. 2012. “Vagus Nerve Stimulation for Epilepsy: A Review of Central Mechanisms.” *Surgical neurology international* 3(Suppl 4):S255–59.
- Krahl, Scott E., Kevin B. Clark, Douglas C. Smith, and Ronald A. Browning. 1998. “Locus Coeruleus Lesions Suppress the Seizure-Attenuating Effects of Vagus Nerve Stimulation.” *Epilepsia* 39(7):709–14.
- De Lanerolle, N. C., J. H. Kim, R. J. Robbins, and D. D. Spencer. 1989. “Hippocampal Interneuron Loss and Plasticity in Human Temporal Lobe Epilepsy.” *Brain Research* 495(2):387–95.
- Lenaerts, M. E., K. J. Oommen, J. R. Couch, and V. Skaggs. 2008. “Can Vagus Nerve Stimulation Help Migraine?” *Cephalalgia : an international journal of headache* 28(4):392–95.
- Lorincz, Magor L., Freya Geall, Ying Bao, Vincenzo Crunelli, and Stuart W. Hughes. 2009. “ATP-Dependent Infra-Slow (<0.1 Hz) Oscillations in Thalamic Networks.”
-

-
- PLoS ONE* 4(2).
- Lossin, Christoph et al. 2003. "Epilepsy-Associated Dysfunction in the Voltage-Gated Neuronal Sodium Channel SCN1A." *The Journal of Neuroscience* 23(36):11289–95.
- Madhavan, Radhika, Zenas C. Chao, and Steve M. Potter. 2007. "Plasticity of Recurring Spatiotemporal Activity Patterns in Cortical Networks." *Physical biology* 4(3):181–93.
- Maeda, E., HP Robinson, and A. Kawana. 1995. "The Mechanisms of Generation and Propagation of Synchronized Bursting in Developing Networks of Cortical Neurons." *The Journal of Neuroscience* 15(10):6834–45.
- Maheswaranathan, Niru, Silvia Ferrari, Antonius M. J. Vandongen, and Craig S. Henriquez. 2012. "Emergent Bursting and Synchrony in Computer Simulations of Neuronal Cultures." *Frontiers in computational neuroscience* 6:15.
- Majumdar, Devi, Yandong Gao, Deyu Li, and Donna J. Webb. 2011. "Co-Culture of Neurons and Glia in a Novel Microfluidic Platform." *Journal of neuroscience methods* 196(1):38–44.
- Mann, Edward O., Takashi Tominaga, Michinori Ichikawa, and Susan a. Greenfield. 2005. "Cholinergic Modulation of the Spatiotemporal Pattern of Hippocampal Activity in Vitro." *Neuropharmacology* 48:118–33.
- Manta, Stella, Jianming Dong, Guy Debonnel, and Pierre Blier. 2009. "Enhancement of the Function of Rat Serotonin and Norepinephrine Neurons by Sustained Vagus Nerve Stimulation." *Journal of psychiatry & neuroscience: JPN* 34(4):272–80.
- Masuko, S., Y. Nakajima, S. Nakajima, and K. Yamaguchi. 1986. "Noradrenergic Neurons from the Locus Ceruleus in Dissociated Cell Culture: Culture Methods, Morphology, and Electrophysiology." *The Journal of Neuroscience* 6(11):3229–41.
- Mazarati, a M. et al. 1998. "Galanin Modulation of Seizures and Seizure Modulation of Hippocampal Galanin in Animal Models of Status Epilepticus." *The Journal of Neuroscience* 18(23):10070–77.
- Mazarati, Andrey M., and Claude G. Wasterlain. 2002. "Anticonvulsant Effects of
-

