

博士学位論文

神経電気活動と
細胞外エネルギー源との関係性

関西学院大学大学院 理工学研究科
人間システム工学専攻

箕嶋 渉

2017年 3月

指導教員 工藤 卓 教授

神経電気活動と細胞外エネルギー源の関係性

箕嶋 渉

要旨

記憶や学習などの脳の高次機能の解明には、多数の神経細胞で構成された神経回路網の電気活動ダイナミクスを解析することが重要である。この目的のため、細胞外の環境を容易に変更できる分散培養を用いることは有効である。本研究では、ラット胎児大脑海馬領域由来の神経回路網を、底面に微小平面電極を設置した培養皿上に培養し、細胞外電位を多点同時計測して神経回路網の電気活動時空間パターンを解析した。

静止膜電位の維持、及び神経電気活動の発生には多量のエネルギーが必要である。神経細胞は、他の生細胞と同様に細胞外のブドウ糖を取り込み、代謝したエネルギーを使用している。神経電気活動の発現に細胞外ブドウ糖が重要であるにもかかわらず、神経回路網の電気活動特性と取り込んだブドウ糖量との関係性は未だ不明瞭である。そこで、本研究ではこの関係性を考察した。

第1章では、全体の序論として神経電気活動のダイナミクスに関連して神経細胞と細胞外ブドウ糖の関係性についてこれまでの研究背景を述べた。第2章では、培養神経回路網の自発性神経活動の特性を確認した。培養神経回路網の自発性神経活動は、培養日数に依存して神経活動頻度を増加させる。また、十分に培養され、自発性神経活動が活性化した神経回路網の細胞外ブドウ糖が欠乏した場合、約15時間後には自発性神経活動頻度が概ね3割まで減少することを明らかにした。第3章では、神経回路網の自発性神経活動が細胞外ブドウ糖濃度変化に依存して変化するという現象を報告した。分散培養された神経回路網における自発性神経活動頻度は、培養中のブドウ糖濃度に近い15 mMで最大となった。また、細胞外ブドウ糖濃度が20 mM以上の高濃度である場合、神経活動頻度は減衰した。培養神経回路網は培養時のブドウ糖濃度に適応し、その差分に反応して自発性神経活動を調節している可能性が示唆された。さらに、一般的な培養条件より高いブドウ糖濃度(30 mM)の自発性神経活動は飽和し、変化が無かった。また、低いブドウ糖濃度(7.5 mM)で培養した神経回路網はその神経活動頻度が調節されている可能性を示した。

これまでの知見では、自発性神経活動は刺激入力による誘発応答の正確な伝達を阻害する背景ノイズであると捉えられる傾向にあったが、近年は自発性神経活動パターンが神経回路網の内部状態を表象していると考えられている。そこで、第4章では自己組織化マップで自

発性神経活動と誘発応答の時空間パターンを解析した結果を報告した。結果として、培養神経回路網において、自発性神経活動と誘発応答の時空間活動パターンはある程度再現良く分離しながらも、自発性神経活動と誘発応答とは互いに共通した神経電気活動パターンを有していた。このことから、神経回路網はある入力に対して特定の出力を発現するのではなく、ある入力に対する出力はいくつかの活動パターンの選択肢の中から特定のパターンが確率的に引き出されている可能性が考えられる。また、細胞外ブドウ糖濃度を変化させた場合の神経電気活動パターン識別を試みたところ、高ブドウ糖濃度条件下では自発性神経活動の識別確率が上昇した。高ブドウ糖濃度条件下においては、誘発応答と自発性神経活動パターンの類似性が上昇する可能性が示唆された。

神経活動パターンは、回路網の構成要素となる神経細胞間を電気信号が伝搬した結果発生する。そこで、第5章では、平均的な自発性神経活動テンプレートを作成し、その差分から電流刺激印加の影響が及ぶ空間領域を解析した。結果から、刺激点からの距離に応じて、電流刺激の直接的な影響の成分と、背景的な活動などが複合した2次的な神経電気活動パターンが発生していることを明らかにした。また、細胞外ブドウ糖濃度が至適ブドウ糖濃度と異なる場合、細胞内の信号伝達が減弱し、結果として自発性神経活動頻度が低下する可能性を示した。これは、高ブドウ糖濃度条件下で自発性神経活動と誘発応答の活動パターンの類似度が上昇した結果と一致する。

神経回路網の電気活動パターンが細胞へのエネルギー供給に影響を受けるということは、「生存」という生物にとって最大の目的が神経回路網の情報処理に適切に組み込まれていることを意味すると考えられる。

キーワード

多電極アレイ、細胞外電位多点計測システム、培養神経回路網、神経電気活動空間パターン、自発性神経活動、誘発応答、細胞外ブドウ糖

目次

第 1 章	序論	1
1.1	神経回路網の情報処理基盤	2
1.2	神経活動の計測手法と神経回路網のダイナミクス	5
1.3	神経回路網の電気活動と細胞外ブドウ糖との関係性	9
第 2 章	培養神経回路網の生物学的特徴	13
2.1	序論	14
2.2	実験材料・手法	16
2.3	実験結果	28
2.4	考察	34
2.5	結論	36
第 3 章	自発性神経活動と細胞外ブドウ糖濃度との関係性	37
3.1	序論	38
3.2	実験材料・手法	41
3.3	実験結果	47
3.4	考察	69
3.5	結論	72
第 4 章	ファジィ自己組織化マップを用いた神経電気活動の識別	73
4.1	序論	74
4.2	実験材料・手法	75
4.3	実験結果	82
4.4	考察	100
4.5	結論	104
第 5 章	活動パターンテンプレートを用いた誘発応答伝播の推定	105
5.1	序論	106
5.2	実験材料・手法	108
5.3	実験結果	114

5.4	考察	130
5.5	結論	132
第6章	考察・結論	133
6.1	培養神経回路網の細胞外ブドウ糖要求性	134
6.2	自発性神経活動と細胞外ブドウ糖濃度との関係性	135
6.3	誘発応答パターンと細胞外ブドウ糖濃度との関係性	136
6.4	生体報酬系学習と血中ブドウ糖濃度	137
6.5	結論	138
	参考文献	140

第 1 章

序論

1.1 神経回路網の情報処理基盤

脳は大腦，中脳，間脳，小脳等で構成され，記憶，学習，認知，運動，感覚などの高次機能を担っている。脳のそれぞれの領域では，多数の神経細胞が神経突起を伸長し，シナプスを介して相互に接続された神経回路網が複雑に連携して機能を発揮する。脳の情報処理を実現する最小単位である神経細胞では，活動電位と呼ばれる膜電位変化が随時発生しており，神経細胞は活動電位を情報の基本要素として他の神経細胞へ伝達している。活動電位が発生する基盤として重要なのは，神経細胞の細胞膜内外に存在しているイオンにより形成される静止膜電位である。静止膜電位の状態では，細胞膜内でカリウムイオン，細胞膜外でナトリウムイオンが高濃度で維持されており，その電位差は約 -70 mV である [1]。シナプスを介した情報伝達においては，シナプス後細胞の脱分極がきっかけとなり，膜電位が一定の閾値を越えると電位依存性ナトリウムチャンネルが開孔する。このチャンネルを通してナトリウムイオンが細胞外から細胞内へ大量に流入し，膜電位は急速にナトリウムイオンの平衡電位に近づく。この脱分極により膜電位はおよそ $+30\text{ mV}$ に達する。この急峻な脱分極の後，電位依存性ナトリウムチャンネルは不活性化して閉孔する。これに続いて，電位依存性カリウムチャンネルが開孔し，カリウムイオンが細胞膜内から細胞膜外へ流出する。この結果，膜電位は再分極されて静止膜電位レベルへと収束する。この単一神経細胞レベルで発生する一連のスパイク状の膜電位変動を活動電位と呼ぶ (図 1.1)。

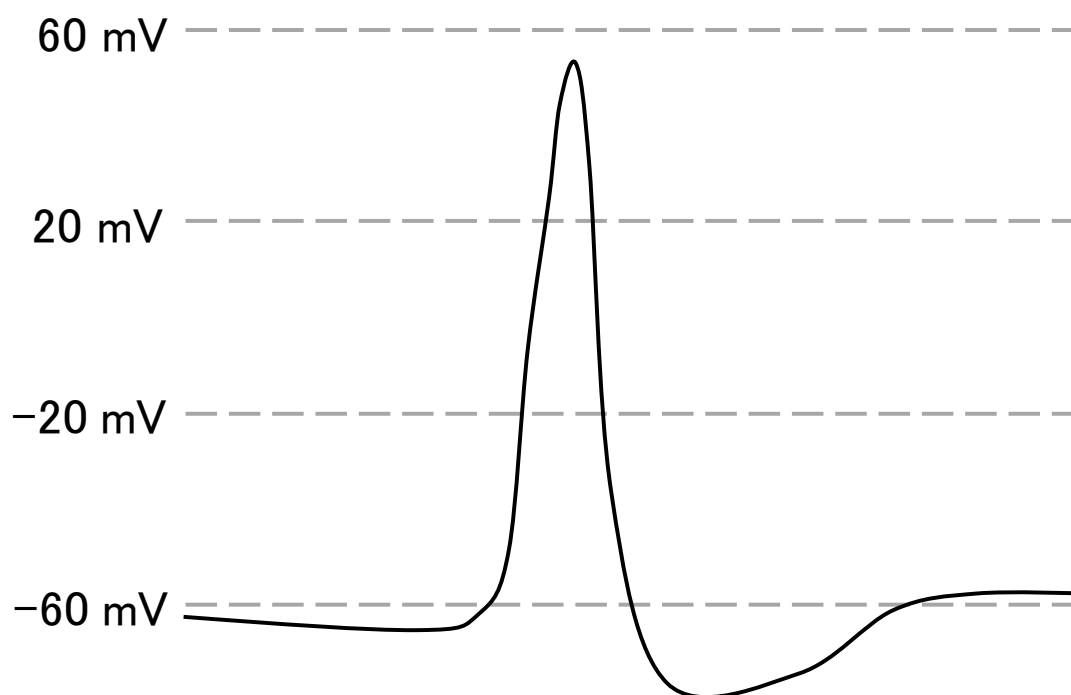


図 1.1 活動電位の模式図

また，一度活動電位が発生した神経細胞は，活動電位の発生直後から約2ミリ秒の間，電位

依存性ナトリウムチャネルの一時的な不活性化により活動電位が発生しない状態となる。この期間を絶対不応期という。これに続いて約3ミリ秒の間は活動電位の振幅が小さくなる相対不応期と呼ばれる期間になる。これらの期間を総合して不応期と呼び、活動電位の発生後は約5ミリ秒の間活動電位が発生しにくい状態となる。この非線形な不応期の存在が神経回路網全体のダイナミクスを複雑にしている要因であると考えられている [1]。

発生した活動電位は、神経細胞同士を繋ぐ通信ケーブルの役割を持つ軸索上を長軸方向へ伝播し、シナプス前終末に達すると、この領域を脱分極させる。これにより電位依存性カルシウムチャネルが開孔し、カルシウムイオンがシナプス内に流入する。このカルシウムイオンがシナプス小胞に存在する膜貫通型タンパク質に結合すると、シナプス小胞内に蓄えられていた神経伝達物質が放出される [2]。哺乳動物の中樞神経系における主要な興奮性神経伝達物質はグルタミン酸である。

放出されたグルタミン酸はシナプス間隙を拡散してシナプス後細胞膜上に局在する神経伝達物質受容体に結合する。シナプス後細胞膜上の神経伝達物質受容体は、 α -アミノ-3-ヒドロキシ-5-メチル-4-イソキサゾールプロピオン酸 (α -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid, AMPA) 型グルタミン酸受容体 (AMPA Receptor, AMPAR) と N-メチル-D-アスパラギン酸 (N-methyl-D-aspartate-acid, NMDA) 型グルタミン酸受容体 (NMDA Receptor, NMDAR) の2つに大きく分類される。グルタミン酸が AMPAR の受容部位に結合すると、AMPAR の陽イオン透過チャネルの開孔確率が上昇して、シナプス後細胞への陽イオン流入が起こり、興奮性シナプス後電位 (Excitatory Post Synaptic Potential, EPSP) が発生する [1]。EPSP が電位依存性ナトリウムチャネルの閾値を越えると活動電位が発生し、発生した活動電位は再び軸索上を伝播する。これら一連の過程により神経回路網における電気信号の伝達が実現される (図 1.2)。

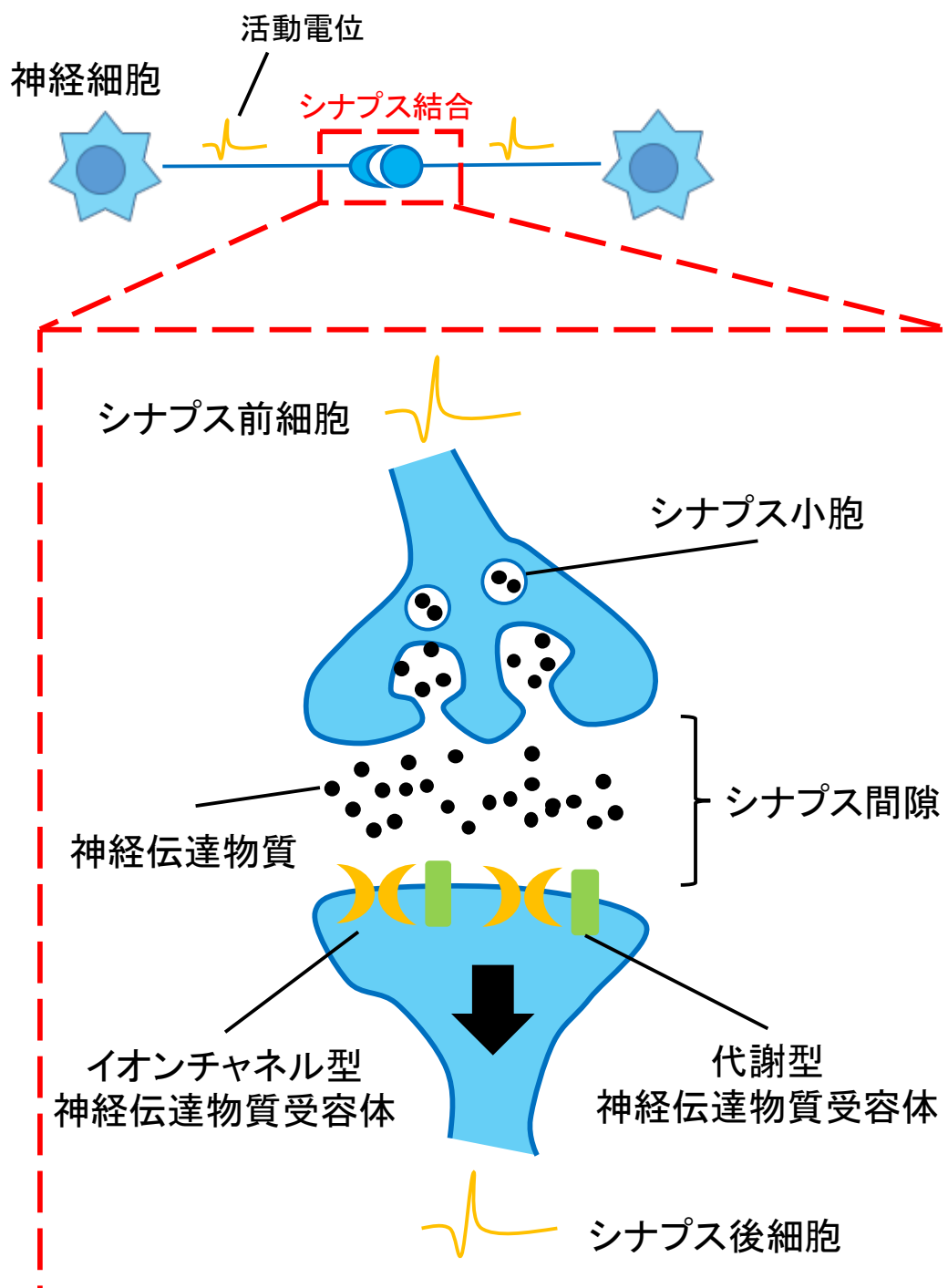


図 1.2 シナプス伝達の模式図

シナプスを介した電気信号の伝達に関して、その伝達効率が柔軟に変更される性質をシナプス可塑性という。シナプス可塑性の内、最も良く研究されているのは、単一神経細胞への高頻度刺激によりシナプス伝達効率が增大する長期増強現象 (Long-Term Potentiation, LTP) [3] である。LTP は記憶の細胞生物学的基盤として神経科学の重要なテーマの一つとなっている。LTP の発生には NMDAR の関与が重要であると報告されている [4]。NMDAR はカルシウムイオンチャネルを持つが、静止膜電位付近ではマグネシウムイオンがイオン

チャンネルをブロックしているため不活性であることが知られている。このマグネシウムイオンはシナプス後細胞が強く脱分極することで外れ、このときグルタミン酸が NMDAR の受容部位に結合するとカルシウムイオンチャンネルが開孔し、カルシウムイオンが神経細胞内に流入する。カルシウムイオンは、カルシウム-カルモジュリン依存性タンパク質キナーゼ II (Ca^{2+} / calmodulin-dependent protein kinase II, CaMK II) などのタンパク質リン酸化酵素を活性化し、細胞内情報伝達系を駆動する。その結果、神経伝達物質受容体のリン酸化や機能タンパク質の合成が誘導される。これによりシナプス前細胞からの神経伝達物質の放出量の増加や、神経伝達物質受容体の信号伝達効率の増加が誘導され、結果として LTP が誘導される [5]。

このように、神経回路網では個々の神経細胞で発生する電気化学的な現象が集合して多様なパターンを持つ時空間ダイナミクスが形成される。また、神経回路網は外界からの入力に対して一定範囲のパターンを出力する。この応答出力パターンは動的に生成されるが、シナプス可塑性により、ある入力に対しては特定のパターンが出力されやすいよう神経回路網の物理構造が固定されると考えられる。この一連の過程が学習である。従って、神経回路網の神経電気活動が形成する時空間ダイナミクスに着目し、その性質を解明することが、脳情報処理を理解するために重要であると考えられる。

1.2 神経活動の計測手法と神経回路網のダイナミクス

脳の高次機能は、シナプスを介した電気信号の伝達効率が調整されることにより実現されていると考えられる。そのため、神経回路網が発する神経活動を時系列活動としてモニタリングし、脳の情報処理機構を解明する電気生理学的な研究が展開されている。

脳の情報処理は神経回路網を構成する神経細胞全体が協調して動作することで発現しているため、その解明には生体の脳全体を解析する必要がある。しかしながら、脳は非常に複雑な器官であり、生体を丸ごと扱う *In Vivo* の実験系では解析が困難である。そこで、培養した神経回路網を局所的な脳の情報処理機構のモデルとして用いる *In Vitro* の実験系による研究が多数報告されている。

神経細胞の培養系の一つとして生体が持つ脳の神経回路網を酵素処理等により一度分断して培養する分散培養が挙げられる。分散播種された神経細胞は神経突起を伸長し、互いにシナプスを形成して培養環境下でも神経回路網を再構成する。培養された神経回路網において、外部からの入力が無い状態でも自発的な電気活動（自発性神経活動）が発生することが知られている [6]。また、電極から電流刺激を印加し、誘発応答を計測することが出来る。

神経回路網における情報処理を解明するためには、神経回路網が発する電気活動を単一神経細胞レベル、神経回路網レベルの両面から解析する事が重要である。単一神経細胞の膜電位変化を記録する手法としては、細胞内電位記録法、パッチクランプ法の一手法であるホールセル記録法が代表的である。これらは、神経細胞内外のイオンの流入・流出によって発生する電位変化を計測する手法である。細胞内電位記録法は電極を刺入する侵襲的な計測法で

あるため、刺入の影響が少ない大きな細胞体からは安定した膜電位の記録が可能であるが、電極と細胞膜間の絶縁を保つことが難しく、長期的に安定した膜電位計測は難しい。ホールセル記録法では深々と電極を刺入せず、細胞膜に密着させてギガオーム以上のシールを形成した上で細胞膜に小孔を開けるため、電流の漏れが少なく、微小な細胞でも S/N の良い膜電位・膜電流計測が可能である。

一方、神経回路網は多数の神経細胞が互いに電気信号を伝達することで、時間的、空間的な広がりを持った電気活動を発生する。従って、脳の情報処理を解明する為には、神経回路網から発生する活動を多点から同時に計測する手法も大変重要である。一例として、イオンイメージングによる活動計測が挙げられる [7-10]。活動電位が発生すると、シナプス後細胞膜上の電位依存性カルシウムチャンネル等から細胞外のカルシウムイオンが細胞内に流入する。細胞外から AM 体のカルシウム感受性色素を細胞内に非侵襲的に負荷することで、神経細胞内に流入したカルシウムイオンを可視化して神経細胞内のカルシウムイオン濃度変動を計測する手法をカルシウムイメージングという。池谷らは大脳皮質のスライス培養標本に対して、カルシウムイメージングを行い、神経回路網を構成する数 100~数 1000 もの神経細胞から自発性神経活動を計測し、その時空間パターンを解析した。計測した自発性神経活動からは、同期的でかつ繰り返しのパターンを持つスパイク列が得られたが、このスパイク列をコンピュータ上でランダムにシャッフルしたところ、繰り返しパターン数が大きく減少した [9]。このことから、神経細胞の自発性神経活動はランダムではなく何らかの再現性のあるパターンを持つことが示唆された。このようにカルシウムイメージングによる解析は、高空間分解能での計測が可能であるため、神経回路網の性質を解析する目的に適している。しかしながら、蛍光色素が退色するため長時間の活動計測が困難であるという問題がある。また、電気活動を直接計測しておらず、かつ時間分解能が低いため、神経回路網ダイナミクスを直接解析するには不適である (図 1.3)。

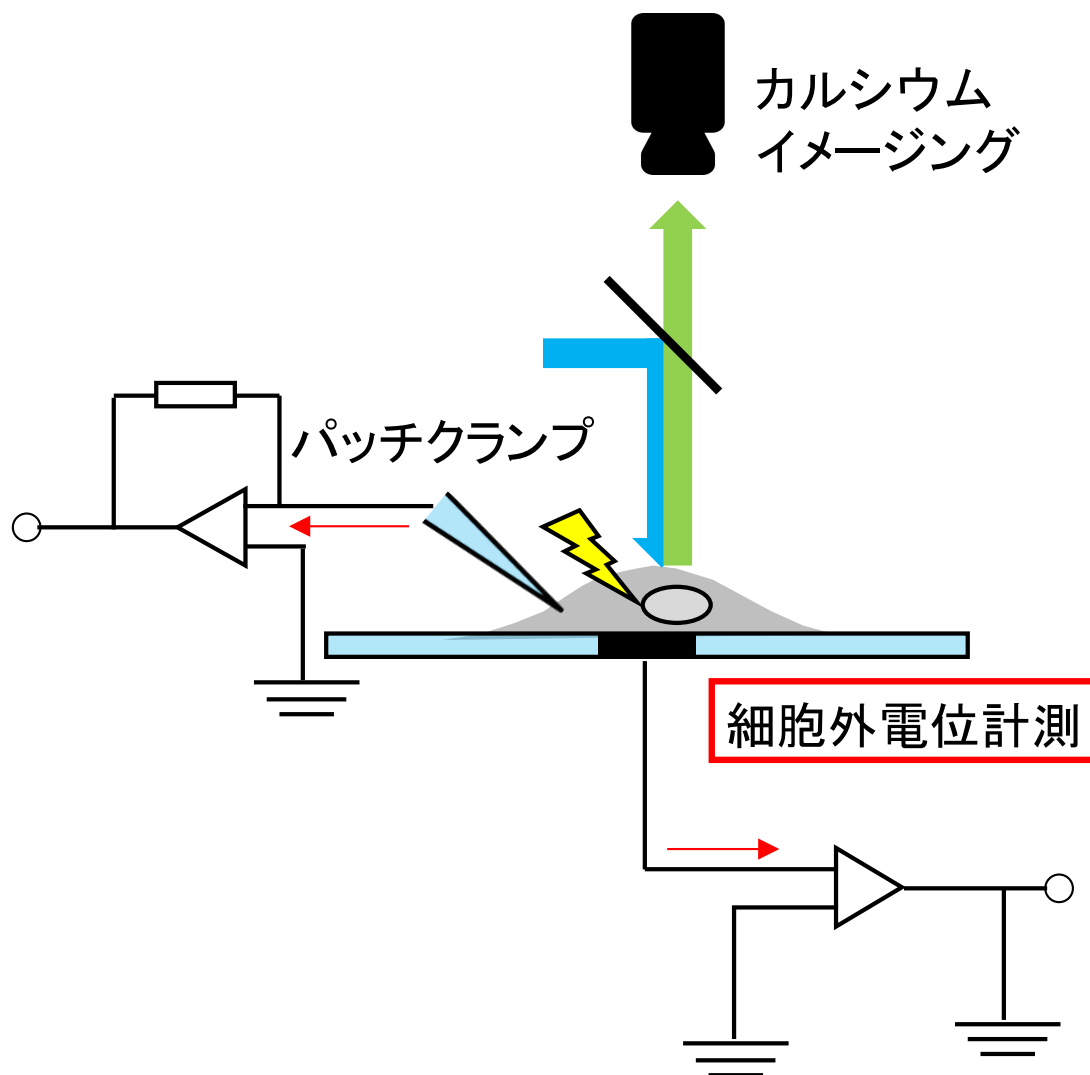


図 1.3 神経活動を計測する手法.