-
- Four Neuropeptides in the Rat Hippocampus during Self-Sustaining Status Epilepticus.” *Neuroscience Letters* 331:123–27.
- Mcintyre, D. A. N. C., and Luigi Giugno. 1988. “Effect of Clonidine on Amygdala Kindling in Normal and Rats.” *Experimental Neurology* 99(1):96–106.
- Meister, M., R. O. Wong, D. A. Baylor, and C. J. Shatz. 1991. “Synchronous Bursts of Action Potentials in Ganglion Cells of the Developing Mammalian Retina.” *Science* 252(5008):939–43.
- Mello, Luiz E. A. M. et al. 1993. “Circuit Mechanisms of Seizures in the Pilocarpine Model of Chronic Epilepsy: Cell Loss and Mossy Fiber Sprouting.” *Epilepsia* 34(6):985–95.
- Mok, S. Y., Z. Nadasdy, Y. M. Lim, and S. Y. Goh. 2012. “Ultra-Slow Oscillations in Cortical Networks in Vitro.” *Neuroscience* 206:17–24.
- Monto, Simo, Satu Palva, Juha Voipio, and J. Matias Palva. 2008. “Very Slow EEG Fluctuations Predict the Dynamics of Stimulus Detection and Oscillation Amplitudes in Humans.” *The Journal of Neuroscience* 28(33):8268–72.
- Nemeroff, Charles B. et al. 2006. “VNS Therapy in Treatment-Resistant Depression: Clinical Evidence and Putative Neurobiological Mechanisms.” *Neuropsychopharmacology: official publication of the American College of Neuropsychopharmacology* 31(7):1345–55.
- O’Keefe, J., and J. Dostrovsky. 1971. “The Hippocampus as a Spatial Map. Preliminary Evidence from Unit Activity in the Freely-Moving Rat.” *Brain research* 34:171–75.
- O’Keefe, J., and M. L. Recce. 1993. “Phase Relationship between Hippocampal Place Units and the EEG Theta Rhythm.” *Hippocampus* 3(3):317–30.
- Olpe, H. R., and M. Steinmann. 1991. *Neurobiology of The Locus Coeruleus*. Elsevier.
- Park, Jaewon, Hisami Koito, Jianrong Li, and Arum Han. 2009. “Microfluidic Compartmentalized Co-Culture Platform for CNS Axon Myelination Research.” *Biomedical microdevices* 11(6):1145–53.
- Pasquale, V., P. Massobrio, L. L. Bologna, M. Chiappalone, and S. Martinoia. 2008. “Self-Organization and Neuronal Avalanches in Networks of Dissociated Cortical Neurons.” *Neuroscience* 153(4):1354–69.
-

-
- Van Pelt, J., M. a Corner, P. S. Wolters, W. L. C. Rutten, and G. J. a Ramakers. 2004. "Longterm Stability and Developmental Changes in Spontaneous Network Burst Firing Patterns in Dissociated Rat Cerebral Cortex Cell Cultures on Multielectrode Arrays." *Neuroscience letters* 361(1-3):86–89.
- Van Pelt, Jaap, Pieter S. Wolters, Michael A. Corner, Wim L. C. Rutten, and Ger J. A. Ramakers. 2004. "Long-Term Characterization of Firing Dynamics of Spontaneous Bursts in Cultured Neural Networks." *IEEE transactions on bio-medical engineering* 51(11):2051–62.
- Penry, J. Kiffin, and J. Christine Dean. 1990. "Prevention of Intractable Partial Seizures by Intermittent Vagal Stimulation in Humans: Preliminary Results." *Epilepsia* 31(s2):S40–43.
- Penttonen, M. et al. 1999. "Ultra-Slow Oscillation (0.025 Hz) Triggers Hippocampal Afterdischarges in Wistar Rats." *Neuroscience* 94(3):735–43.
- Petermann, Thomas et al. 2009. "Spontaneous Cortical Activity in Awake Monkeys Composed of Neuronal Avalanches." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 106(37):15921–26.
- Peyrin, Jean-Michel et al. 2011. "Axon Diodes for the Reconstruction of Oriented Neuronal Networks in Microfluidic Chambers." *Lab on a Chip* 11:3663.
- Pittman, Randall N., Kenneth P. Minneman, and Perry B. Molinoff. 1980. "Ontogeny of β 1- and β 2-Adrenergic Receptors in Rat Cerebellum and Cerebral Cortex." *Brain Research* 188(2):357–68.
- Quiroga, R. Quian, Z. Nadasdy, and Y. Ben-Shaul. 2004. "Unsupervised Spike Detection and Sorting with Wavelets and Superparamagnetic Clustering." *Neural computation* 16(8):1661–87.
- Rasmussen, Kurt, David A. Morilak, and Barry L. Jacobs. 1986. "Single Unit Activity of Locus Coeruleus Neurons in the Freely Moving Cat." *Brain Research* 371(2):324–34.
- Rolston, J. D., D. A. Wagenaar, and S. M. Potter. 2007. "Precisely Timed Spatiotemporal Patterns of Neural Activity in Dissociated Cortical Cultures." *Neuroscience* 148(1):294–303.
- Rosenberg, Paul a., Jeffrey S. Schweitzer, and Marc a. Dichter. 1985. "Effects of
-