そこで、ガラス底面基板に微小電極を多数設置した培養基板（多電極アレイ，Multi Electrodes Array, MEA）による神経回路網電気活動の多点計測は大変有効である。1977年，グロスらは MEA でカタツムリの神経節から神経活動の検出に成功し，これが世界初の成功例となった [11]。パインらは分散培養したラット脊髄神経回路網から初めて神経活動を検出している [12]。1989年にはほぼ現在一般的に使われている 60 電極以上が設置された MEA が完成した [13]。MEA で計測された細胞外電位の神経活動は，パッチクランプ法で計測した細胞内電位で計測した神経活動と同期していることが確認された [7]。

MEA は底面基板上に神経細胞を分散播種し，培養条件下で再構成された神経回路網の神経電気活動を計測する研究 [14–17]，急性スライス標本の神経電気活動の計測 [18] 等に用いられている。MEA を用いることで神経回路網が発する自発性神経活動を長期に安定して計測することが可能である [6, 19]，また底面に設置された電極に刺激電流を印加することで刺激入力に依存した特徴的な神経活動である誘発応答を計測することが可能である。MEA 上で培養された分散培養神経回路網においてもシナプス可塑性に関する研究が多く行われてい

る。例を挙げると、神保らは MEA 上で培養された大脳皮質の神経回路網に対しテタヌス刺激 (10 - 100 Hz) を加えることでシナプス可塑性を誘導した [20]。他にも、刺激入力に依存した可塑性 [21] や、神経回路網に繰り返し電流刺激を印加することで、反響的な応答を示すように可塑的变化が起こること [22] 等が報告されている。また、海馬と大脳皮質という異なる部位の分散培養神経回路網においても、神経回路網の成熟過程で同様の自発性神経活動変化が起こることが明らかとなっている [23]。培養した神経回路網を使用する利点は、MEA による電流刺激の印加が簡便である以外にも、神経回路網の外部環境を容易に変更して電気活動を計測することが可能な点にある。村田らは MEA 上で培養した神経回路網をマグネシウムイオン不含溶液に短時間暴露し、NMDAR のブロックを強制的に外すことでシナプス伝達効率を増強させた。これにより神経回路網における自発性神経活動パターンが変化し、神経細胞間の同期性が 1 日以上長期にわたって上昇することを発見した [24]。これらの結果は、培養された神経回路網においてもシナプス可塑性が発生し、これが神経活動パターンを変更することを示唆している。このような解析は、MEA が非侵襲的な計測手法であり、長期にわたって神経電気活動を解析できることで可能になった。また、清原らは、MEA 上で培養した海馬由来の分散培養神経回路網において、培養日数 (Days in Vitro, DIV) 30 - 40 日の神経回路網で自発性神経活動頻度が上昇し、かつ活動パターンが同期的なバースト活動 (High Frequency Burst, HFB) となり、その後は自発性神経活動の領域間の同期性が強くなることを示した [25]。チアッパローネらは、大脳皮質由来の分散培養神経回路網を MEA 上で 5 週間にわたって培養し、培養中の神経回路網の自発性神経活動の発展的变化を解析した。その結果、神経回路網は 2 つのフェイズに分かれて成熟しており、培養 2 週間まではシナプスの機能的な結合が形成され、培養 5 週間までに回路網全体に活動が広がる同期的なバースト活動が発生することを報告した [6]。また、伊東らは大脳皮質由来の神経回路網を MEA 上で分散培養し、自発性神経活動の同期的なバースト活動には培養初期の神経細胞密度が大きく関与することを報告している [19]。培養中の神経回路網の活動を安定して長期間計測出来ることも MEA を用いる利点の一つである。

神経回路網は多数の神経細胞が互いにシナプスを形成して構成する、空間的な広がりを持ったネットワークである。脳の情報処理において個々の神経細胞は独立した活動をしているわけではなく、神経細胞集団が必要に応じて相互作用することで機能を発揮する。そこで、MEA を用いて神経細胞集団の同期性に着目した研究が展開されている [15-18, 26-28]。特に、ベグスらは MEA で大脳皮質急性スライス標本の神経電気活動を計測し、同期的な神経電気活動の周期と持続時間がべき乗に従うことを報告した。このことは、神経電気活動に関与する細胞数とその細胞集団のサイズが階層的に決定されていることを示す [18, 26]。

MEA を用いた細胞外電位多点計測法は、非侵襲的であり長期的に安定した神経活動を計測することが可能であるが、計測されているのは電極周辺の局所電位である。従来の MEA では空間分解能が低いため、活動している神経細胞の詳細な識別と網羅的な計測が困難である。そこで、近年では CMOS イメージセンサ技術を用いて最大で 20000 点以上もの電極から同時に細胞外電位を記録することに成功している [29-31]。CMOS MEA を用いる利点として

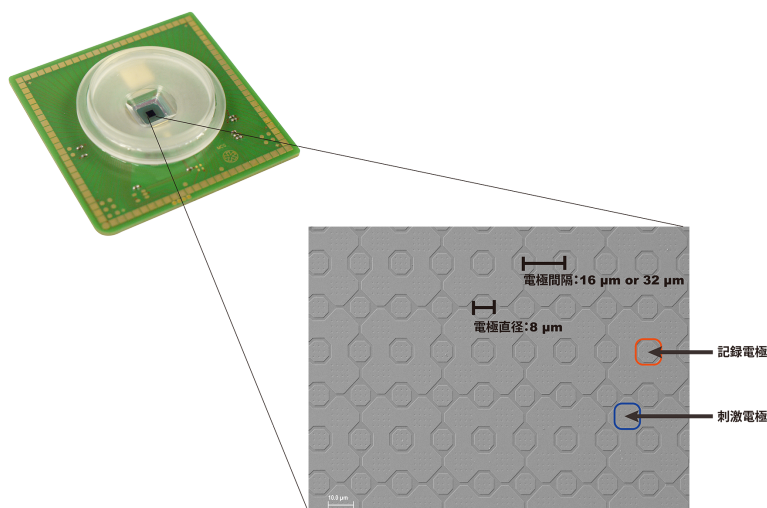


図 1.4 CMOS イメージセンサ技術を用いた MEA の一例 (マルチチャンネルシステム社 HP より)

は、高空間分解能であることから神経活動の詳細な伝搬経路推定が可能になるという点にある (図 1.4)。

CMOS MEA は高空間分解能での神経電気活動計測が可能な有用な系であるが、消耗品が高価であること、取得されたデータが数 1000 以上の非常に高次元となり解析が困難であること等の理由からまだ一般的な手法であるとは言えない。従って、現在でも従来型の MEA を用いて神経電気活動を計測する研究は盛んに行われている [32–34]。本研究においても従来型の 64 個の微小平面電極が設置された MEA を用いている。

1.3 神経回路網の電気活動と細胞外ブドウ糖との関係性

ヒトの全体重における脳の比率が 2 % である [35] ことに対し、脳におけるブドウ糖消費量が体全体で消費するブドウ糖量の 25 % を占めていることが判明している [36]。このことから、神経回路網は極めて高いエネルギー消費を行なっていると言え、細胞外のエネルギーレベルと神経電気活動には深い関係性があると考えられる。

細胞外のブドウ糖は神経細胞に限らず、全ての細胞の生命活動の源であり、体内においてはその濃度は精密に制御されている。例えば、中脳黒質網様部 (Substantia Nigra pars reticulata, SNr) には、抑制性神経伝達物質である γ -アミノ酪酸 (Gamma-Aminobutyric Acid, GABA) 作動性神経細胞が、酸素やブドウ糖の脳内における濃度低下を感知して活動頻度を変化させることが知られており、低酸素や虚血時のダメージから脳を保護することが報告されている [37,38]。SNr には、細胞内の ATP 量に依存して開閉を制御される ATP 感受性カリウムチャネル (KATP) が多量に発現し、細胞外ブドウ糖濃度によりその開孔確率が制御されている。また、KATP は海馬にも存在することが報告されていることから、海馬領域でも細胞外ブドウ糖濃度を感知している可能性が示唆される [39,40]。ブドウ糖濃度調整と関係が無く、短期記憶の生成に関係するとされる海馬領域において、細胞外ブドウ糖濃度と神

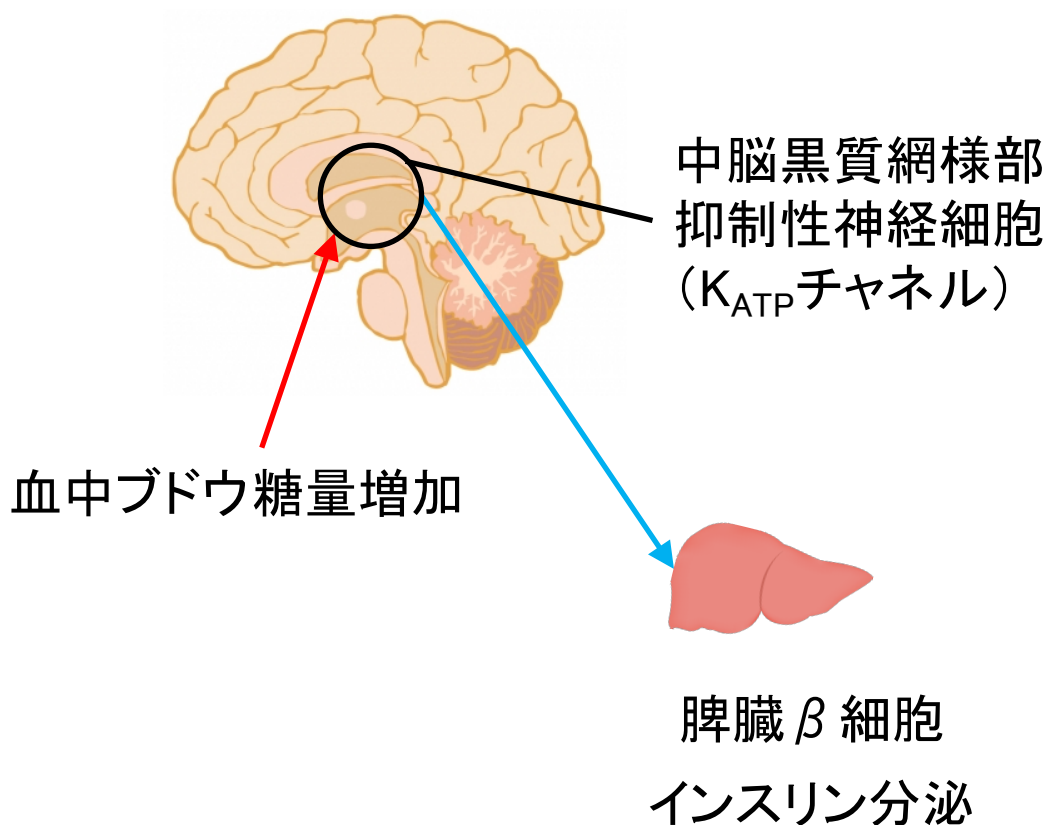


図 1.5 K_{ATP} チャネルの恒常性維持機構についての概要.

経電気活動との間に関係性があれば興味深いと言える。神経細胞と血中ブドウ糖の関係性は報告されているが [36–38], これらは血中ブドウ糖濃度 (血糖値) を感知することに特化したシステムの中での働きであり, 生体の恒常性を維持するための特別な機能であって, 神経回路網の一般的な性質という訳では無い (図 1.5)。

そこで, 本研究では, 脳情報処理の基盤となる神経回路網が細胞外から取り込んだブドウ糖を代謝して得たエネルギーと神経回路網の電気活動との一般的な関係性を解明することを目的として, MEA 上で培養した神経回路網の電気活動を解析した。本研究で用いた培養神経回路網においては, 外部からの入力無くとも自律的な電気活動が発生し, 特定の電流刺激を印加することで刺激箇所に依存した誘発電気活動 (誘発応答) が発生する [41]。本研究では, 培養された神経回路網の神経電気活動と細胞外ブドウ糖濃度との関係性を解析するための手法として, 細胞外ブドウ糖濃度を変更した場合に生じる神経電気活動の活動頻度, 及び空間活動パターンの変化を解析した。

2 章では, 本研究で用いたラット胎児大脳海馬由来神経回路網の神経活動の特性を確認した。培養神経回路網は培養日数依存的に自発性神経活動パターンが複雑化することが知られている。活動パターンの複雑化に伴い, 十分に培養した神経回路網が要求するエネルギー量が増加する可能性がある。そこで, 2 章においては培養神経回路網において細胞外ブドウ糖欠乏状態で自発性神経活動を維持しうる時間を解析した結果を報告した。培養系において, 細

胞外ブドウ糖を欠乏させた状態では、約 12 時間で神経活動頻度が約 3 割まで減少することを示した。

3 章では、培養神経回路網の自発性神経活動頻度と細胞外ブドウ糖濃度の関係性を解析した。細胞外ブドウ糖濃度が培養時のブドウ糖濃度までは自発性神経活動頻度は細胞外ブドウ糖濃度の上昇に伴って増加し、それ以上では自発性神経活動頻度は翻って減少した。このことから培養時のブドウ糖濃度が神経回路網においての最適な細胞外ブドウ糖濃度である可能性が示唆された。加えて、培養時のブドウ糖濃度を変更して培養した神経回路網の細胞外ブドウ糖に対する至適濃度がシフトしたことから、培養神経回路網は培養時のブドウ糖濃度に最適化されている可能性を示唆した。

そこで、培養時のブドウ糖濃度を変えて神経回路網の形成過程における自発性神経活動を解析した。通常のブドウ糖濃度で培養した神経回路網と高ブドウ糖濃度下で培養した神経回路網は培養日数に依存して自発性神経活動頻度、単一電極のバースト頻度、同期バースト頻度共に有意な差は存在しなかった。一方、低ブドウ糖濃度で培養した神経回路網では、自発性神経活動頻度、及び単一電極のバースト頻度が培養日数に依存して増加したが、通常の条件で培養した神経回路網と比して有意に低かった。この現象は、低ブドウ糖濃度で培養したことにより、神経回路網を構成する神経細胞数が低下したことを示唆する。一方、同期バースト活動頻度には有意な低下がなかったことから、分散播種された神経細胞は外部環境や神経細胞密度に適応し、同期的な活動を維持するよう回路網を形成することが示唆された。

3 章までは自発性神経活動と細胞外ブドウ糖の関係性について議論した。MEA を用いることで、神経回路網に電流刺激を印加し、誘発応答を計測することが可能である。そこで 4 章では、培養神経回路網の誘発応答パターンの識別を試みた。培養神経回路網は自発性神経活動と、入力された刺激に特有の誘発応答とを発生する。従来知見では、誘発応答が有意な神経活動であり、自発性神経活動は神経回路網においては雑音として扱う傾向があった。しかしながら、近年では自発性神経活動が脳の情報処理に積極的に関与していることを示す結果が報告されている [9,42–44]。本研究では、自己組織化マップを用いて神経活動パターンを識別した。その結果、神経回路網が発する誘発応答は自発性神経活動が有する豊富な活動パターンから刺激入力により再現よく特定のパターンが引き出された結果である可能性を示した。また、細胞外ブドウ糖濃度を変化させて誘発応答を計測し、自己組織化マップを用いて神経活動パターンを識別した結果、30 mM ブドウ糖濃度条件下で自発性神経活動頻度が低くなった状態では、10 mM ブドウ糖濃度条件下と比して、自発性神経活動パターンと誘発応答パターンとの類似性が高くなることを明らかにした。

5 章では、局所的な活動パターンテンプレートを作成し、MEA 上に培養された神経回路網の誘発応答の空間的な伝播を解析した。結果として、刺激電流の影響は印加した直後 20-40 ミリ秒程度で伝播し、その後は自発性神経活動などの入力と電流刺激の影響が混在した特徴的な神経電気活動が観察されることを明らかにした。

また、細胞外ブドウ糖濃度を変化させて誘発応答を計測し、誘発応答の空間的な伝播を解析した。結果として、10 mM ブドウ糖濃度下と比して 30 mM ブドウ糖下で自発性神経活動

頻度が低くなった影響により、刺激電極周辺では電流刺激による直接的な誘発応答が発生しにくくなり、刺激により間接的に誘導された自発性神経活動と類似した活動が刺激電極に対して遠位の領域で発現することが明らかとなった。以上の結果から、神経回路網の自発性神経活動は細胞外ブドウ糖濃度により変動し、その原因は神経間の伝達効率の減少である事が示唆された。また、この神経伝達の変化は、神経活動パターンに影響を与え、自発性神経活動と誘発応答との類似性にも関与する可能性が示唆された。一定の範囲内では細胞外ブドウ糖濃度の増加に依存して神経電気細胞外ブドウ糖濃度の増加とともに、脳全体の神経電気活動が活性化する方向に向かう可能性が示された。また、自発性神経活動が最も活性化する細胞外ブドウ糖濃度は培養条件に依存し、最適な細胞外ブドウ糖濃度を恒常性として維持する傾向が確認された。これらは、生物の生存と神経電気活動を結び付ける仲介的な条件として細胞外ブドウ糖濃度が重要であるという仮定と矛盾しない結果であると考えられる。

第 2 章

培養神経回路網の生物学的特徴

2.1 序論

記憶や学習を始めとする脳高次機能の解明には、神経回路網における電気活動（神経電気活動）が表現する時間的、かつ空間的なパターン（時空間パターン）を解析することが非常に重要である。神経電気活動の時空間パターンは、神経回路網内を伝播する活動電位により形成されている [1].

生体が本来持つ神経回路網を一度解離分散し、培養皿上に播種して培養する手法を分散培養という。分散培養された神経細胞は互いに神経突起を伸長し、シナプス結合を形成することで神経回路網を自律的に再構築する。特に MEA 上に分散培養し、再形成された神経回路網は広い範囲から神経電気活動を同時に計測出来ることから、脳情報処理の局所的な生物モデルとして大変有用である [15–17]。本研究では、ラット胎児大脳海馬由来の神経細胞を底面に 64 個の微小平面電極を設置した培養皿である MED プローブ [45] 上に分散培養した。

分散培養された神経回路網は、DIV10 前後より外部からの入力無くとも自律的に電気活動を発生することが知られている [6, 19]。この電気活動は自発性神経活動と呼ばれ、従来は神経回路網が発する雑音として扱われる傾向があったが、近年の知見では自発性神経活動が特定の時空間パターンを形成していることが見いだされており [9, 42–44]、脳の情報処理において自発性神経活動の持つ役割に注目が集まっている。培養神経回路網の自発性神経活動は、培養日数の経過に伴って活動が高頻度化し、複雑な活動パターンを形成することが報告されている [6, 19]。自発性神経活動が脳の情報処理に利用されているとすると、回路網の形成及び、成熟による活動パターンの変化は脳の情報処理に大きく関与していることが考えられる。

自発性神経活動は、神経回路網の構成要素である神経細胞から発生する活動電位が根源である。神経細胞は、通常 -70 mV という深い静止膜電位を維持し、細胞外からの急激なナトリウムイオンの流入による脱分極と、脱分極後にカリウムイオンが細胞外に流出することによる静止膜電位への復帰により活動電位が発生する。神経細胞の活動電位は、細胞膜内外のナトリウムイオンとカリウムイオンの濃度勾配の平衡が崩れることによって生じるが、濃度勾配はアデノシン三リン酸（Adenosine triphosphate, ATP）を加水分解して得られるエネルギーを用いた Na^+/K^+ ポンプによる能動輸送によって維持されている [46, 47]。シナプス前終末には酸素呼吸によって ATP の生成を行う多くのミトコンドリアが集積されていることが報告されており、シナプス前細胞から神経伝達物質を放出するためにも多量のエネルギーを必要としていることが知られている（図 2.1）。

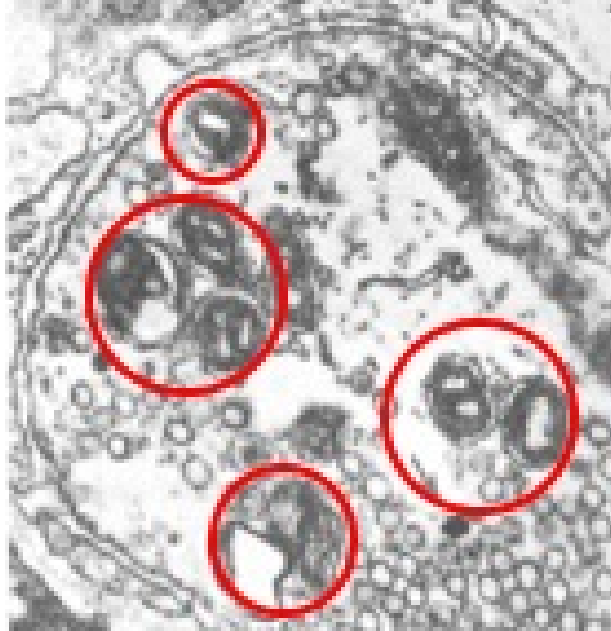


図 2.1 シナプス前終末の透過像 (文献 [1] を改変). 赤丸はミトコンドリアを示す.

また、生体が消費する総エネルギー量の約 25% が脳で使用されていることが報告されている [36]. ヒトの全体重における脳の重量の比率が 2% である [48] ことから、脳は極めて高いエネルギー消費を行っていると言える. このことから、脳の神経細胞は静止膜電位の維持とその活動電位の発生に多くのエネルギーを必要とすることが明らかとなっている.

他の細胞と同様に、神経細胞も細胞外からブドウ糖を取り込み、分解することで ATP を合成している. また、ヒトの血中ブドウ糖濃度 (血糖値) は 70 - 180 mg/dl (5.5 mM から 10 mM) の間で厳密に制御されており、ラットの場合でも約 150 mg/dl (約 8 mM) と概ね同じ値である [49].

生体の脳神経回路網には、神経細胞数の 10 倍以上ものグリア細胞が存在する [1]. グリア細胞はアストロサイト、オリゴデンドロサイト、ミクログリアの総称でありそれぞれ機能は異なる. 特にアストロサイトにおいては、取り込んだブドウ糖をグリコーゲンとして保存し、細胞外ブドウ糖が欠乏した際にエネルギー源として供給することが報告されており [1], エネルギー消費と大きく関与する細胞である事が知られている. 生体と比してグリア細胞の少ない培養系においては、細胞外のブドウ糖が不足した場合の栄養サポートが不十分であると考えられている. そこで、神経細胞の培養に用いられている培養液はブドウ糖濃度が 20 mM 程度の高ブドウ糖濃度の培養液が一般的に用いられている [50–52]. これは電気活動を維持するために多量の代謝エネルギーが要求される神経細胞においては、細胞外のブドウ糖濃度を生体の血中ブドウ糖濃度よりも高濃度に維持しなければ、栄養サポートの少ない培養系では電気活動を維持することが困難であるためと考えられる. また、神経細胞は増殖能を持たないため、培養中に細胞外ブドウ糖量が不足すると培養日数が経過するごとに神経細胞が死滅し、神経回路網が維持出来ない可能性も考えられる. 以上のことから、生理学的なブドウ糖濃度よりも高濃度で神経回路網を培養する必要があると言える.

本研究では、一般的な培養条件で培養したラット胎児大脑海馬由来の神経回路網を MEA 上に培養し、自発性神経活動を計測することで培養日数に依存した自発性神経活動パターン変化を解析した。また、一般的な条件で培養された神経回路網の自発性神経活動を細胞外ブドウ糖を欠乏させた状態で長期的に計測し、神経回路網が細胞外ブドウ糖欠乏状態で自発性神経活動を維持しうる時間を解析した。結果として、本研究で用いた MEA 上に分散培養されたラット胎児大脑海馬由来の神経回路網においては、培養日数の経過に依存して自発性神経活動頻度が増加し、その神経電気活動パターンが複雑化することを明らかにした。また、ブドウ糖欠乏時の自発性神経活動頻度は緩やかに減少し、ブドウ糖欠乏条件下 9 時間程度で約 50 %、15 時間程度で約 30% に減少した。これらの結果から、培養液の生体条件より高いブドウ糖濃度は活発な自発性神経活動の維持に必要な十分な条件であることが明らかとなった。

2.2 実験材料・手法

2.2.1 ラット胎児大脑海馬由来神経細胞の初代分散培養

本研究における全ての動物実験は、関西学院大学動物実験管理規定に則り、動物実験委員会の承認の下に行った。

本研究では実験材料としてラット胎児大脑海馬由来初代分散培養を用いた [25, 53, 54]。分散培養とは、酵素処理によって神経回路網のシナプス結合を一旦分離した後に培養するものである。分散培養系においては元来の神経接続は一旦分断されるが、その後神経細胞は培養日数の経過に伴って再度神経突起を伸長し、相互に再接続して回路網を構築する。初代培養とは、動物から採取した細胞を培養皿に播種し、それ以降の継代操作を加えず培養する手法である。これに対して、培養を継続しながら細胞数を増殖させて複数回分散・解離し直して再度播種し、培養する手法を継代培養という。また、本研究では培養皿として MED プローブを用いた（アルファメドサイエンティフィック）を用いた。MED プローブは、ガラス底面基板に酸化インジウムスズ（Indium Tin Oxide, ITO）で配線を施し、その終端部に 50 μm 四方の白金黒微小平面電極が設置された培養基板である（図 2.2）。

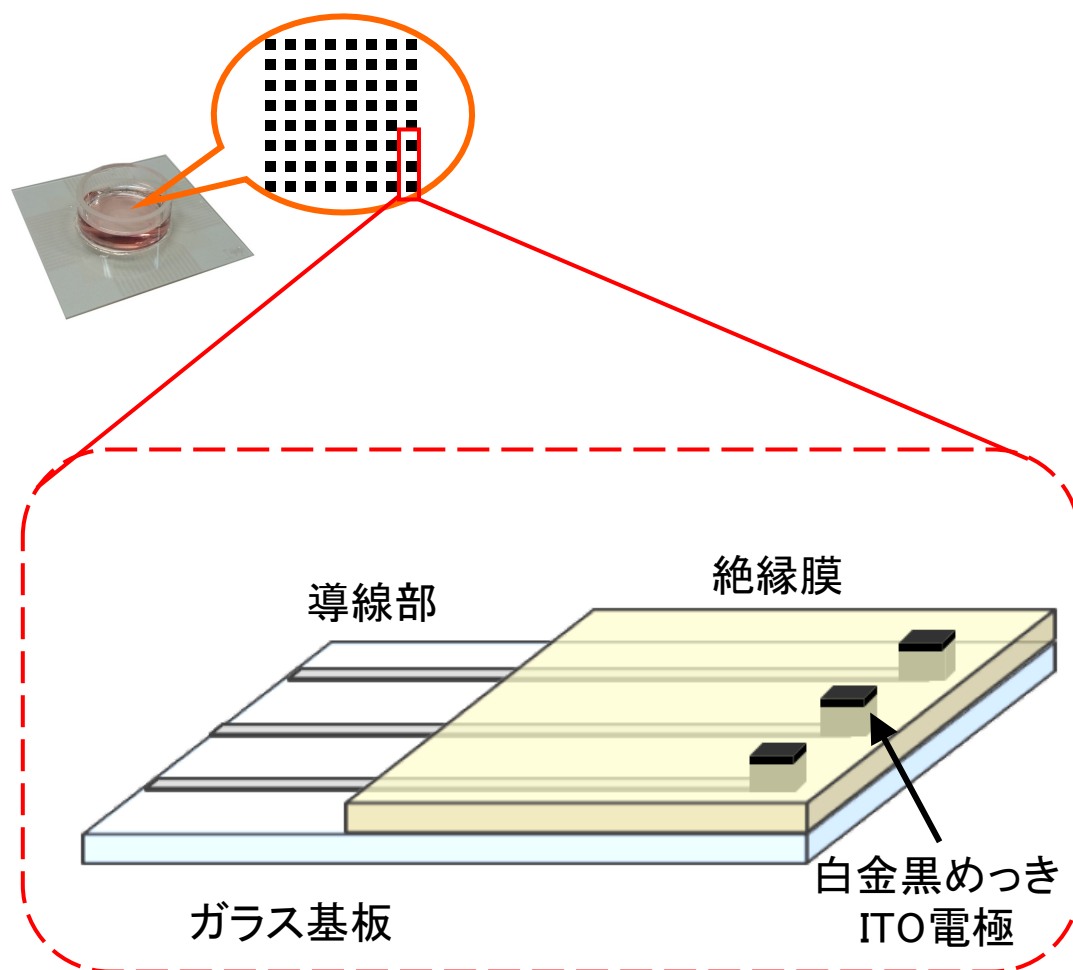


図 2.2 MED プローブの模式図.

本研究では、妊娠 18 日のウイスターラット (JCL-Wistar, 日本クレア) から摘出した胚齢 18 日 (Embryonic day18, E18) の胎児の大脳海馬領域を用いた。胚齢 18 日の胎児を用いた理由は、細胞の分化が終了し、予定運命が決定している段階であり、なおかつ神経突起の伸長が未発達なことから、分散・解離による神経細胞やグリア細胞の損傷が少ないためである。加えて、海馬領域は培養系で多くの知見が蓄積されている部位であり、回路網の形成過程や特性がよく知られている。培養手法を以下に述べる。最初に、妊娠 18 日の親ラットをイソフルラン (インターベット) 麻酔下で安楽死させ、親ラットから胎児を取り出した。取り出された胚齢 18 日のラット胎児から氷温麻酔下で大脳領域を摘出し、摘出された大脳から海馬領域を切除した。切除した海馬領域は 35 mm プラスチックディッシュ (イワキ) 内の氷温下の培養液中に保存し、この作業を全胎児分繰り返した。切り出した海馬領域はスポイトで培養液と共に 15 mL 遠沈管 (イワキ) に移し、遠沈管から培養液のみを取り除いた。続いて、スポイトを用いて 10 mM のブドウ糖 (和光純薬) を加えた Ca^{2+} 、 Mg^{2+} 不含リン酸バッファー (Phosphate buffered saline⁻, PBS⁻, ニッサイ) で 3 回洗浄し、最終濃度 0.175% のトリプシン-EDTA (サーモフィッシャーサイエンティフィック) 溶液を加えて 37 °C の恒温槽内で 15 分間震盪・攪拌し、酵素処理を行った。酵素処理によって、細胞間を結合している接着タン

パクが分解され、細胞が解離しやすくなる。震盪後、血清を添加した培養液で 3 回洗浄して酵素処理を終了した。酵素処理終了後、スポイトで 10 回程度ピペッティングすることにより細胞を解離し、細胞懸濁液を作成した。改良ノイバウエル型血球計測盤（エルマ、図 2.3）に細胞懸濁液を 7 μl 入れ、細胞数を計数した。

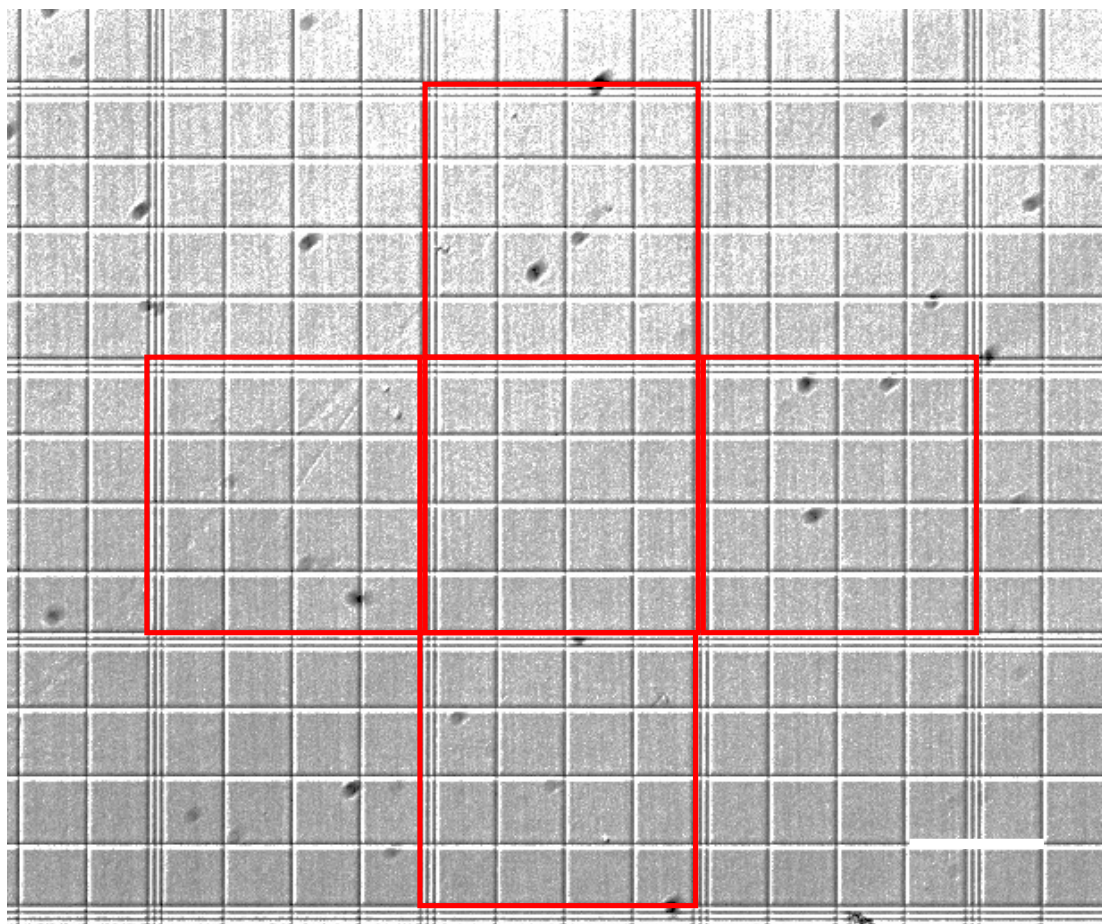


図 2.3 改良のイバウエル型血球計測版の透過像。赤枠で示した部分の細胞数を計数した。スケールバーは 100 μm 。

細胞外電位を精度良く計測するためには、MED プロブのガラス基板表面への神経細胞の接着が非常に重要である。そこで、培養前に MED プロブに以下の前処理を施した。初回使用以外の MED プロブは使用前に漂白剤で数 10 秒間浸し、付着したタンパク質などを洗浄した。続いて、水道水と mili-Q 水で残留する漂白剤を洗い流した後、80% エタノールに 30 分間浸透して、エタノールを取り除いて完全に乾燥させた後、20 分間紫外線ライト下で殺菌処理を行った。洗浄、殺菌後の MED プロブには細胞接着性を付加するため、予め 0.02% ポリエチレンイミン (Polyethylene imine, PEI, シグマアルドリッチ) 溶液により 24 時間以上コートした。PEI 溶液を除去し、mili-Q 水で 3 回洗浄することで MED プロブの前処理を終了した。

前処理後の MED プロブ中央に内径 7 mm (リング内面積 38.5 mm^2) のクローニングリング (イワキ) を静置し、電極が集積されたエリア上のみ培養エリアを制限した。これは

MED プローブの外縁部に配置された参照電極に細胞が付着すると電位の基準点が揺らぎ、正常な電位計測ができないためである。通常の培養手法では、クローニングリング内に細胞数が 30 万個、細胞播種時の細胞密度が 7800 cells/mm^2 となるよう細胞を播種した (図 2.4)。

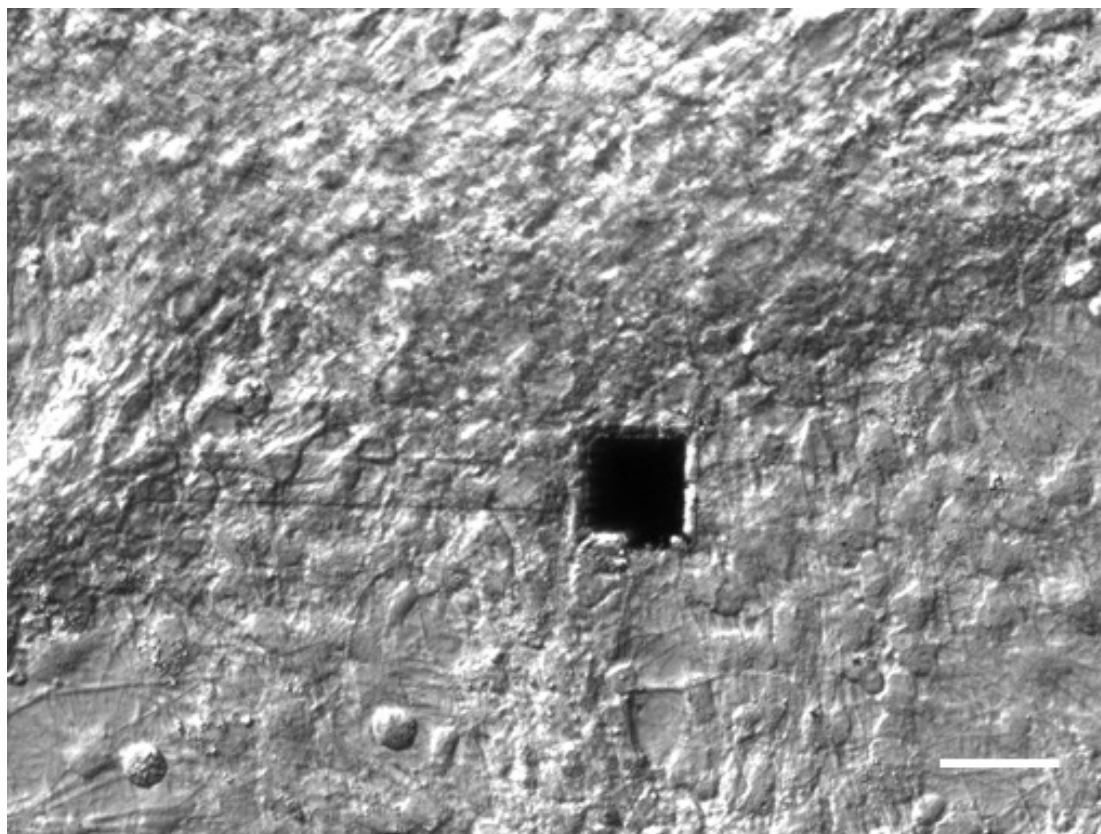


図 2.4 MED プローブに培養されたラット胎児海馬由来神経回路網の一例 (E18DIV29)。■は微小平面電極を示す。スケールバーは $50 \mu\text{m}$ を示す。

神経回路網の培養には、25% の双極性イオン緩衝剤 (HEPES) を含有したダルベッコ変法イーグル培地 (Dulbecco's Modified Eagle Medium, DMEM, サーモフィッシャーサイエンティフィック) とハム F-12 を 1:1 で混合した培地 (DMEM/F12, サーモフィッシャーサイエンティフィック) を基礎培地とし、 $5 \mu\text{g/ml}$ インシュリン (シグマアルドリッチ), 100 units/ml - $100 \mu\text{g/ml}$ ペニシリン-ストレプトマイシン (サーモフィッシャーサイエンティフィック), 5% ウシ胎児血清 (Fatal Bovine Serum, FBS, サーモフィッシャーサイエンティフィック), 5% 馬血清 (Horse Serum, HS, サーモフィッシャーサイエンティフィック) を添加したものを完全培地として用いた。インシュリンは、細胞のブドウ糖の取り込みを促進する酵素である。ペニシリン-ストレプトマイシンは抗生物質であり、培養中の雑菌などの繁殖を防止する。FBS は細胞の増殖・成長に必要な蛋白質を含み、HS は細胞生存や安定した成長に必要なものである。DMEM/F12 は神経細胞の初代培養において一般的な培養液であり、含有するブドウ糖濃度は 17.5 mM である。細胞は 5% CO_2 - 95% 大気、 37°C の CO_2 インキュベータ内で湿度 100% で培養した。培養液が蒸発することによる塩濃度の上昇、代謝物質による pH 変化の影響を最小限に抑えるため、完全培地は 2 日毎に半量を交換した。血清を用いないニュー

ロベール培地に添加物を加えた培養液を用いた無血清培養や、Ara-C 等の細胞増殖阻害剤を添加して細胞増殖作用があるグリア細胞を神経回路網から除去した培養系を用いた実験例も多く報告されているが、グリア細胞は神経回路網の情報処理に積極的に関与したり、細胞外のエネルギー源となるブドウ糖を貯蔵する機能を持っていたりすることから、グリア細胞除去による細胞外電位への影響が皆無とは考え難い。従って本研究ではグリア細胞を除去せずに神経回路網を培養した。

2.2.2 細胞外電位多点計測システム

MED プローブに培養した神経回路網の細胞外電位の計測には細胞外電位多点計測システム (MED64 システム, アルファメドサイエンティフィック) を使用した。MED64 システムは、MED プローブ、MED プローブの端子配線を信号線に結合する MED コネクタ、インテグレートッドアンプにより構成されている [45]。本研究で用いた MED プローブは底面のガラス基板上に微小平面電極を備えた培養皿であり、神経回路網の細胞外電位を非侵襲的に多数の点から同時かつ長期に渡って計測可能である。MED プローブ底面基板の中央部には 64 個の微小平面電極が 8×8 のアレイ状に配置されている。また、アレイ状の微小平面電極の外側に 4 個の参照電極が配置されており、これらを基準として細胞外電位を計測する。微小平面電極のサイズは $50 \times 50 \mu\text{m}$ 、インピーダンスは初回使用時で約 $22 \text{ k}\Omega$ である。電極間距離は数種類のタイプが市販されているが、本研究では広い範囲から神経活動を計測するため、電極間距離が最も広い $450 \mu\text{m}$ のものを用いた (図 2.5, 2.6)。

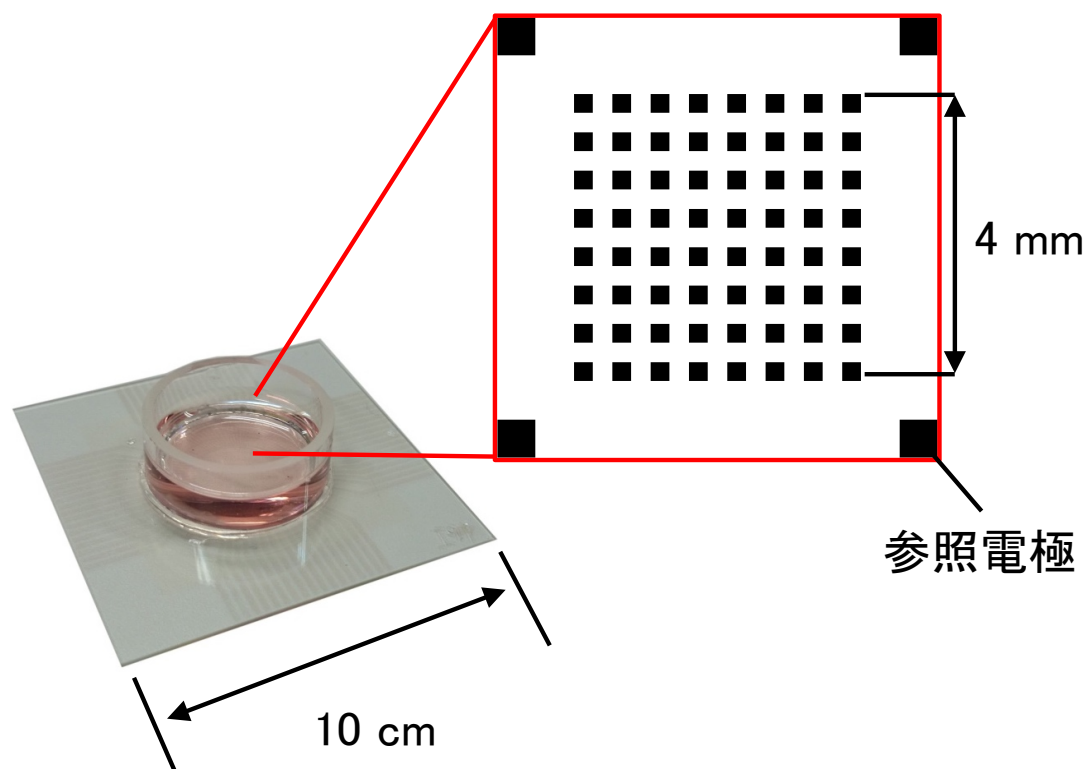


図 2.5 MED プローブ底面の電極配置の模式図.

図 2.6 MED プローブ底面の微小平面電極の微分干渉顕微鏡像. スケールバーは 200 μm .