-
- Norepinephrine on Rat Neocortical Neurons in Dissociated Cell Culture.” *Brain Research* 344(2):369–72.
- Rush, A. Joh. et al. 2000. “Vagus Nerve Stimulation (VNS) for Treatment-Resistant Depressions: A Multicenter Study.” *Biological Psychiatry* 47(4):276–86.
- Sackeim, H. a et al. 2001. “Vagus Nerve Stimulation (VNS) for Treatment-Resistant Depression: Efficacy, Side Effects, and Predictors of Outcome.” *Neuropsychopharmacology* 25(01):713–28.
- Sadler, Rm, Ra Purdy, and S. Rahey. 2002. “Vagal Nerve Stimulation Aborts Migraine in Patient with Intractable Epilepsy.” *Cephalalgia* 22(6):482–84.
- Sager, Jonathan J., and Gonzalo E. Torres. 2011. “Proteins Interacting with Monoamine Transporters: Current State and Future Challenges.” *Biochemistry* 50:7295–7310.
- Salgado, Humberto, Georg Köhr, and Mario Treviño. 2012. “Noradrenergic ‘Tone’ Determines Dichotomous Control of Cortical Spike-Timing-Dependent Plasticity.” *Scientific reports* 2:417.
- Sara, Susan J., and Valerie Devauges. 1988. “Priming Stimulation of Locus Coeruleus Facilitates Memory Retrieval in the Rat.” *Brain Research* 438(1-2):299–303.
- Scanziani, M., B. H. Gähwiler, and S. M. Thompson. 1993. “Presynaptic Inhibition of Excitatory Synaptic Transmission Mediated by Alpha Adrenergic Receptors in Area CA3 of the Rat Hippocampus in Vitro.” *The Journal of Neuroscience* 13(12):5393–5401.
- Schlaepfer, T. E. et al. 2008. “Vagus Nerve Stimulation for Depression: Efficacy and Safety in a European Study.” *Psychological medicine* 38(5):651–61.
- Schroeter, S. et al. 2000. “Immunolocalization of the Cocaine- and Antidepressant-Sensitive L-Norepinephrine Transporter.” *The Journal of comparative neurology* 420(2):211–32.
- Shahaf, Goded, and Shimon Marom. 2001. “Learning in Networks of Cortical Neurons.” *The Journal of Neuroscience* 21(22):8782–88.
- Skaggs, WE, and BL McNaughton. 1996. “Theta Phase Precession in Hippocampal Neuronal Populations and the Compression of Temporal Sequences.” *Hippocampus* 6(2):149–72.
-