MED プローブに設置された微小平面電極で測定された電位信号はインテグレートドアンプ (アルファメドサイエンティフィック) へ伝送されて 1000 倍に増幅された後, A/D 変換ボード (PCI-6071-E, 日本ナショナルインスツルメンツ) によってデジタル化される. デジタルデータは計測制御 PC のハードディスクに保存した (図 2.7) [45,55]. 本研究ではサンプル

リング周波数 10 kHz, 量子化ビット数 12 bit でデジタル化した。

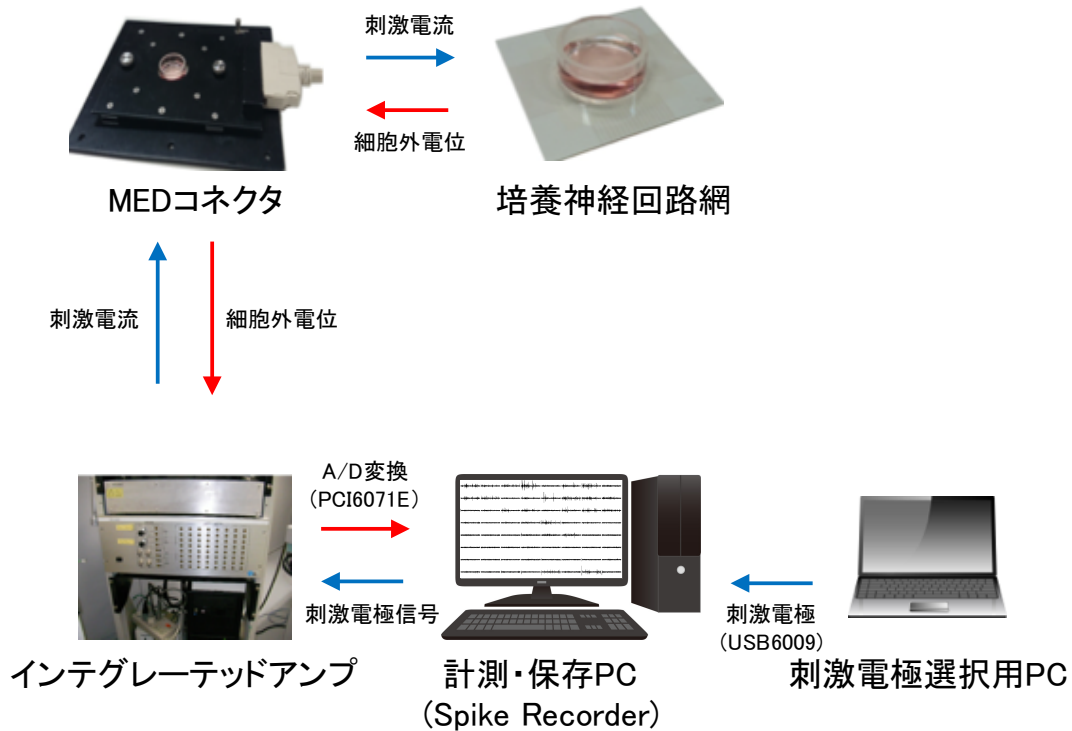


図 2.7 細胞外電位多点計測システムの構成。

また、本システムでは、MED プローブ底面の微小平面電極から刺激電流を印加することが可能である。ソフトウェアから DAQ デバイス (USB-6009, 日本ナショナルインスツルメンツ) を制御することによってデジタル信号をヘッドアンプに送信し、刺激電極を選択した。刺激電流は、D/A 変換ボード、ヘッドアンプ内のアイソレーター、MED コネクタを経由して指定された電極から印加した。刺激電極の選択・電位信号の計測・デジタルデータの保存には当研究室で LabVIEW (日本ナショナルインスツルメンツ) を用いて独自に開発したソフトウェアである Spike Recorder (SPR) を用いた。

2.2.3 電位データの解析

計測された神経回路網の細胞外電位は、電位信号データとして計測制御 PC のハードディスクに保存した。保存された細胞外電位データには電源ノイズを始めとした多量のノイズが含まれているため電位データから、活動電位に対応するスパイク状の神経電気活動 (スパイク) を検出した。

本研究で用いたスパイクの検出方法は以下の通りである。まず、保存された細胞外電位信号の移動平均との差分を求め、100 Hz - 2000 Hz のバンドパスデジタルフィルタを適用して波形の基線を平坦化した (図 2.8)。移動平均 T の各点 T_i は以下のように定義される (式

2.1).

$$T_i = \frac{P_{i-a} + P_{i-a+1} + P_{i-a+2} + \cdots + P_{i+a-1} + P_{i+a}}{2a} \quad (2.1)$$

P は 1 つの時間窓で記録された波形データ, P_i はその 1 サンプルの値であり, a は定数である. 計測された波形データとの差分 U の各点 U_i は以下のように定義される (式 2.2).

$$U_i = P_i - T_i \quad (2.2)$$

(a)



(b)



図 2.8 平坦化処理前後の細胞外電位波形の一例. (a) 計測された細胞外電位波形. (b) 平坦化処理後の細胞外電位波形. スケールバーは $100 \mu\text{V} \times 25 \text{ms}$.

続いて、閾値を設定し、それを超える振幅を持つ極値（ピーク点）を検出した。ピークの検出には LabVIEW のピーク検出関数を用いた。この関数は、デジタル化された信号データを設定した幅（最小 3 データポイント）で取り出して 2 次最小 2 乗近似し、予め設定した閾値を超えた最小値、または最大値をピーク点として検出する [56]。

ピーク検出の閾値は、信号の平均値に標準偏差の整数倍を経験的に加えたものとするこ

が一般的である。この手法は、ベースラインノイズの変動に対応しやすいという点から多くの研究グループが用いているが [6, 20, 31, 52], 細胞外電位の振幅が大きい場合は自ずからスパイク検出の閾値が大きくなり、ベースラインノイズ付近の振幅の小さいスパイクに対する検出精度が低い傾向がある (図 2.9)。そこで、本研究では以下のようにしてスパイクの検出を行った (図 2.10) [55]。

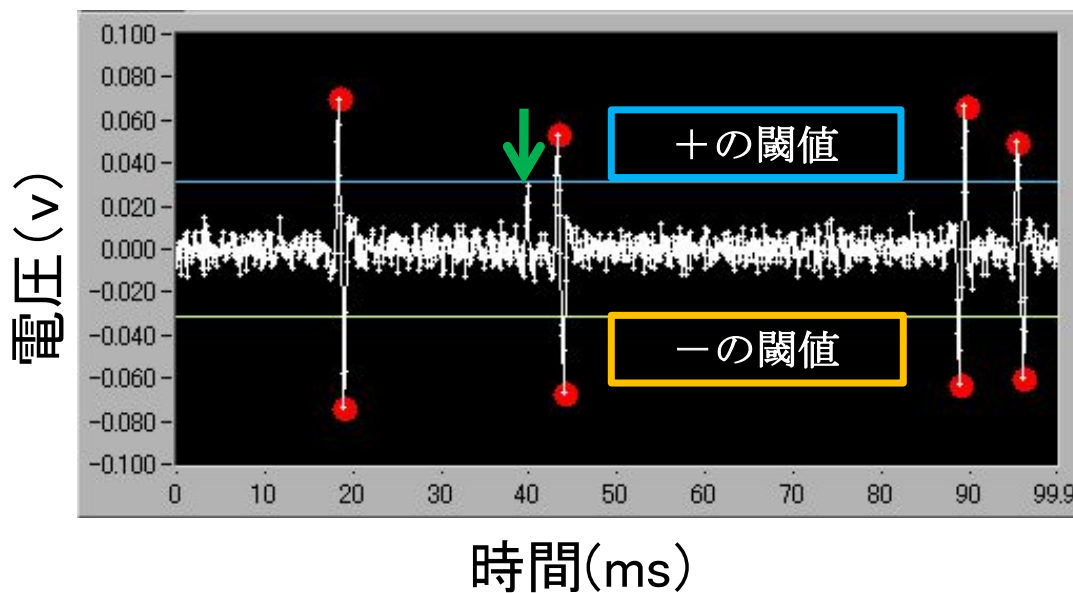
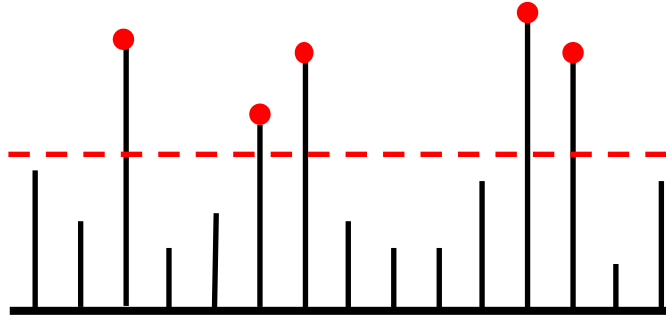


図 2.9 一般的なスパイク検出閾値設定によるベースラインノイズ付近のスパイクの取りこぼし。緑矢印が取りこぼした振幅が小さいスパイクを示す。文献 [55] より引用。

(a)

$$|E_{(I)}| + a \times \sigma_{(I)}$$

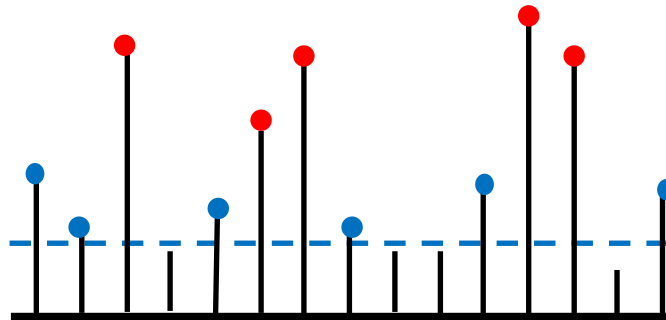


$E_{(I)}$: 時間窓内の電位ピーク

$\sigma_{(I)}$: 時間窓内の電位ピークの標準偏差

(b)

$$|E_{(N)}| + b \times \sigma_{(N)}$$



$E_{(N)}$: 部分集合の電位ピーク

$\sigma_{(N)}$: 部分集合の電位ピークの標準偏差

図 2.10 スパイク検出の閾値決定法の模式図. (a) 一般的なスパイク検出手法. 赤丸が検出されたスパイクを示す. (b) 本研究で用いたスパイク検出手法. 青丸が新手法で検出されたスパイクを示す.

本研究では、電位信号の振幅と標準偏差の整数倍をスパイク検出の閾値 Th としたが、解析時間窓内の全電位振幅の平均を計算するのではなく、ある一定の条件を満たす部分集合についてのみ平均と標準偏差を計算した (式 2.3).

$$Th = E(N) \pm \sigma(N) \times a \quad (2.3)$$

ここで、 $E(N)$ は解析時間窓内である一定の条件を満たした電位振幅の部分集合、 $\sigma(N)$ は $E(N)$ の標準偏差である。ただし、 N は以下の条件式を満たす I の部分集合である (式 2.4)。

$$|N - E(I)| < \frac{1}{N} \sum_{I=1}^N |I - E(I)| \quad (2.4)$$

ここで、 I は解析時間窓内の全電位信号のサンプル数である。この閾値設定手法は、ベースラインノイズ付近の振幅の小さいスパイク検出するため、振幅の大きい電位信号を除外した電位信号からスパイク検出の閾値を設定する。

本手法で算出された閾値を超える振幅を持つピーク点をスパイクとして検出し、個数及びそれぞれの発生時間をスパイク列として記録した。本研究では、スパイク検出の閾値に用いた標準偏差の乗数は経験的に 9–11 に設定した。この手法を搭載してスパイクを検出するソフトウェアである Spike Counter (SPC) を、当研究室で LabVIEW を用いて独自に開発した。

2.2.4 自発性神経活動の計測

本研究では、培養日数に依存した神経回路網の自発性神経活動パターン変化を解析するため、自発性神経活動が計測範囲のほぼ全域で観察される DIV14 から 7 日ごとに、自発性神経活動を 300 秒間計測した。

また、細胞外ブドウ糖欠乏時における自発性神経活動の維持時間を解析するため、ブドウ糖濃度 0 mM の細胞外記録溶液に溶液置換して自発性神経活動を計測した。細胞外記録溶液とは、神経電気活動を計測するために必要な電解質を含んだ溶液である。本研究では、130 mM NaCl, 3 mM KCl, 2 mM CaCl₂, 1 mM MgCl₂, 20 mM HEPES, 0 mM ブドウ糖の一般的な細胞外記録溶液を用いた。

溶液置換時に温度変化による神経回路網への影響を軽減するため、細胞外記録溶液は 37 °C に加温した。また、溶液置換時に、浸透圧の変化やピペッティングに伴う機械的なショックによりグリア細胞から ATP が放出され、自発性神経活動頻度が一時的に低下する可能性がある。当研究室による過去の実験から、この活動頻度低下は溶液置換後 20 分でほぼ本来のレベルまで回復することが確認されているため [25]、溶液置換後は神経回路網を 20 分間静置した。溶液置換して静置した後、神経回路網の自発性神経活動を 1 時間毎に 10 分間ずつ計測した。

2.3 実験結果

MEA 上に培養された神経回路網の自発性神経活動は培養 10 日目 (DIV10) 前後から観察されることが報告されている。

本研究で用いた培養系においても DIV10 前後で自発性神経活動が観察された (図 2.11)。

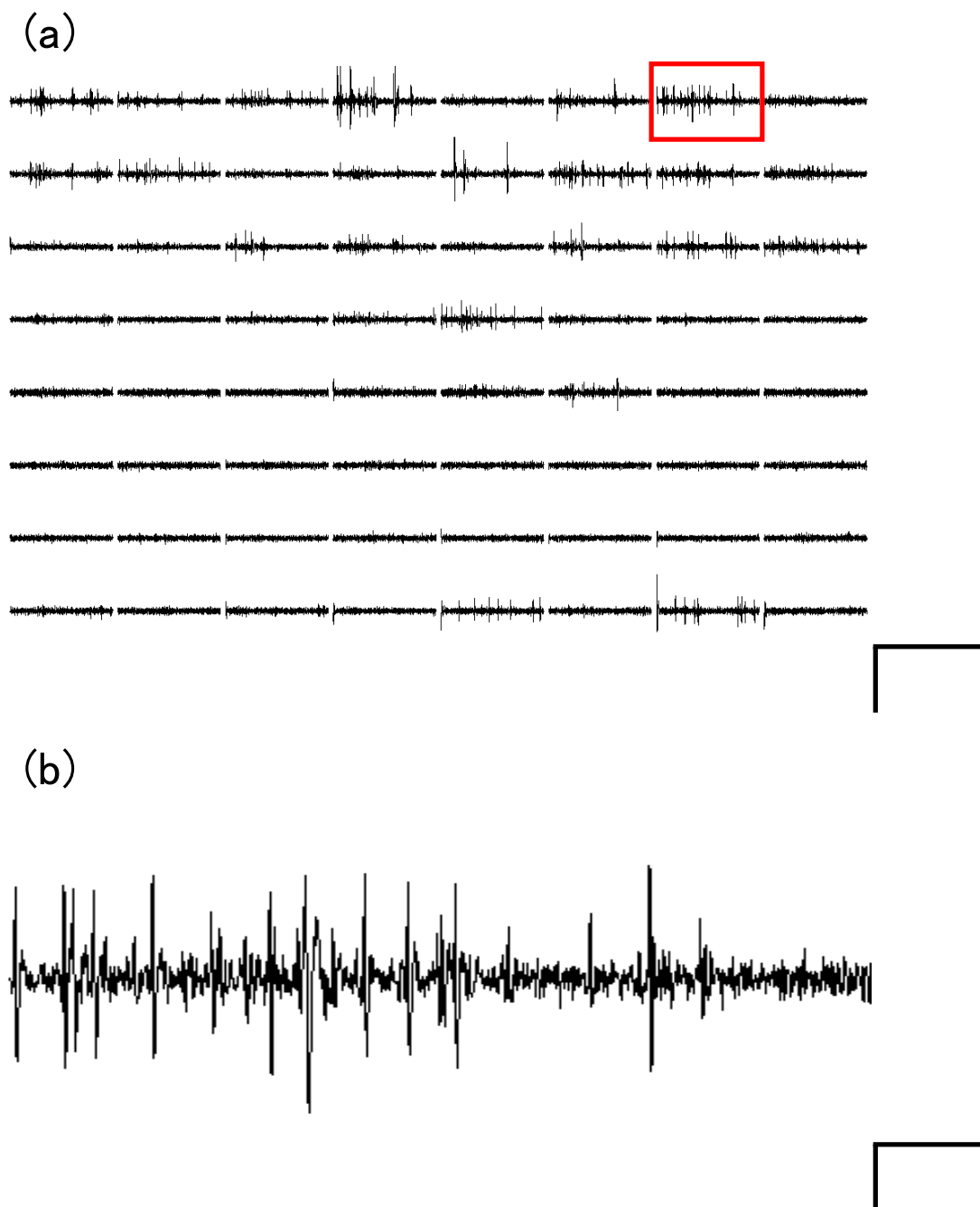


図 2.11 細胞外電位多点計測システムで計測された自発性神経活動の一例 (E18DIV28). (a) 全 64 電極から計測された自発性神経活動. スケールバーは $100 \mu\text{V} \times 200 \text{ms}$. (b) 単一電極 (図 2.11-a の赤枠) から計測された自発性神経活動の一例. スケールバーは $100 \mu\text{V} \times 50 \text{ms}$.

自発性神経活動は外部からの入力がない状態で発生する神経電気活動であり、脳情報処理に積極的に関与している可能性が示唆されている [9,44].

本研究では、多くの電極から一定の自発性神経活動が観察出来る DIV14 から 7 日毎に 300 秒間の自発性神経活動を計測した (図 2.12, 2.13). 計測された電位信号データから、SPC によって神経活動に相当するスパイクを検出した. 通常の条件で培養した神経回路網におい

て、全 64 電極から計測された 1 秒間における平均自発性神経活動頻度は DIV14, DIV21, DIV28, DIV35, DIV42 でそれぞれ、 22.57 ± 7.49 , 79.79 ± 12.30 , 191.52 ± 26.35 , 305.65 ± 26.49 , 528.75 ± 16.04 (それぞれ平均値 \pm 標準誤差, $N = 6$) であった。培養神経回路網の自発性神経活動は、培養日数の経過に伴ってその活動頻度を増加させることが確認された。

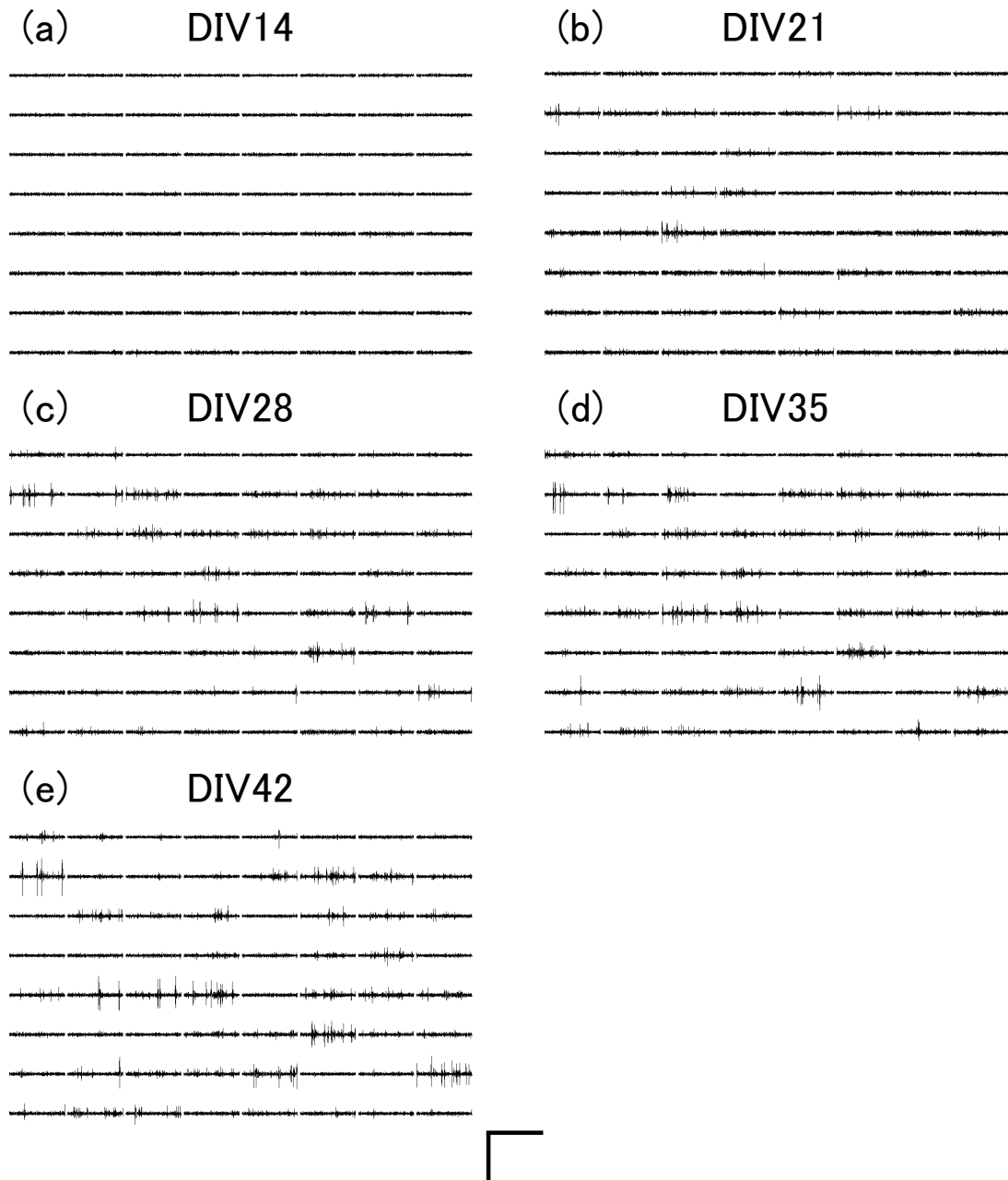


図 2.12 培養日数に依存した自発性神経活動の変化. (a) DIV14, (b) DIV21, (c) DIV28, (d) DIV35, (e) DIV42. スケールバーは $100 \mu\text{V} \times 200 \text{ms}$.

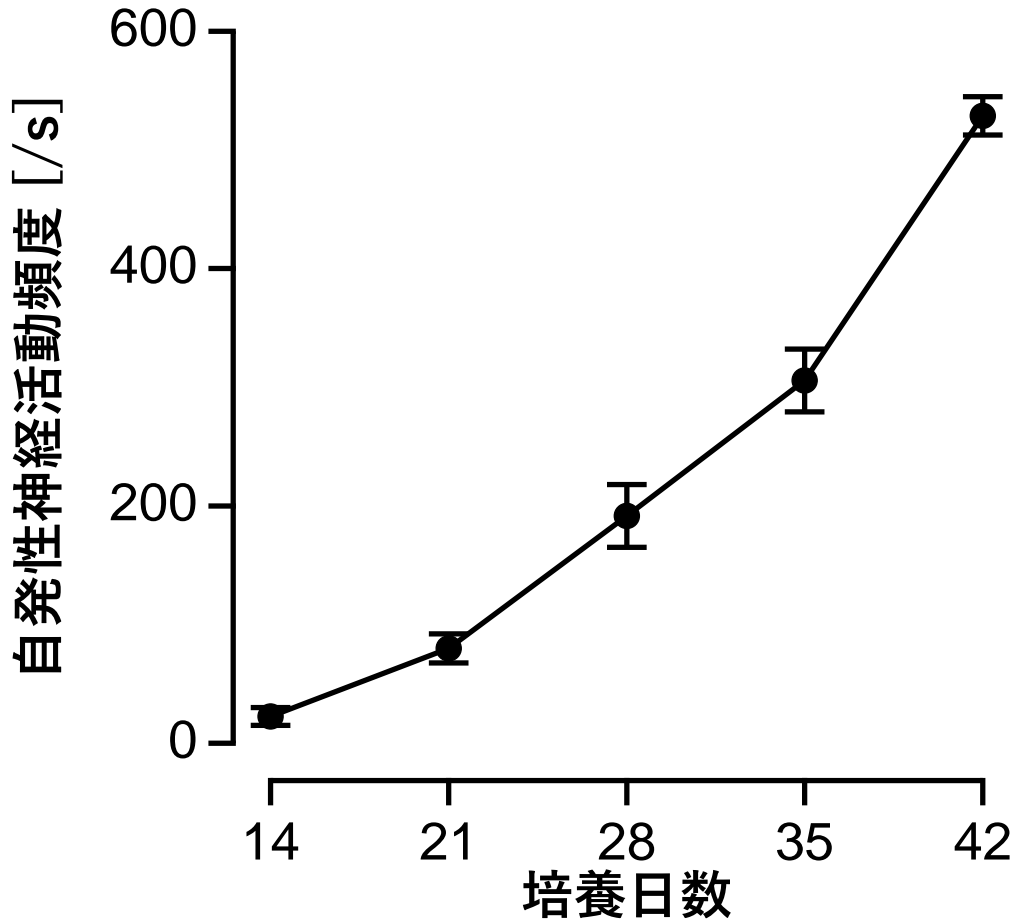


図 2.13 培養日数に依存した自発性神経活動頻度の変化。エラーバーは標準誤差を示す (E18DIV14-42, N = 6)。

自発性神経活動の活動パターンは培養日数の経過に伴ってその活動パターンが複雑化することを本実験系においても確認した。これは、従来の知見と一致する結果である [6, 19, 20]。DIV35 以降のように、自発性神経活動が充分活発に観察される場合、細胞外のブドウ糖を欠乏させ、細胞外からのエネルギー供給が無い状態で自発性神経活動がどの程度維持可能か解析した。神経回路網の細胞外液をブドウ糖濃度が 0 mM の細胞外記録溶液に溶液置換し、1 時間ごとに 10 分間の自発性神経活動を計測した (図 2.14, 2.15, 表 2.1)。本実験では、溶液置換後 20 分静置した後の 10 分間の自発性神経活動頻度で、それ以降 1 時間ごとに計測した 10 分間の自発性神経活動頻度で除して正規化した。本実験には、E18DIV37-DIV93 の神経回路網を用いた。

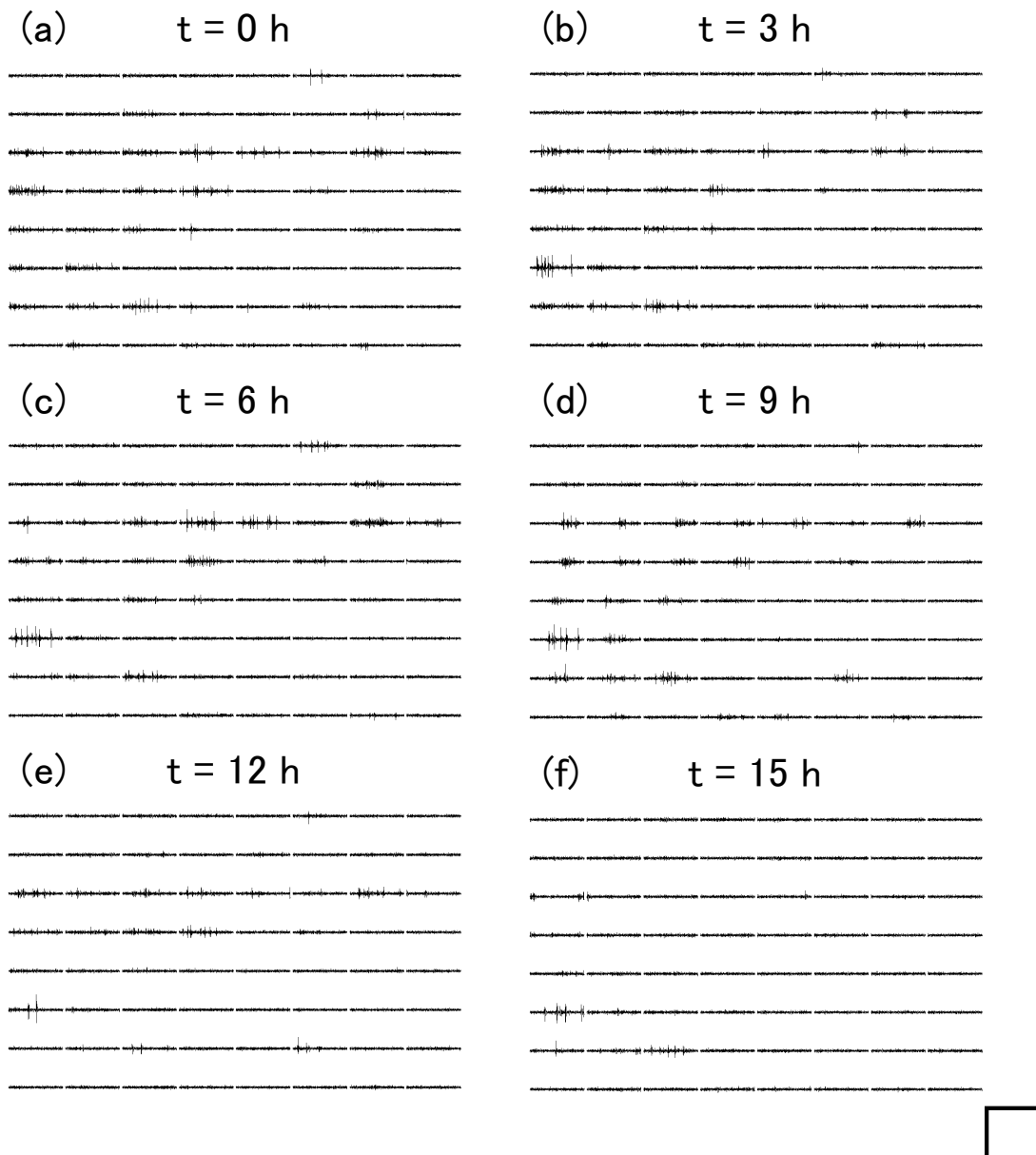


図 2.14 ブドウ糖濃度欠乏時の自発性神経活動の一例 (E18DIV56). (a) 溶液置換直後, (b) 溶液置換 3 時間後, (c) 溶液置換 6 時間後, (d) 溶液置換 9 時間後, (e) 溶液置換 12 時間後, (f) 溶液置換 15 時間後. スケールバーは $100 \mu\text{V} \times 200 \text{ ms}$.

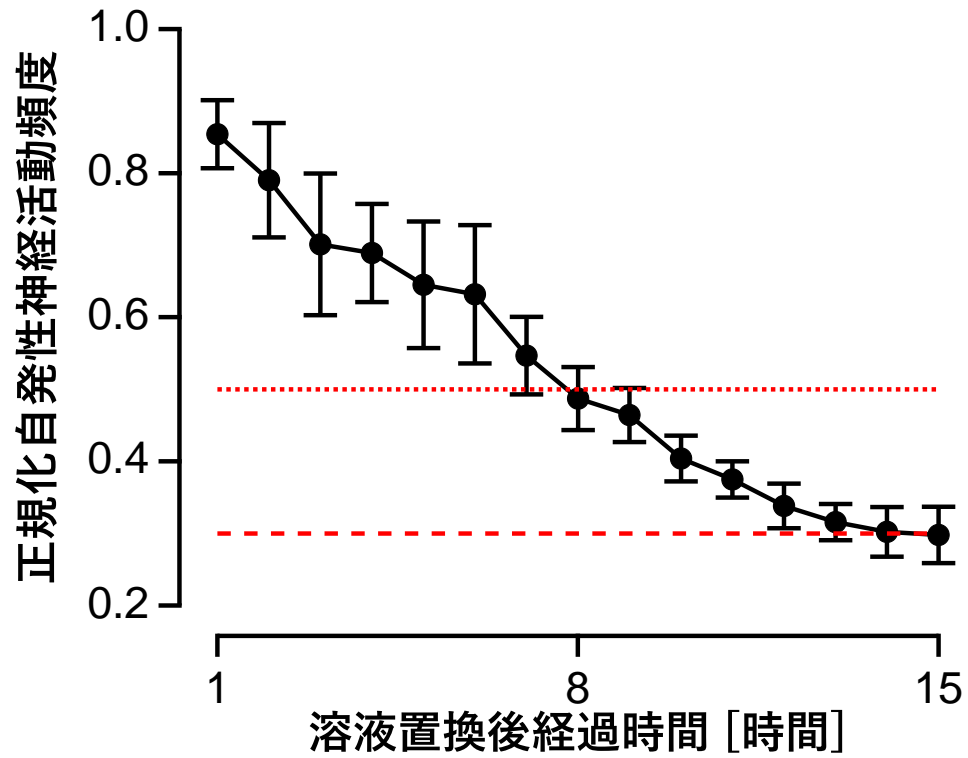


図 2.15 細胞外ブドウ糖欠乏時の正規化された自発性神経活動頻度の変化。点線は溶液置換直後の自発性神経活動頻度の 50%，破線は溶液置換直後の自発性神経活動頻度の 30% を示す。エラーバーは標準誤差を示す (E18DIV37-93, N = 5)。

表 2.1 溶液置換後経過時間と自発性神経活動頻度の関係性

溶液置換後経過時間	正規化自発性神経活動頻度 (平均値 ± 標準誤差, N = 5)
1 時間後	0.85 ± 0.05
2 時間後	0.79 ± 0.08
3 時間後	0.70 ± 0.10
4 時間後	0.69 ± 0.07
5 時間後	0.65 ± 0.09
6 時間後	0.63 ± 0.10
7 時間後	0.55 ± 0.05
8 時間後	0.49 ± 0.04
9 時間後	0.46 ± 0.04
10 時間後	0.40 ± 0.03
11 時間後	0.38 ± 0.03
12 時間後	0.33 ± 0.03
13 時間後	0.32 ± 0.03
14 時間後	0.30 ± 0.03
15 時間後	0.30 ± 0.04

正規化された自発性神経活動頻度は、ブドウ糖濃度 0 mM の細胞外記録溶液に溶液置換した直後の自発性神経活動頻度を 1 として、溶液置換後 3 時間で 0.70 ± 0.10 、6 時間後で 0.63 ± 0.10 、9 時間後で 0.46 ± 0.04 、12 時間後で 0.34 ± 0.03 、15 時間後で 0.30 ± 0.04 (それぞれ平均値 ± 標準誤差, N = 5) であった。本研究で使用した培養神経回路網の自発性神経活動頻度は、ブドウ糖濃度 0 mM 条件下において緩やかに減少し、9 時間後で約 50%、15 時間後で 30% 程度に減少したことが明らかとなった。これらの結果は、神経回路網が 15 時間以上の自発性神経活動を維持出来る程度のエネルギーが細胞に蓄積されていることを示唆する。

2.4 考察

2.4.1 培養日数に依存した自発性神経活動パターン

細胞外電位多点計測システムを用いて、MED プローブ上に培養されたラット胎児海馬領域由来の神経回路網の自発性神経活動を計測した。培養神経回路網において、DIV10 前後で自発性神経活動が観察される。本研究で用いた神経回路網においても、自発性神経活動が DIV10 前後から確認された (図 2.11)。分散培養した神経回路網の自発性神経活動は、培養日数の経過に伴って活動頻度が増加し、培養日数に依存して活動パターンを変化させることが報告されている [6, 19]。また、培養された神経回路網は培養約 5-6 週間目から高頻度バースト活動が発現し、これが神経回路網の機能的構造の自己組織的な再構成を行う過程である

事が示唆されている [57]. 本研究で用いた培養系においても, 培養日数の経過に伴って自発性神経活動頻度が増加し, 活動パターンが複雑化した (図 2.12, 2.13). また, 自発性神経活動頻度の増加に伴い, 自発性神経活動はバースト状の活動を示し, かつ電極全体から同期的な神経活動を示した. これらの結果, 本培養系においても従来の報告と同様の現象が起こっていることを示唆している [6, 19]. 分散播種された神経細胞は, それぞれが軸索を伸長し, 神経細胞同士が自己組織的に機能的結合を形成することで複雑な構造を形成する. 自発性神経活動は, この培養神経回路網形成過程の指標として有効である. MED プローブ上に培養された神経回路網は, 神経回路網の特性を維持しつつ発展を長期にわたって解析可能であり, 培養日数と自発性神経活動パターンの関係性を解析するために有効な系である. 神経細胞にとってブドウ糖は細胞の生存, 及び神経活動の発生に要するエネルギー源としての役割があるため, 培養日数に依存した自発性神経活動頻度の増加に伴い, 培養神経回路網を構成する細胞のエネルギー要求量も培養日数に依存して増加していると考えられる.

2.4.2 ブドウ糖欠乏状態で自発性神経活動を維持出来る時間

神経細胞の静止膜電位の維持と, 活動電位の発生には多くのエネルギーが要求されると予想される.

本研究で使用した培養神経回路網の場合, ブドウ糖欠乏状態では自発性神経活動頻度は 15 時間程度で約 3 割程度に減少することが明らかとなった. (図 2.14, 2.15, 表 2.1). 本研究や他の関連研究において, 培養神経回路網は 20 mM 前後のブドウ糖濃度下で培養されている [50–52]. これは生理的な血中ブドウ糖濃度 (5.5 mM – 10 mM) と比して高濃度であるが, 培養系においては栄養的なサポートを行うグリア細胞の密度も小さく, 血流も存在しないことから外液置換も少ないため, 生体と同じブドウ糖濃度では細胞の生存を維持出来ないと考えられている. 本研究で用いた培養系は, 初期密度が $7800 \text{ cells} / \text{mm}^2$ であり, 関連する他の研究よりも高密度で播種・培養されている. このことから, 本研究で用いた神経回路網を活性度が高い状態で維持するためには生理的条件よりも多くのブドウ糖が必要であることが考えられる.

神経回路網の細胞外ブドウ糖濃度が必要量より下回った場合, 神経回路網の自発性神経活動頻度は低下することが考えられる. 従って, 本実験で得られた結果は蓋然性があると言える. 細胞外ブドウ糖が長時間にわたって欠乏した場合に自発性神経活動頻度が低下する理由として, 神経回路網を構成する細胞数の減少, もしくは細胞がエネルギー消費量を抑えるために自発性神経活動頻度を低下させることが考えられる.

細胞外ブドウ糖が欠乏した場合, 神経細胞の生存に用いるエネルギーが不足して神経細胞が死滅し, 神経回路網を構成する細胞数が減少している可能性がある. 細胞外ブドウ糖が欠乏した場合, 神経回路網全体で平均的に神経細胞が死滅することが考えられるが, 本研究で得られた結果として, 細胞外ブドウ糖が欠乏した状態で 15 時間経過した後の自発性神経活動は, 特定の電極においてのみ観察された (図 2.14). 仮に細胞外ブドウ糖の欠乏により平均的

に神経細胞が死滅しているのであれば、自発性神経活動が観察される電極数は減少せずにそれぞれの電極において自発性神経活動頻度が低下する可能性が高い。神経回路網は神経細胞集団を同期的に活動させることで機能を発揮していると考えられている [18]。細胞外ブドウ糖が欠乏した状態で長時間経過した後、エネルギー消費量を抑えるために神経回路網の一部が同期的に活動する状態を維持している可能性がある。

また、培養液のブドウ糖濃度が神経回路網を維持する下限に近い場合、細胞外のブドウ糖を欠乏させた直後から神経細胞死が起こり、急速に自発性神経活動頻度が減少することが考えられる。本実験で得た結果により、細胞外ブドウ糖欠乏時の自発性神経活動は緩やかに減少したことを確認した。このことから、一般的な培養条件におけるブドウ糖濃度は神経回路網の維持と活動の活性化に必要十分であることが示唆された。

2.5 結論

ラット海馬由来分散培養神経回路網の自発性神経活動の特性を確認した。自発性神経活動は培養日数の経過に依存して活動頻度が増加し、活動パターンが複雑化した。本研究の条件で十分に培養した神経回路網を細胞外ブドウ糖欠乏状態にした場合、約 15 時間後には自発性神経活動頻度が概ね 3 割前後に減少するが、自発性神経活動が維持されることを明らかにした。

分散培養した神経回路網において、神経細胞にとっての栄養的なサポートが不足した状態であっても、神経細胞の初代培養において一般的な高ブドウ糖濃度で培養することで、神経回路網の機能が十分に維持されていることを確認した。

第3章

自発性神経活動と細胞外ブドウ糖濃度との関係性

3.1 序論

脳の高次機能を担う神経回路網において、単一の神経細胞は回路網を構成する素子である。神経細胞において発生した活動電位は、軸索上を伝播し、回路網を構成する他の神経細胞にシナプスを介して入力される。シナプス伝達効率は回路網内で常に制御されており、神経電気活動に依存して可塑的に変化していることが知られており、可塑的变化により脳内の情報処理が行われていると考えられている。脳を離散的な数理モデルで模倣した情報処理手法は多く提案され、特に最近ではディープラーニング [58] が特徴学習を実現するとして注目を浴びている。しかしながら、生体系は、生存を前提にした情報処理や、神経回路網のフレームワークそのものの改変など、機械学習では模倣しにくい特性も多く持っている。従って、生体素子を用いた情報処理の可能性を追究することも一つの興味深い方向であると考えられる [41,59,60]。

動物におけるエネルギーは主としてブドウ糖により供給される。培養した神経回路網で発生する自発性神経活動は培養日数の経過に伴って活動パターンを変化させることが報告されている [6,19,33]。自発性神経活動が脳情報処理に利用されているとすると、回路網の形成及び成熟による活動パターンの変化は脳情報処理に関与していることが考えられる。

機械による情報処理と同様に、生体による情報処理にもエネルギーが消費される。他の細胞と同様に、神経細胞は主に細胞外のブドウ糖を取り込んで、細胞内の生化学系ネットワークである代謝経路 (図 3.1) によって分解し、生体内におけるエネルギーの共通通貨とされる ATP に変換して、エネルギーの運搬、貯蔵を行なっている。

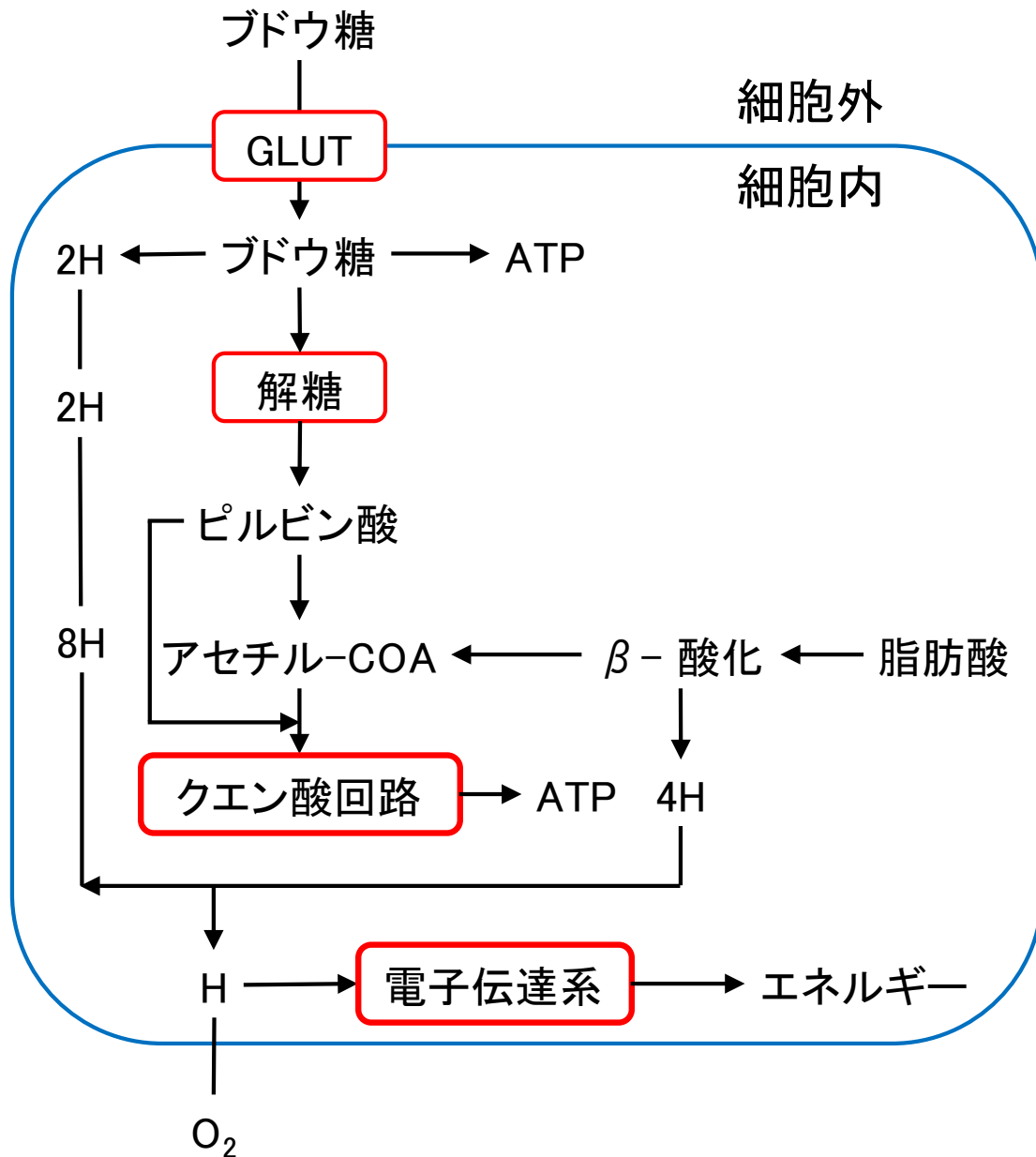


図 3.1 酸素呼吸する細胞の糖代謝経路.

ATP は糖質、及び脂肪酸の化学結合の中に蓄えられているエネルギーを細胞にとって利用しやすい形に濃縮したものと言える。ATP は主に酸素呼吸によってミトコンドリア内で生成される。ブドウ糖は細胞内の経路で代謝されて、細胞は大量の ATP を産出し、生体の脳においてもエネルギー源として活用される。脳循環代謝の解析により、ヒトの脳では重量比を考慮すると 10 倍以上ものブドウ糖を消費している [35, 36]。脳が通常時にエネルギーとして利用する基質は細胞外から取り込まれたブドウ糖がほとんどであり、少なくとも脳の基礎活動時に主に働いている代謝系はブドウ糖の酸化反応である。脳機能の正常な保持には、その活動を支えるエネルギー代謝が必要であり、糖代謝はその中心的な役割を果たしている。細胞外ブドウ糖は全ての細胞の生存に必要であり、それは脳神経細胞においても例外では無い。

例えば、中脳の SNr や海馬には血糖値を感知するために KATP が存在し、細胞内ブドウ糖濃度の量を感じ、制御している可能性が示唆されている [40].

一方で、30 mM の高ブドウ糖濃度下に 3 日程度暴露された神経細胞はグルコース毒性という代謝ダメージを受けることが報告されている。グルコース毒性においては、解糖系や電子伝達系におけるタンパク分子の糖化、分裂促進因子活性化タンパク質キナーゼ (Mitogen-activated Protein Kinase, MAPK) 系の活性化によって細胞死が引き起こされることが知られており [61], それを防止するためにも生体内においてはブドウ糖濃度が厳密に制御されている。その濃度は生物種にもよるが、概ね 8 mM 前後である [49].