-
- Sloviter, R. 1987. "Decreased Hippocampal Inhibition and a Selective Loss of Interneurons in Experimental Epilepsy." *Science* 235(4784):73–76.
- Stroud, Leanne M., Terence J. O'Brien, Bianca Jupp, Charlott Wallengren, and Margaret J. Morris. 2005. "Neuropeptide Y Suppresses Absence Seizures in a Genetic Rat Model." *Brain Research* 1033:151–56.
- Sutula, T., X. He, J. Cavazos, and G. Scott. 1988. "Synaptic Reorganization in the Hippocampus Induced by Abnormal Functional Activity." *Science* 239(4844):1147–50.
- Svensson, E., S. Grillner, and D. Parker. 2001. "Gating and Braking of Short- and Long-Term Modulatory Effects by Interactions between Colocalized Neuromodulators." *The Journal of Neuroscience* 21(16):5984–92.
- Takekawa, Takashi, Yoshikazu Isomura, and Tomoki Fukai. 2010. "Accurate Spike Sorting for Multi-Unit Recordings." *The European journal of neuroscience* 31(2):263–72.
- Tateno, Takashi, and Yasuhiko Jimbo. 1999. "Activity-Dependent Enhancement in the Reliability of Correlated Spike Timings in Cultured Cortical Neurons." *Biological Cybernetics* 80(1):45–55.
- Taylor, Anne M. et al. 2005. "A Microfluidic Culture Platform for CNS Axonal Injury, Regeneration and Transport." *Nature methods* 2(8):599–605.
- Terry, Reese, W. Brent Tarver, and Jacob Zabara. 1990. "An Implantable Neurocybernetic Prosthesis System." *Epilepsia* 31(s2):S33–37.
- The Vagus Nerve Stimulation Study Group. 1995. "A Randomized Controlled Trial of Chronic Vagus Nerve Stimulation for Treatment of Medically Intractable Seizures." *Neurology* 45(2):224–30.
- Torisawa, Yu-suke et al. 2009. "Microfluidic Hydrodynamic Cellular Patterning for Systematic Formation of Co-Culture Spheroids." *Integrative biology: quantitative biosciences from nano to macro* 1(11-12):649–54.
- Torres, Gonzalo E., Raul R. Gainetdinov, and Marc G. Caron. 2003. "Plasma Membrane Monoamine Transporters: Structure, Regulation and Function." *Nature reviews. Neuroscience* 4(January):13–25.
- Vanhatalo, S. et al. 2004. "Infraslow Oscillations Modulate Excitability and Interictal
-

-
- Epileptic Activity in the Human Cortex during Sleep.” *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101:5053–57.
- Velasco, Ana Luisa et al. 2007. “Electrical Stimulation of the Hippocampal Epileptic Foci for Seizure Control: A Double-Blind, Long-Term Follow-up Study.” *Epilepsia* 48(10):1895–1903.
- Wagenaar, Daniel A., Radhika Madhavan, Jerome Pine, and Steve M. Potter. 2005. “Controlling Bursting in Cortical Cultures with Closed-Loop Multi-Electrode Stimulation.” *The Journal of Neuroscience* 25(3):680–88.
- Wagenaar, Daniel A., Jerome Pine, and Steve M. Potter. 2006. “An Extremely Rich Repertoire of Bursting Patterns during the Development of Cortical Cultures.” *BMC neuroscience* 7(1):11.
- Wallace, R. H. et al. 1998. “Febrile Seizures and Generalized Epilepsy Associated with a Mutation in the Na⁺-Channel beta1 Subunit Gene SCN1B.” *Nature Genetics* 19(4):366–70.
- Wallace, Robyn H. et al. 2001. “Mutant GABAA Receptor γ 2-Subunit in Childhood Absence Epilepsy and Febrile Seizures.” *Nature Genetics* 28(1):49–52.
- Whitesides, George M., Emanuele Ostuni, Shuichi Takayama, Xingyu Jiang, and Donald E. Ingber. 2001. “Soft Lithography in Biology and Biochemistry.” *Annual Review of Biomedical Engineering* 3(1):335–73.
- Xia, Younan, and GM Whitesides. 1998. “Soft Lithography.” *Annual review of materials science* 28(1):153–84.
- Xu, F. et al. 2000. “Mice Lacking the Norepinephrine Transporter Are Supersensitive to Psychostimulants.” *Nature Neuroscience* 3(Dmi):465–71.
- Zabara, Jacob. 1992. “Inhibition of Experimental Seizures in Canines by Repetitive Vagal Stimulation.” *Epilepsia* 33(6):1005–12.
- Zaccolo, M. et al. 2000. “A Genetically Encoded, Fluorescent Indicator for Cyclic AMP in Living Cells.” *Nature Cell Biology* 2(1):25–29.
- Zuberi, S. M. 1999. “A Novel Mutation in the Human Voltage-Gated Potassium Channel Gene (Kv1.1) Associates with Episodic Ataxia Type 1 and Sometimes with Partial Epilepsy.” *Brain* 122(5):817–25.
- 宇川義一, and 辻省次. 2012. てんかんテキスト New Version. 中山書店.
-

日本神経学会, and 「てんかん治療ガイドライン」作成委員会. 2010. てんかん治療ガイドライン2010. 医学書院.