脳においては神経細胞の周囲を覆う形でグリア細胞が存在する。ヒトの脳においてグリア細胞は神経細胞の 10 倍以上の数が存在すると言われる [1]. グリア細胞の一種であるアストロサイトは、これまで神経細胞を生理的に保持する役割を持つと考えられていたがその他にも重要な機能を有していることが明らかになってきている。神経細胞とグリア細胞にはグルコース輸送体である GLUT が発現しており、相互にエネルギーをやり取りしていることが知られている。特にアストロサイトは、神経細胞から放出された興奮性の神経伝達物質であるグルタミン酸を吸収し、再び神経細胞へ供給する働きを有する他 [62], 取り込んだブドウ糖をグリコーゲンとして保存し、ブドウ糖欠乏時にはエネルギー源として神経細胞へ供給することも報告されている [63] (図 3.2).

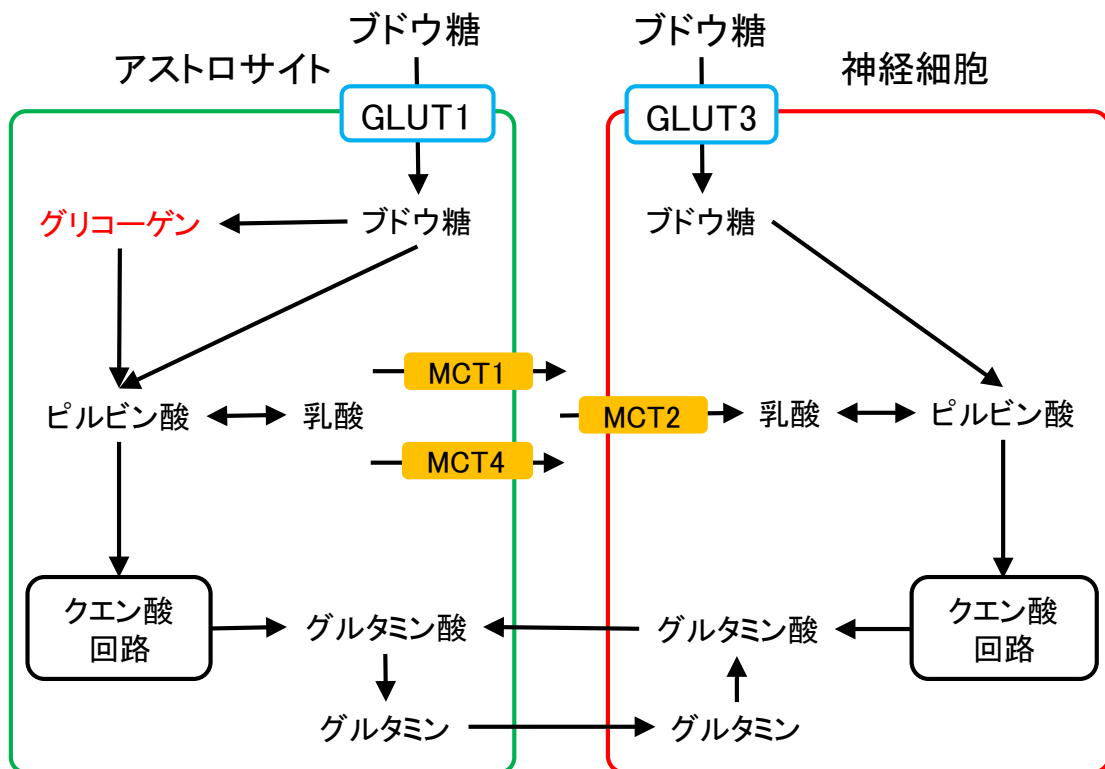


図 3.2 神経細胞とアストロサイトとの間のエネルギーのやりとり。

また、*In Vitro* の系では培養した神経細胞はブドウ糖のみならず培養液中に加えられた乳

酸をエネルギー基質として使用できることが知られてきた [64]. 神経細胞は、潜在的には乳酸等の解糖系生産物、さらにはグルタミン酸からも ATP を生産し得る. ペレソンとマジストレッティは培養されたアストロサイトがグルタミン酸刺激によりブドウ糖消費量を増加させると共に、乳酸生産量を増大させ、細胞外に放出することを報告した [65]. また、代謝経路によって発生した乳酸がアストロサイトから神経細胞とトランスポーターを介して受け渡されることが、記憶の長期的維持に関与しているという報告がなされ、乳酸と記憶の関係性についても注目が集まっている [64]. 従って、グリア細胞と神経細胞は情報処理・エネルギー代謝において、相互に作用して脳機能を実現している.

これまでの議論の様に神経細胞は、電気活動を維持するために多量のエネルギーを消費することから神経活動と細胞外ブドウ糖濃度は大きく関与している可能性が高い [62,66]. しかしながら、ブドウ糖から活動に必要なエネルギーを得る過程と神経回路網の活動変化を関連付けて解析した研究はほとんど存在しない. また、神経回路網の形成及び成熟による神経活動パターンの変化が脳情報処理に大きく関与しているにも関わらず、神経回路網の形成過程における細胞外ブドウ糖濃度の神経電気活動への影響を解析した知見はない. そこで、本研究では神経回路網の細胞外液中のブドウ糖濃度と自発性神経活動パターンの関連性について解析した. 加えて、培養液のブドウ糖濃度を調整することで、高ブドウ糖濃度及び低ブドウ糖濃度下で培養した神経回路網において、自発性神経活動パターンの培養日数経過に依存した変化についても解析した.

3.2 実験材料・手法

実験材料は、本論文の2章で記述した MED プローブ上に培養したラット胎児大脳海馬領域由来の初代培養神経回路網である. また、細胞外電位多点計測については2章に記述した手法と同様である. 本章で記述する実験において異なるのは、自発性神経活動の計測スキームであるので以下に記述する.

3.2.1 細胞外ブドウ糖濃度に依存した自発性神経活動の計測

本実験では、自発性神経活動は通常培養に用いる培養液を細胞外記録溶液に置換して計測を行った. 細胞外記録溶液は神経細胞が電気活動を起こすために最低限必要なイオンを含む電解質液に細胞のエネルギー源としてブドウ糖を添加した溶液であり、細胞の活動に影響しうる要因を極力排除することを目的に使用している. 細胞外記録溶液の基本的な組成は、130 mM NaCl, 3 mM KCl, 2 mM CaCl₂, 1 mM MgCl₂, 20 mM HEPES, 10 mM ブドウ糖である. 作成時点での細胞外記録溶液は pH が 6 前後であるため、NaOH で滴定して、溶液の pH を 7.2 前後に調整した. また、本研究では通常の細胞外記録溶液以外にブドウ糖濃度を 0 mM, 5 mM, 10 mM, 15 mM, 20 mM, 30 mM, 50 mM にそれぞれ変更した細胞外記録溶液を準備した. 細胞外の溶液を置換することによる神経細胞への浸透圧変化等のショックを

最小限に防ぐため、全ての細胞外記録溶液はショ糖（和光純薬）を用いて浸透圧を培養液と同じ約 300 mOsm/kg に調整した。二糖類であるショ糖は細胞へは直接取り込まれないため、神経電気活動に影響せず浸透圧を調整することが可能である。

神経回路網の細胞外液を置換する際に、ピペッティングによる機械的なショックや温度、浸透圧変化によるショックを与えるとグリア細胞から ATP が放出されることが知られている [67]。また、この ATP により自発性活動頻度が減少し、回復するまでに約 20 分間程度の時間を要することが確認されている [25]。本実験では、液置換の直接的な影響をできるだけ排除するために、細胞外記録溶液に溶液置換を行った後に 20 分間静置し、10 分間自発性神経活動を計測した。対照実験として 10 mM ブドウ糖濃度の細胞が記録溶液のみで複数回溶液置換して自発性神経活動を計測し、溶液置換が自発性神経活動に与える影響を確認した後（図 3.3-a）、ブドウ糖濃度の異なる細胞が記録溶液下で自発性神経活動を計測した（図 3.3-b）。

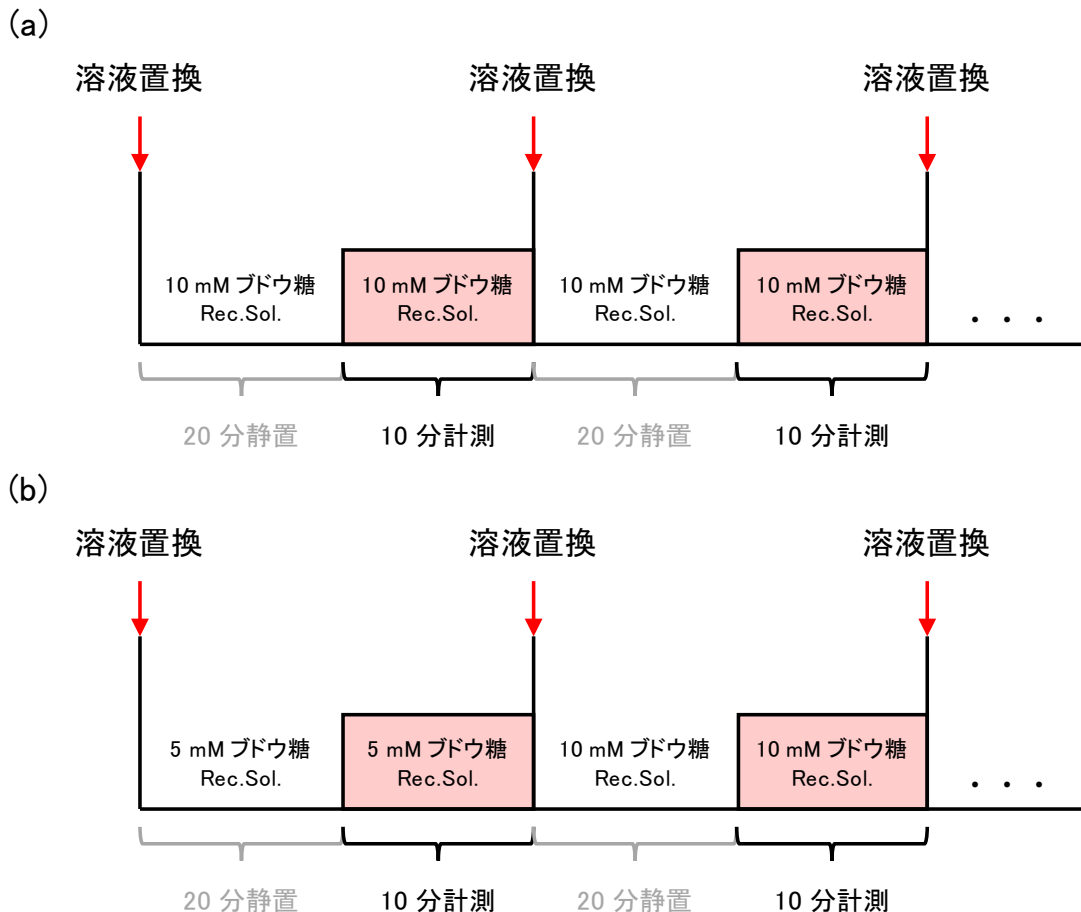


図 3.3 細胞外記録溶液下で自発背神経活動を計測する実験スキーム。(a) 溶液置換による自発性神経活動への影響を確認する実験スキーム。(b) ブドウ糖濃度の異なる細胞外記録溶液下で自発性神経活動を計測する実験スキーム。

実験では、ブドウ糖濃度の異なる細胞外記録溶液に細胞外液を置換して、自発性神経活動と細胞外ブドウ糖濃度の関係性を解析した。本研究では、最大 6 回の溶液置換を行うことから、対照実験としてブドウ糖濃度が 10 mM である通常用いられる細胞外記録溶液で同回数溶

液置換を行い、20分間静置した後の10分間の自発性神経活動計測を計測した。

3.2.2 高ブドウ糖濃度下におけるブドウ糖毒性の検討

高ブドウ糖濃度溶液に神経回路網を暴露し、LIVE/DEAD 生存率/細胞毒性キット（サーモフィッシャーサイエンティフィック）を用いて、生細胞と死細胞の割合を定量した。LIVE/DEAD 生存率/細胞毒性キットは、カルセイン-AM と、エチディウムホモダイマー-1 を組み合わせて生細胞と死細胞を染色する。カルセイン-AM は、生細胞内のエステラーゼにより加水分解され、AM 基が外れると膜不透過性のカルセインとなり蛍光を発する。エチディウムホモダイマー-1 は、DNA に結合する膜不透過性の物質で、細胞膜を破壊された死細胞に取り込まれ、DNA と結合して蛍光を発して死細胞の指標となる。

LIVE/DEAD 生存率/細胞毒性キットを用いた細胞染色手順を以下に述べる。カルセイン AM とエチディウムホモダイマー-1 を PBS⁻ で希釈し、それぞれ 2 μ M に調整した。培養神経回路網から培養液を取り除き、PBS⁻ で2回洗浄した後、カルセイン-AM 及びエチディウムホモダイマー-1 を含む PBS⁻ を MED プローブに添加し、遮光して15分間クリーンベンチにて静置した。その後、PBS⁻ で3回洗浄して、カルセイン-AM とエチディウムホモダイマー-1 を取り除いた。透過像は、倒立顕微鏡 (IX71, オリンパス) と10倍の対物レンズで観察し、蛍光染色画像は冷却式 CCD カメラ (BH-51L, ビトラン) で 800 \times 600 ピクセルの蛍光画像を撮影した。

生細胞観察には、NIBA 励起法 (励起波長 470-490 nm, U-MNIBA3, オリンパス)、死細胞には、WIG 励起法 (励起波長 520-550 nm, U-MWIG3, オリンパス) を用いた。ネガティブコントロールとして、培養神経回路網に 70% エタノール水溶液を 2 ml 滴下し、30分間クリーンベンチに静置したものの生存状態を定量した (図 3.4)。

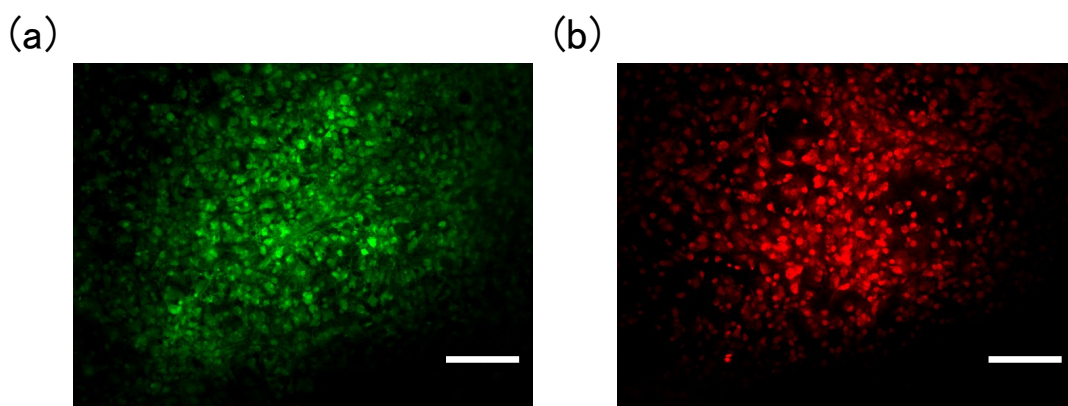


図 3.4 LIVE/DEAD 生存率/細胞毒性キットを用いて生細胞と死細胞を染色した例 (E18DIV29). (a) 生細胞, (b) 死細胞. スケールバーは 50 μ m.

本研究では死細胞比率を解析するため、同一視野の任意に設定した5領域から蛍光像を取得し、撮影した5領域の生細胞と死細胞の面積をそれぞれ粒子解析した。粒子解析を行うソ

ソフトウェアは、LabVIEW を用いて独自に開発した。

3.2.3 培養時のブドウ糖濃度、培養時の神経細胞密度を調整した神経回路網

培養神経回路網の細胞外ブドウ糖濃度への活動頻度と培養時のブドウ糖濃度との関係性を解析するため、通常用いる培養液である DMEM/F12 をベースとしたブドウ糖濃度が 17.5 mM の培養液と共に、本研究ではブドウ糖濃度を 7.5 mM、及び 30 mM に調整した培養液で神経回路網を培養した。ブドウ糖濃度 7.5 mM の培養液は、DMEM no glucose (サーモフィッシュャーサイエンティフィック) にハム F12 (サーモフィッシュャーサイエンティフィック) を 1 : 1 の割合で混合して DMEM/F12 を作成し、さらにブドウ糖を添加することでブドウ糖濃度を 7.5 mM に調整した。また、ブドウ糖濃度 30 mM の培養液は、ブドウ糖濃度が 17.5 mM である DMEM/F12 にブドウ糖を添加して調整した。ブドウ糖濃度を変更した培養液は、ブドウ糖添加時の雑菌等の混入による培養時のコンタミネーションを防ぐため、0.22 μm フィルター (メルクミリポア) を用いて加圧滅菌した。

通常の培養条件では、クローニングリング内に 30 万個の神経細胞を播種するため、神経細胞の初期密度は 7800 cells/mm² であるが、本実験では通常の初期密度で培養した神経回路網の他に、クローニングリング内に播種する細胞数を 10 万個、初期播種密度が 2600 cells/mm² とした神経回路網を培養した。

3.2.4 自発性神経活動パターンの解析手法

培養神経回路網において、神経回路網の成熟過程で自発性神経活動が短期間に高頻度で発生するバースト活動を呈することが報告されている。本実験では、培養日数が経過することで単一電極で派生する自発性バースト活動 (図 3.5-a)、及びバースト活動が同期的に複数の電極で発生する自発性同期バースト活動 (図 3.5-b) を検出した。

(a)



(b)

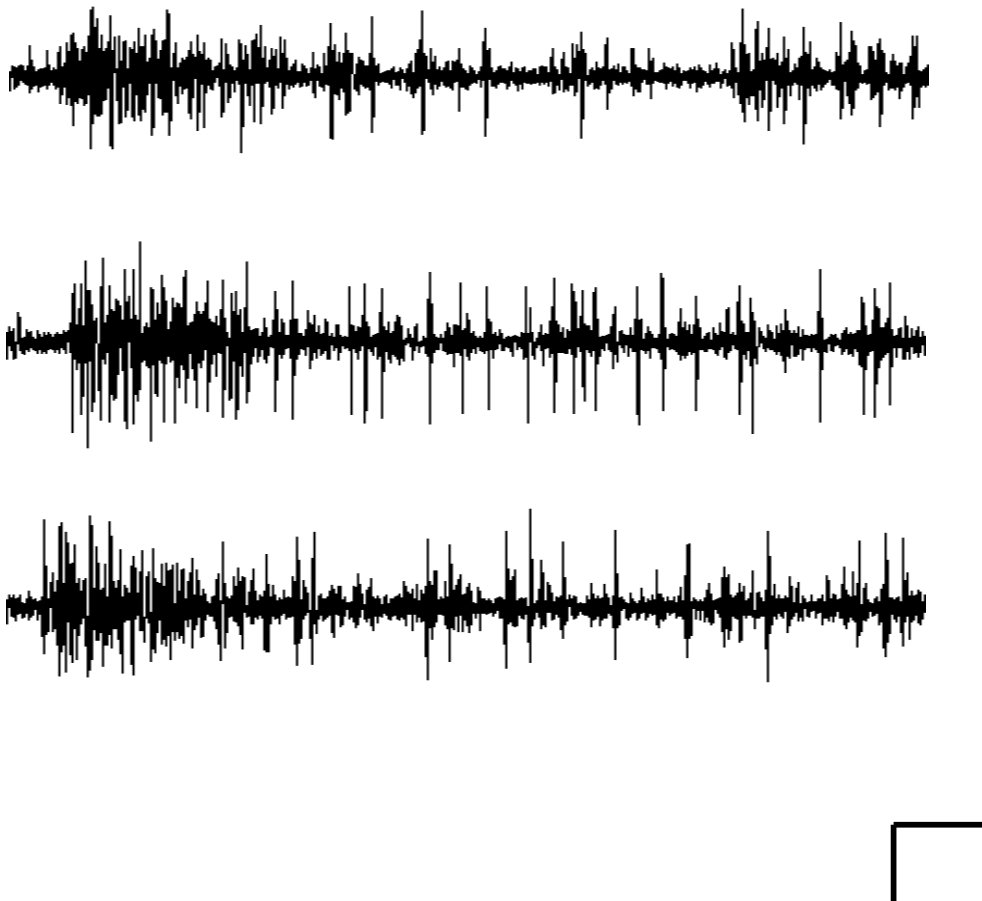


図 3.5 神経回路網の自発性バースト，同期バースト活動の一例 (E18DIV42)。(a) 単一電極における自発性バースト活動の一例。赤線はバースト活動を示す。スケールバーは $25 \text{ ms} \times 100 \mu\text{V}$ 。(b) 複数電極における自発性同期バースト活動の一例。スケールバーは $100 \text{ ms} \times 100 \mu\text{V}$ 。

自発性バースト活動はチアッパローネらの手法を改変して検出した [6]。自発性バースト活

動は、検出されたスパイクの発生時刻をもとに 100 ミリ秒内にスパイクが 10 個以上検出された場合に検出した (図 3.6-a).

また、培養神経回路網の自発性神経活動は培養日数の経過に伴い広範囲に同期的に発生する。本研究では、この同期的な神経電気活動を自発性同期バーストと定義した。自発性同期バーストはチェンらの手法を改変して検出した [68]。自発性同期バーストは全 64 電極から計測された 100 ミリ秒ごとの神経電気活動頻度を合計し、神経電気活動頻度のヒストグラムを全計測時間分作成した。続いて、100 ミリ秒ごとの合計神経電気活動頻度が閾値を超えた場合にバーストとして検出した。自発性同期バースト検出の閾値は、時間窓毎の神経電気活動頻度の平均値 + 標準偏差の 3 倍とした (図 3.6-b).

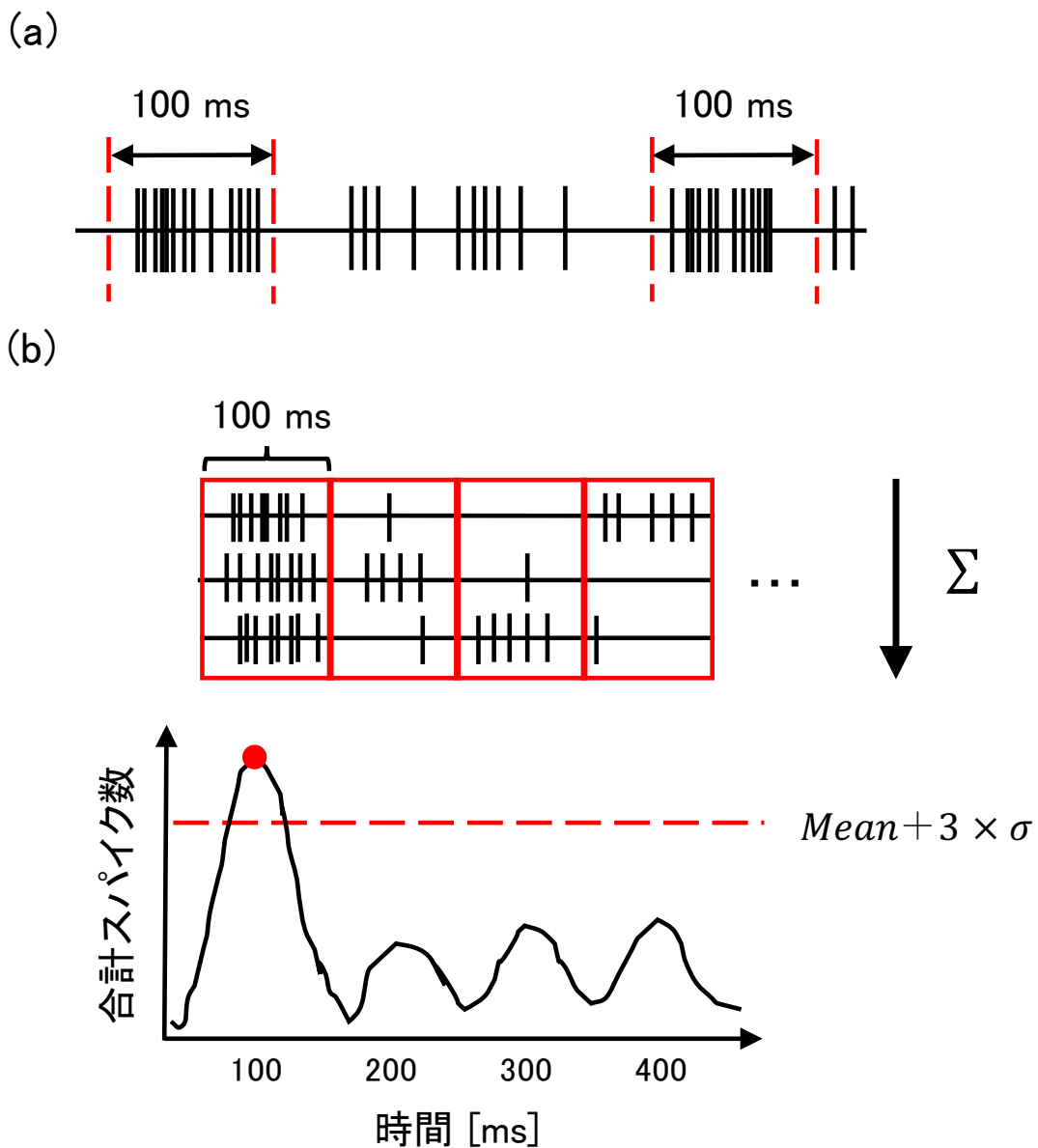


図 3.6 自発性バースト活動検出方法. (a) 自発性バースト活動検出方法. (b) 自発性同期バースト活動検出方法.

3.3 実験結果

3.3.1 細胞外ブドウ糖濃度と自発性神経活動頻度との関係性

本研究では、対照実験として培養神経回路網の細胞外液を、10 mM ブドウ糖の細胞外記録溶液のみで6回溶液置換した場合の自発性神経活動を10分間計測した(図3.7-3.8)。本実験では1回目の計測時の10分間の自発性神経活動スパイク数で、2回目以降に記録した10分間の自発性神経活動スパイク数を除して正規化した。本実験にはE18DIV28-34の培養神経回路網を用いた。本実験における64電極より計測した1秒間の平均自発性神経活動頻度は、溶液置換1回目で 491.09 ± 31.39 、2回目で 576.14 ± 46.71 、3回目で 584.73 ± 46.50 、4回目で 556.25 ± 37.41 、5回目で 512.45 ± 38.33 、6回目で 438.04 ± 40.84 (それぞれ平均値 \pm 標偏誤差, $N = 5$)であった。正規化されたスパイク数は、初回に計測された自発性神経活動頻度を1として、溶液置換2回目以降 1.16 ± 0.19 、 1.18 ± 0.21 、 1.14 ± 0.17 、 1.05 ± 0.23 、 0.88 ± 0.28 (それぞれ平均値 \pm 標偏誤差, $N = 5$)と推移した。全試行において、クラスカル・ウォリス検定による有意差は認められなかった。従って、10 mM ブドウ糖濃度の細胞外記録溶液で溶液置換を行うことでは自発性神経活動頻度の有意な変化は起こらないことが確認された。

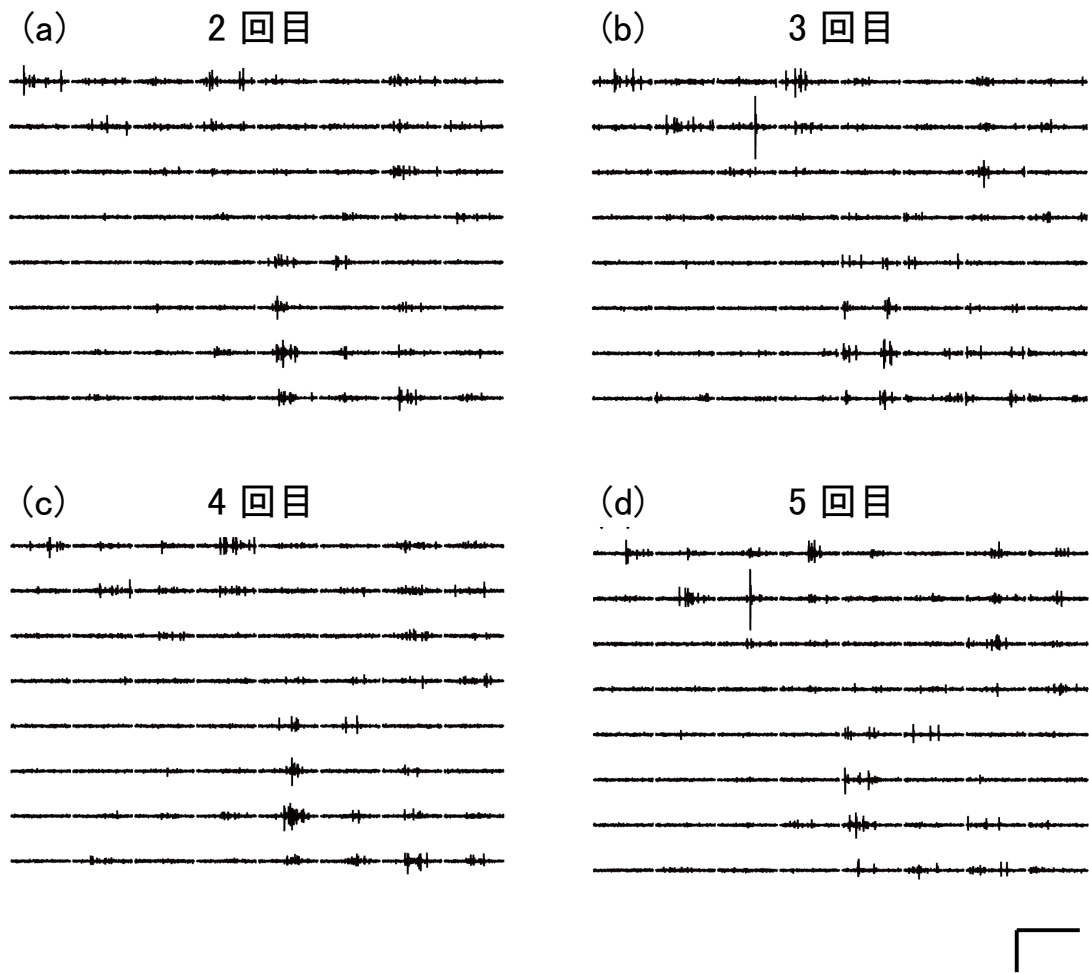


図 3.7 10 mM ブドウ糖濃度の細胞外記録溶液のみで溶液置換した時の自発性神経活動の一例 (E18DIV31). (a) 溶液置換 2 回目, (b) 溶液置換 3 回目, (c) 溶液置換 4 回目, (d) 溶液置換 5 回目. スケールバーは $100 \mu\text{V} \times 200 \text{ms}$.

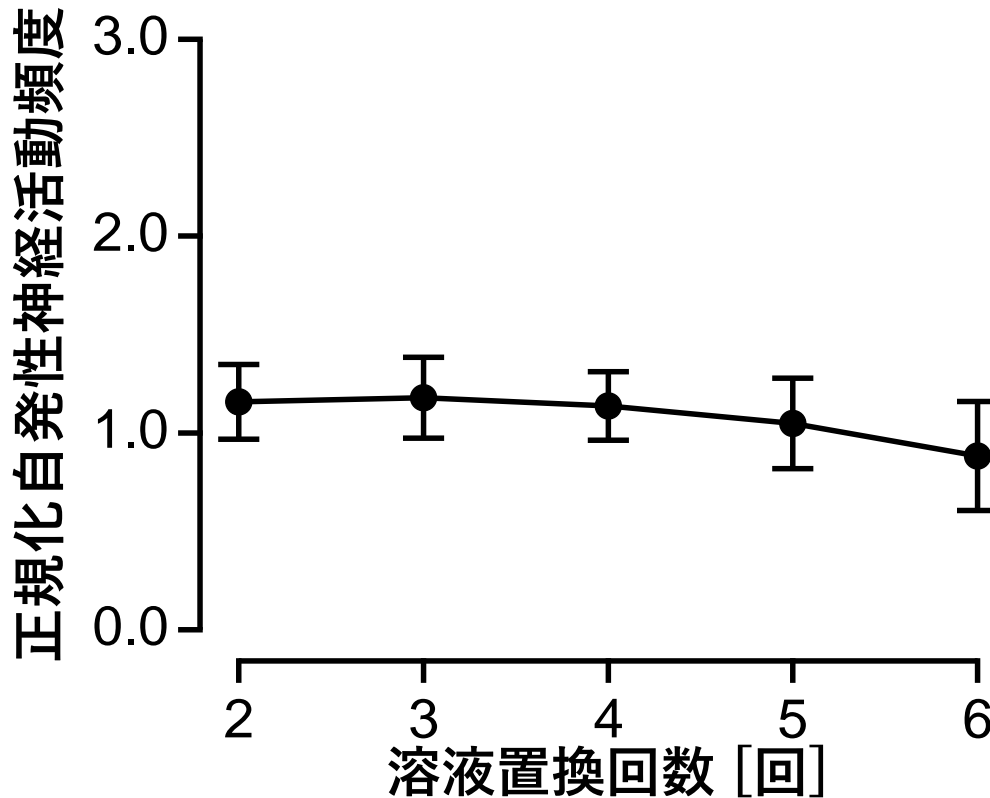


図 3.8 10 mM ブドウ糖濃度の細胞外記録溶液のみで溶液置換した時の自発性神経活動頻度。エラーバーは標準誤差を示す (E18DIV28-34, N = 5)。

続いて、細胞外液を 0, 5, 10, 15, 20, 30 mM ブドウ糖濃度の細胞外記録溶液に溶液置換した場合の自発性神経活動を解析した (図 3.9 - 3.10)。本実験には E18DIV27-33 の培養神経回路網を用いた。それぞれの細胞外ブドウ糖濃度における 10 分間の自発性神経活動スパイク数を、細胞外ブドウ糖濃度 0 mM における 10 分間の自発性神経活動スパイク数で除して正規化を行った。スパイク数は全 64 電極で記録されたものの合計である。64 電極より計測した 1 秒間の平均自発性神経活動頻度は、ブドウ糖濃度が 0 mM で 281.54 ± 30.40 , 5 mM で 509.56 ± 52.31 , 10 mM で 708.72 ± 80.25 , 15 mM で 773.52 ± 92.68 , 20 mM で 639.51 ± 79.48 , 30 mM で 471.57 ± 66.30 (それぞれ平均値 \pm 標偏誤差, N = 5) であった。また、正規化した自発性神経活動スパイク数は、細胞外ブドウ糖濃度 0 mM で計測された自発性神経活動頻度を 1 として、ブドウ糖濃度が 5 mM で 1.82 ± 0.09 , 10 mM で 2.50 ± 0.25 , 15 mM で 2.70 ± 0.20 , 20 mM で 2.23 ± 0.28 , 30 mM で 1.60 ± 0.21 (それぞれ平均値 \pm 標偏誤差, N = 5) であった。また、マン・ホイットニーの U 検定により、細胞外ブドウ糖濃度 5 mM と 15 mM の間、及び細胞外ブドウ糖濃度 15 mM と 30 mM の間で、正規化自発性神経活動頻度に $p < 0.01$ で有意差が認められた。細胞外ブドウ糖濃度が 15 mM までは神経回路網の自発性神経活動頻度が上昇し、それ以上の濃度では活動頻度が上昇せず逆に減少した。

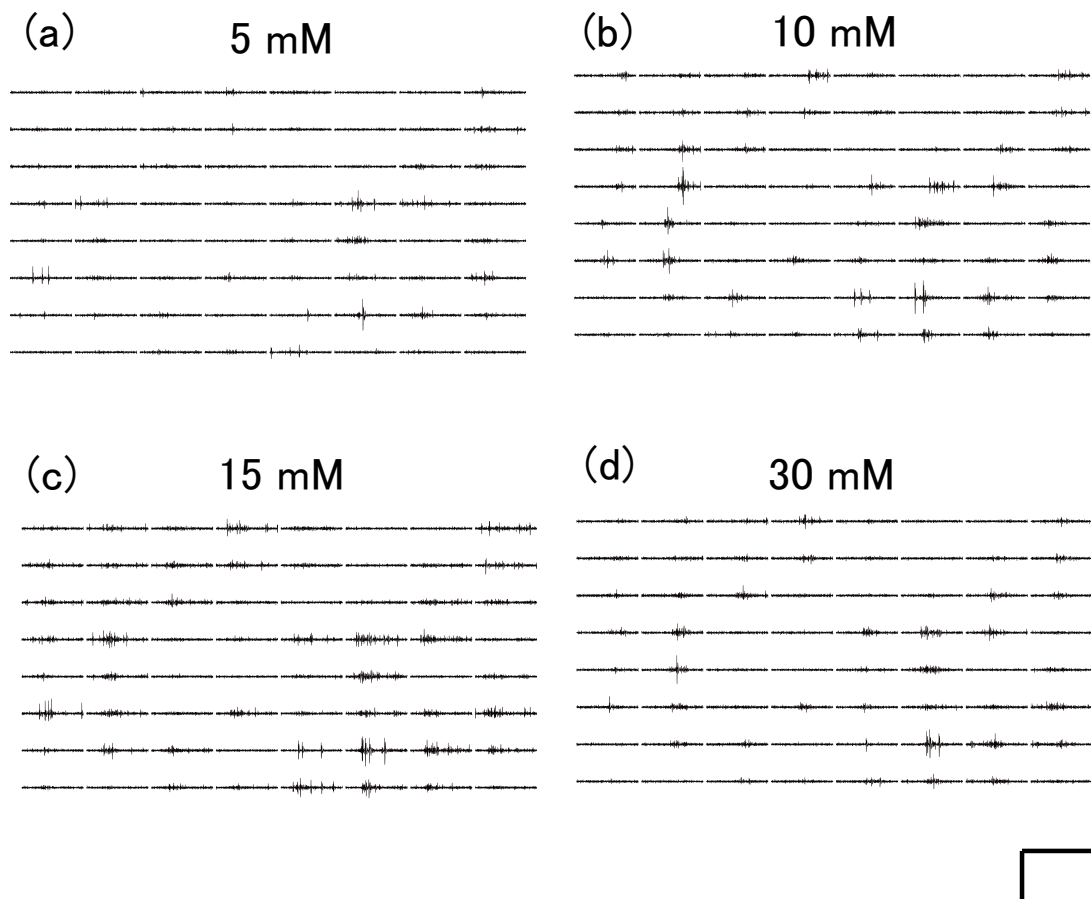


図 3.9 細胞外ブドウ糖濃度変化依存した自発性神経活動の変化の一例 (E18DIV29). (a) 5 mM ブドウ糖濃度, (b) 10 mM ブドウ糖濃度, (c) 15 mM ブドウ糖濃度, (d) 30 mM ブドウ糖濃度. スケールバーは $100 \mu\text{V} \times 200 \text{ms}$.

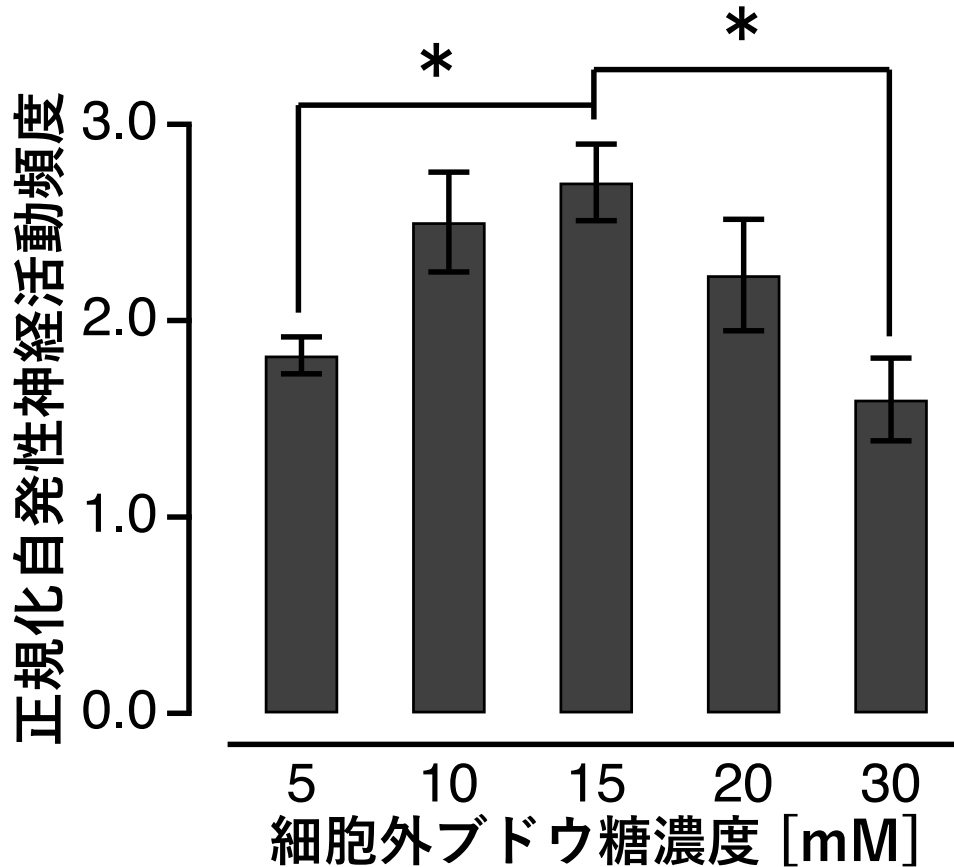


図 3.10 細胞外ブドウ糖濃度変化依存した自発性神経活動頻度の変化。エラーバーは標準誤差を示す (E18DIV27-33, N = 5)。*はマン・ホイットニーの U 検定による有意差を示す ($p < 0.01$)。

3.3.2 高ブドウ糖濃度下におけるブドウ糖毒性の検討

培養神経回路網において、高ブドウ糖濃度下において自発性神経活動頻度が減少することが明らかとなった。高ブドウ糖濃度下に培養神経細胞を長時間 3 日程度暴露した際にブドウ糖毒性が発現し、細胞死が発生することが報告されている [61]。本研究では、およそ 40 分間という短時間の暴露であるが、生体においては 30 mM ブドウ糖濃度はブドウ糖毒性を発現させるのに十分な細胞外ブドウ糖濃度である。そこで、本実験においてブドウ糖毒性の影響が自発性神経活動に現れるかを確認した。

初めにインキュベータから取り出した直後に 10 分間の自発性神経活動を計測し、続いて 30 mM ブドウ糖濃度の細胞外記録溶液に 40 分間暴露した。暴露後の培養神経回路網の細胞外液を培養液に溶液置換した後、CO₂ インキュベータにおいて 24 時間培養し、インキュベータから取り出した直後に 10 分間の自発性神経活動を計測した (図 3.11-3.12)。本実験には E18DIV24-35 の培養神経回路網を使用した。

64 電極より計測した 1 秒間の平均自発性神経活動頻度は、30 mM ブドウ糖濃度暴露前に

において、 495.89 ± 93.77 、30 mM ブドウ糖暴露 24 時間後では 588.59 ± 24.09 （それぞれ平均値 \pm 標準誤差、 $N = 4$ ）であった。また、両条件間でマン・ホイットニーの U 検定による有意差は認められなかった。

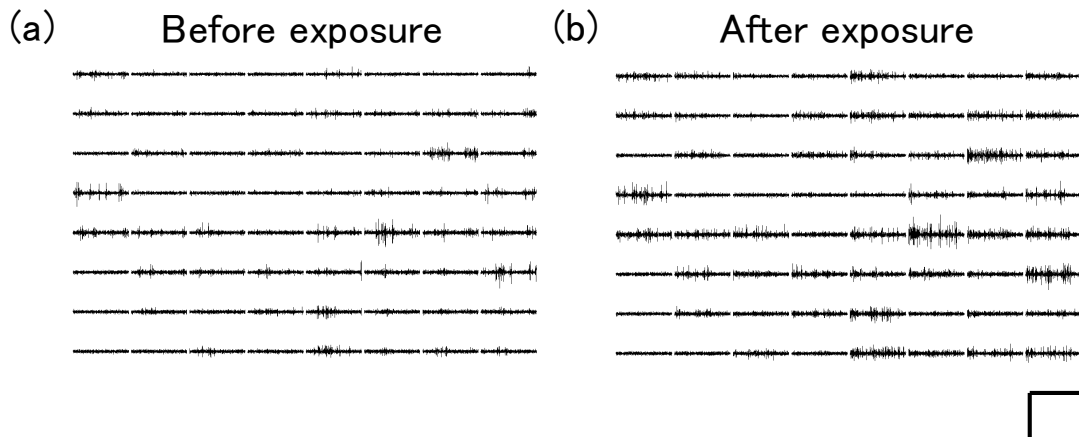


図 3.11 30 mM ブドウ糖濃度の細胞外記録溶液に暴露前，暴露 24 時間後の自発性神経活動 (E18DIV31)。(a) 30 mM ブドウ糖濃度細胞外記録溶液暴露前，(b) 30 mM ブドウ糖濃度細胞外記録溶液暴露 24 時間後。スケールバーは $100 \mu\text{V} \times 200 \text{ms}$ 。

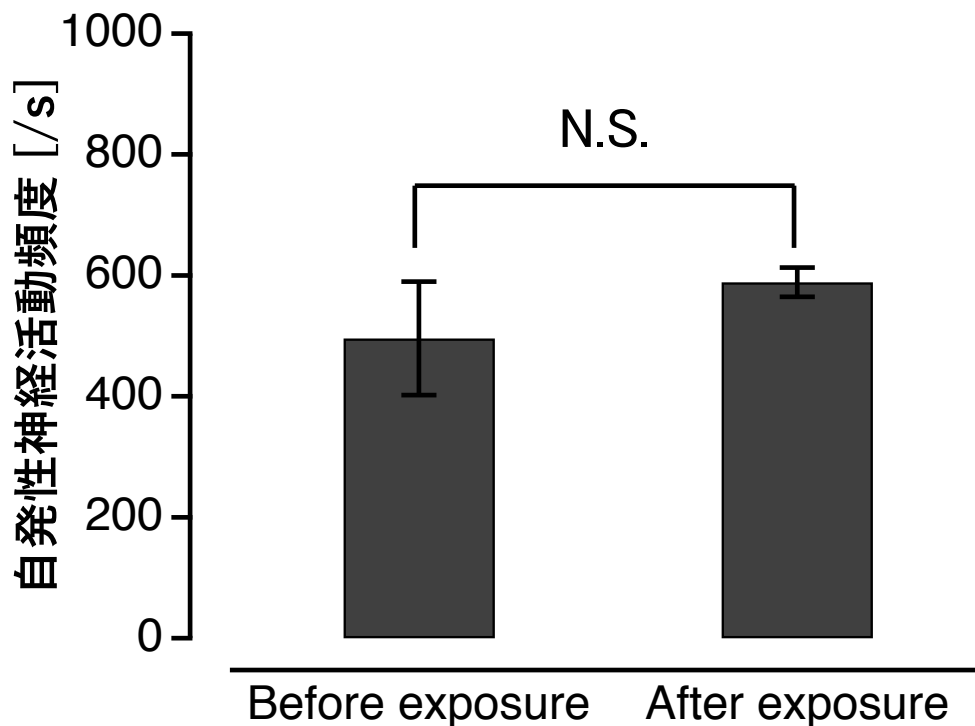


図 3.12 30 mM ブドウ糖濃度細胞外記録溶液に暴露前，暴露後 24 時間後の自発性神経活動頻度。エラーバーは標準誤差を示す (E18DIV24-35, $N = 5$)。

30 mM ブドウ糖濃度溶液に暴露前後で自発性神経活動頻度に有意差は認められないもの

の平均的な自発性神経活動頻度は若干増加し、高ブドウ糖濃毒性による神経細胞死が発生していないことが示唆された。しかしながら、自発性神経活動頻度は神経回路網内の細胞死を直接反映しない可能性がある。そこで、LIVE/DEAD 生存率/細胞毒性キットを用いて暴露後の神経細胞の生死を評価した（図 3.13）。実験には E18DIV24-DIV30 の培養神経回路網を用いた。

同一面積である 5 領域の蛍光画像における死細胞の面積比率は 10 mM ブドウ糖濃度細胞外記録溶液に暴露後は $4.28 \pm 0.82\%$ 、30 mM ブドウ糖濃度細胞外記録溶液に暴露後は $6.53 \pm 0.76\%$ （それぞれ平均値 \pm 標準誤差, $N = 4$ ）、70% エタノール処理による死細胞の蛍光面積は $97.32 \pm 0.53\%$ （平均値 \pm 標準誤差, $N = 6$ ）であった。また、マン・ホイットニーの U 検定により、ブドウ糖濃度 10 mM 細胞外記録溶液の暴露後とエタノール処理による死細胞面積比率との間、ブドウ糖濃度 30 mM 細胞外記録溶液の暴露後とエタノール処理後の面積比率との間に $p < 0.01$ で有意差が認められた。以上の結果より、30 mM ブドウ糖濃度下での自発性神経活動頻度の低下は、ブドウ糖毒性による神経細胞死は殆ど関係していないことが明らかとなった。

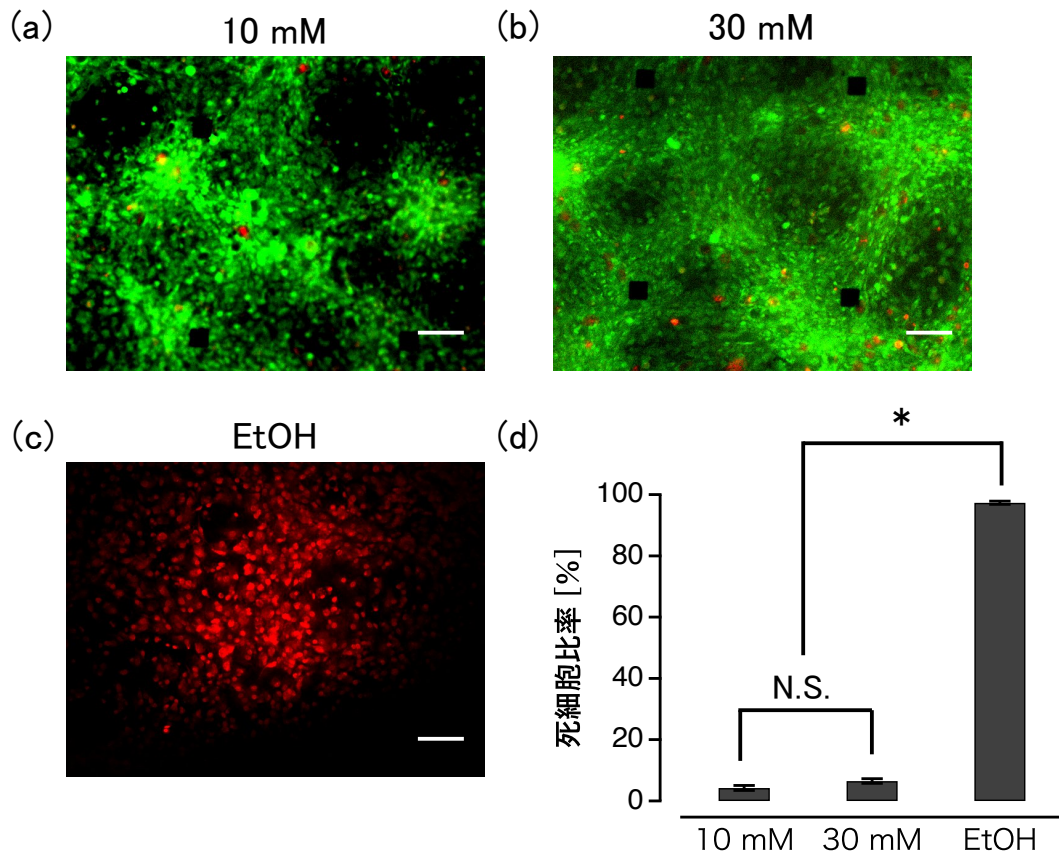


図 3.13 LIVE/DEAD 生存率/細胞毒性キットを用いた生細胞, 死細胞の染色像. (a) 10 mM ブドウ糖細胞外記録溶液暴露後 (E18DIV24), (b) 30 mM ブドウ糖細胞外記録溶液暴露後 (E18DIV24), (c) 70% エタノール暴露後 (E18DIV29), スケールバーはそれぞれ 100 μm . (d) (a) - (c) の死細胞比率. エラーバーは標準誤差を示す (E18DIV24-35, N = 4, 4, 6). * はマン・ホイットニーの U 検定による有意差を示す ($p < 0.01$).

3.3.3 培養時のブドウ糖濃度と細胞外ブドウ糖濃度の関係性

培養神経回路網の自発性神経活動頻度は細胞外ブドウ糖濃度 15 mM において最も高頻度であった. 通常使用している培養液のブドウ糖濃度は 17.5 mM であり, 最も自発性神経活動頻度が高かった 15 mM と近い. このことから, 培養神経回路網の自発性神経活動頻度と細胞外ブドウ糖濃度との関係性は, 培養液のブドウ糖濃度によって調整されている可能性が考えられる.

そこで, ブドウ糖濃度を 30 mM に調整した培養液で培養した神経回路網において細胞外ブドウ糖濃度を変化させて自発性神経活動の計測を行った (図 3.14). 通常の 17.56 mM ブドウ糖濃度培養液で培養した培養神経回路網における 64 電極より計測した 1 秒間の平均自発性神経活動頻度は 668.37 ± 14.12 (平均値 \pm 標準誤差, N = 5), 30 mM ブドウ糖濃度培養液で培養した培養神経回路網における 64 電極より計測した 1 秒間の平均自発性神経活動頻度は

620.40 ± 27.36 (平均値 ± 標準誤差, N = 5) であった。また、両条件の間に有意差は認められなかった。30 mM ブドウ糖濃度の培養液で培養した培養神経回路網においても、ブドウ糖濃度 17.56 mM の培養液で培養した培養神経回路網と自発性神経活動頻度との間に有意な差はなかった。

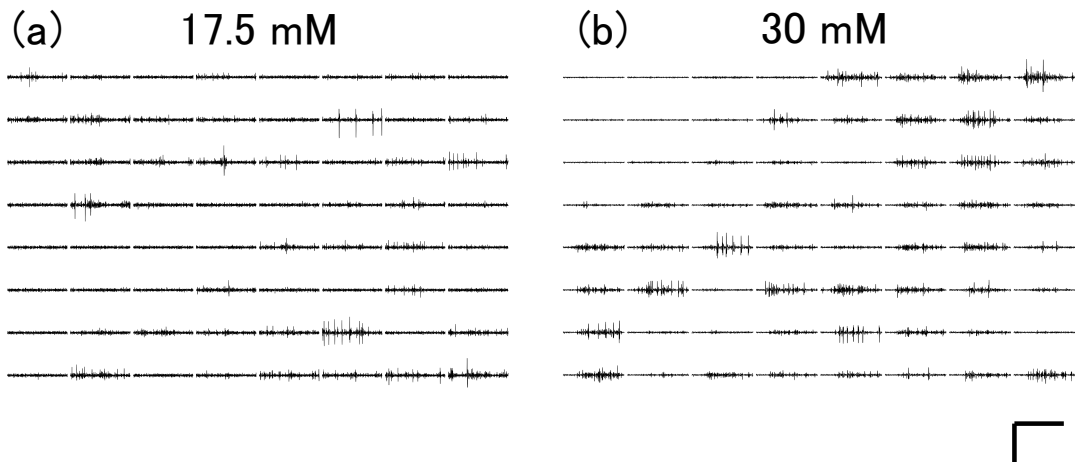


図 3.14 培養液のブドウ糖濃度を変化させて培養した神経回路網の自発性神経活動の一例。(a) 17.5 mM ブドウ糖濃度培養液 (E18DIV31), (b) 30 mM ブドウ糖濃度培養液 (E18DIV31)。スケールバーは 100 μ V \times 200 ms。

続いて、細胞外液を 10, 30, 50 mM ブドウ糖濃度の細胞外記録溶液に溶液置換した場合の自発性神経活動を解析した (図 3.15 - 図 3.16)。実験には DIV27-33 の培養神経回路網を用いた。

64 電極より計測した 1 秒間の平均自発性神経活動頻度は細胞外ブドウ糖濃度が 10 mM の時、193.80 ± 11.69, 30 mM の時 357.32 ± 13.91, 50 mM の時 220.20 ± 14.63 (それぞれ平均値 ± 標準誤差, N = 5) であった。マン・ホイットニーの U 検定により、細胞外ブドウ糖濃度が 10 mM と 30 mM, 30 mM と 50 mM の間で $p < 0.01$ でそれぞれ有意差が認められた。これらの結果から、培養神経回路網の自発性神経活動頻度と細胞外ブドウ糖濃度との関係性は、培養液のブドウ糖濃度により調整されることが示唆された。

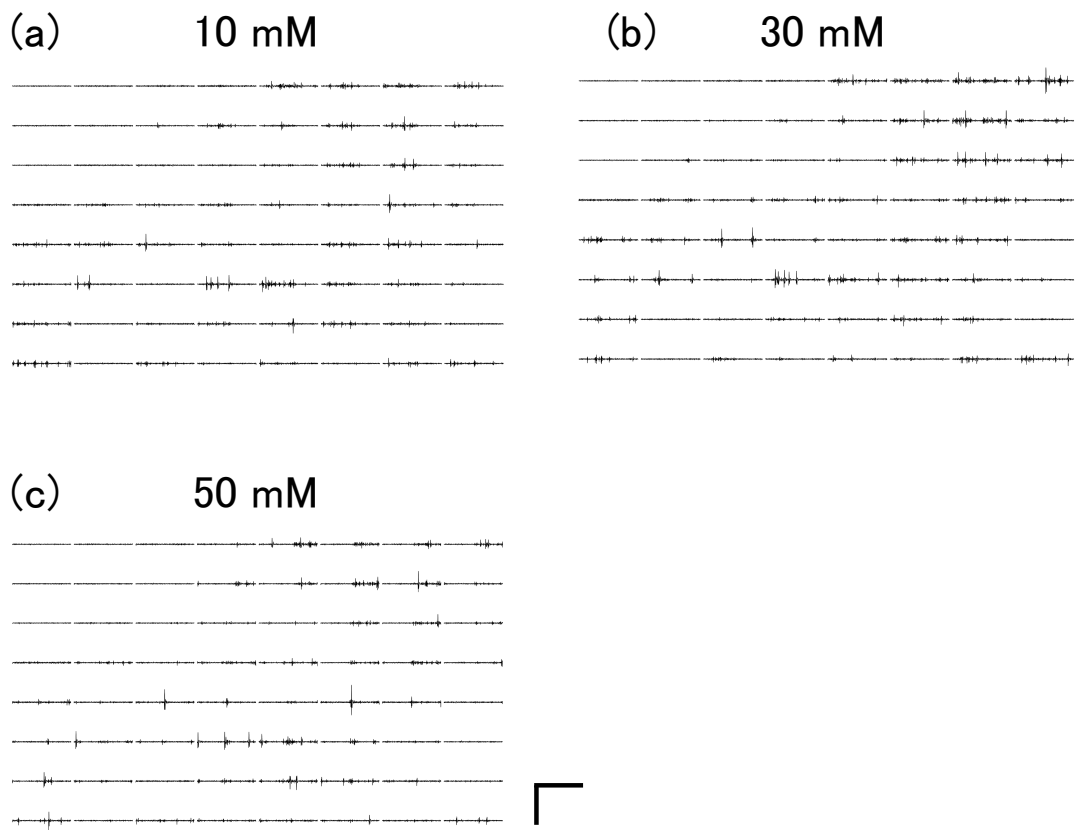


図 3.15 30 mM ブドウ糖濃度で培養した神経回路網における，細胞外ブドウ糖濃度変化依存した自発性神経活動の変化の一例 (E18DIV33)。(a) 10 mM ブドウ糖濃度，(b) 30 mM ブドウ糖濃度，(c) 50 mM ブドウ糖濃度。スケールバーは 100 μV \times 200 ms.

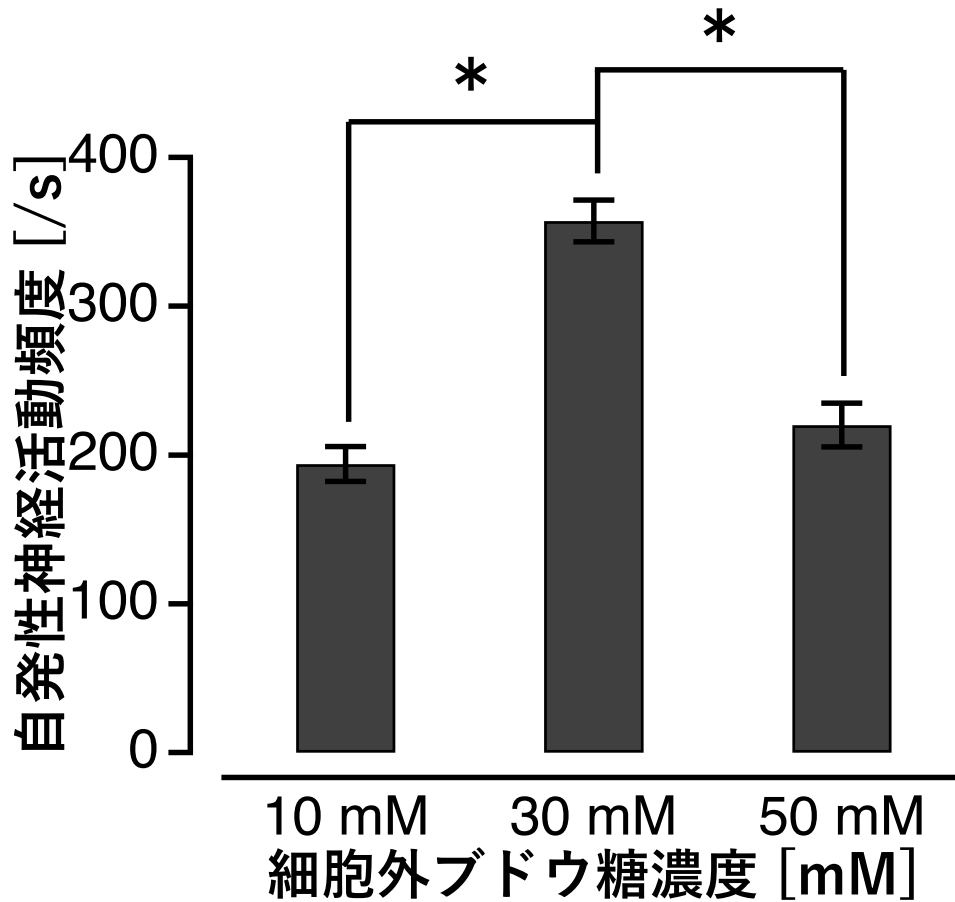


図 3.16 30 mM ブドウ糖濃度で培養した神経回路網において、細胞外ブドウ糖濃度変化依存した自発性神経活動頻度。エラーバーは標準誤差を示す (E18DIV27-33, N = 4)。* はマン・ホイットニーの U 検定による有意差を示す ($p < 0.01$)。

3.3.4 異なるブドウ糖濃度で培養した神経回路網の自発性神経活動

本研究において、17.5 mM ブドウ糖濃度の培養液、初期密度 7800 cells / mm² (30 万 cells 播種) で培養した神経回路網において DIV10 前後から確認される自発性神経活動を確認した。通常の完全培地で培養された神経回路網において、自発性神経活動が培養日数に従って高頻度化し、かつ活動パターンが複雑化する傾向を確認した (図 3.17)。これらの結果はこれまでの報告と一致している [19]。

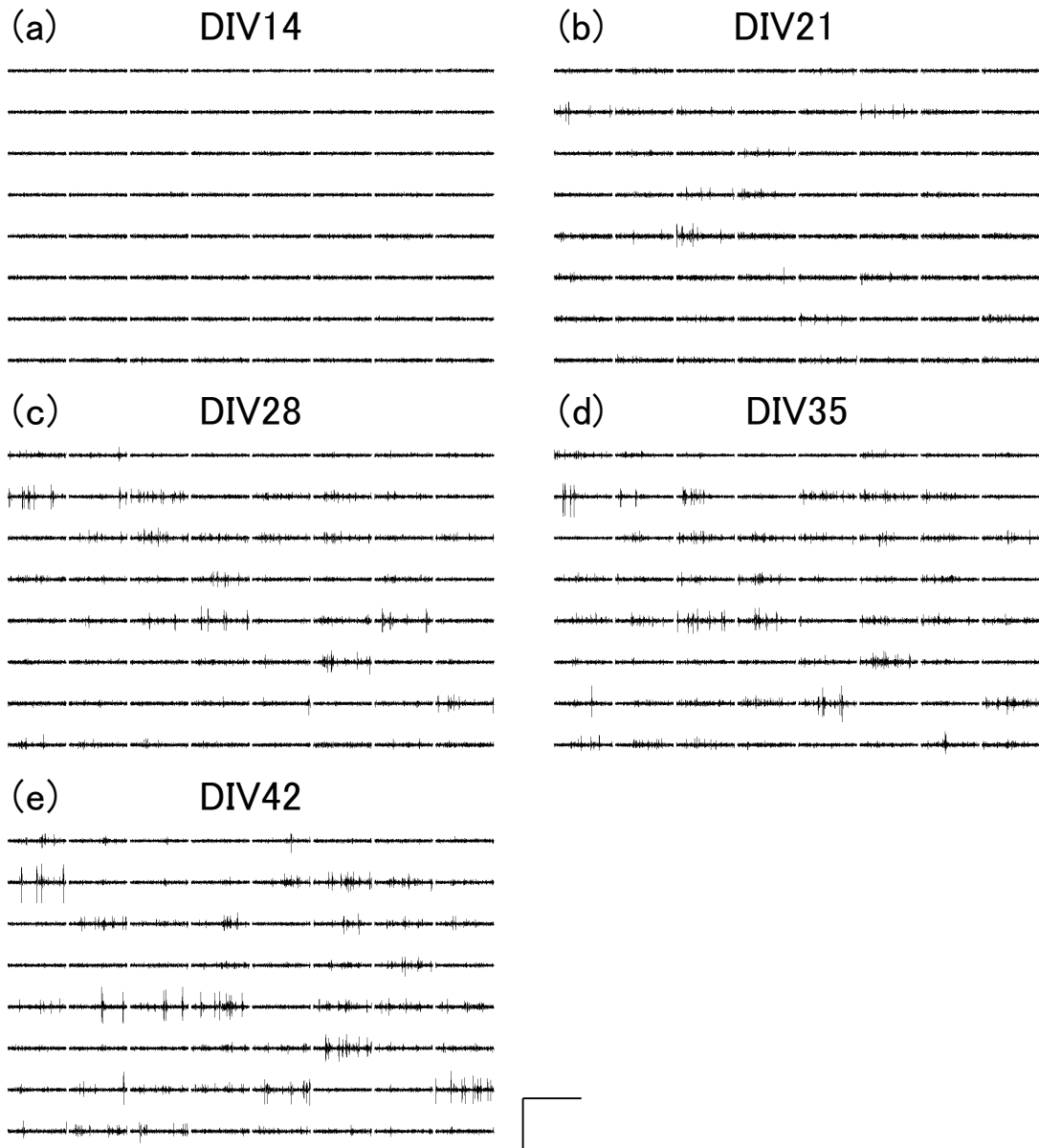


図 3.17 17.5 mM ブドウ糖濃度の培養液，初期密度 7800 cells / mm² で培養した神経回路網の，培養日数に依存した自発性神経活動波形の変化. (a) DIV14, (b) DIV21, (c) DIV28, (d) DIV35, (e) DIV42. スケールバーは 100 μ V \times 200 ms.

続いて，7.5 mM ブドウ糖濃度の培養液で，初期密度 7800 cells / mm²，30 mM ブドウ糖濃度の培養液で，初期密度 7800 cells / mm²，の場合で培養した神経回路網において DIV10 前後から確認される自発性神経活動を確認した. 7.5 mM ブドウ糖濃度の培養液で培養された神経回路網においても，自発性神経活動が培養日数に従って高頻度化し，かつ活動パターンが複雑化する傾向を確認した (図 3.18-3.20).

同一の神経回路網に対して DIV14 から 7 日毎に神経回路網の自発性神経活動を 300 秒間計測した. 計測した全 64 電極における 1 秒間の平均自発性神経活動頻度は，7.5 mM ブドウ糖濃度の培養液・初期密度 7800 cells / mm² で培養した神経回路網において，DIV14 で 4.00 ± 0.62 ，DIV21 で 61.32 ± 9.61 ，DIV28 で 236.32 ± 42.19 ，DIV35 で 288.20 ± 31.45 ，DIV42

で 429.04 ± 54.61 (それぞれ平均値 \pm 標準誤差, $N = 6$), 17.5 mM ブドウ糖濃度の培養液・初期密度 $7800 \text{ cells} / \text{mm}^2$ において, DIV14 で 74.05 ± 25.39 , DIV21 で 118.04 ± 16.51 , DIV28 で 183.65 ± 33.96 , DIV35 で 346.38 ± 30.18 , DIV42 で 532.76 ± 28.27 (それぞれ平均値 \pm 標準誤差, $N = 6$), 30 mM ブドウ糖濃度の培養液・初期密度 $7800 \text{ cells} / \text{mm}^2$ で培養した神経回路網において, DIV14 で 7.67 ± 1.54 , DIV21 で 60.34 ± 13.01 , DIV28 で 202.29 ± 12.46 , DIV35 で 300.61 ± 28.50 , DIV42 で 539.93 ± 9.61 (それぞれ平均値 \pm 標準偏差, $N = 6$) であった. 7.5 mM ブドウ糖濃度と 17.5 mM ブドウ糖濃度との間, 7.5 mM ブドウ糖濃度と 30 mM ブドウ糖濃度との間の DIV42 の自発性神経活動頻度において, マン・ホイットニーの U 検定で有意差が認められた ($p < 0.01$). このように一般的な培養条件である 17.5 mM ブドウ糖濃度の培養液・初期密度 $7800 \text{ cells} / \text{mm}^2$ で培養した神経回路網の自発性神経活動は, 培養日数が経過するに伴って高頻度化したが, 7.5 mM ブドウ糖濃度で培養した神経回路網の自発性神経活動は 17.5 mM, 30 mM ブドウ糖濃度で培養した神経回路網と比して有意に低かった.

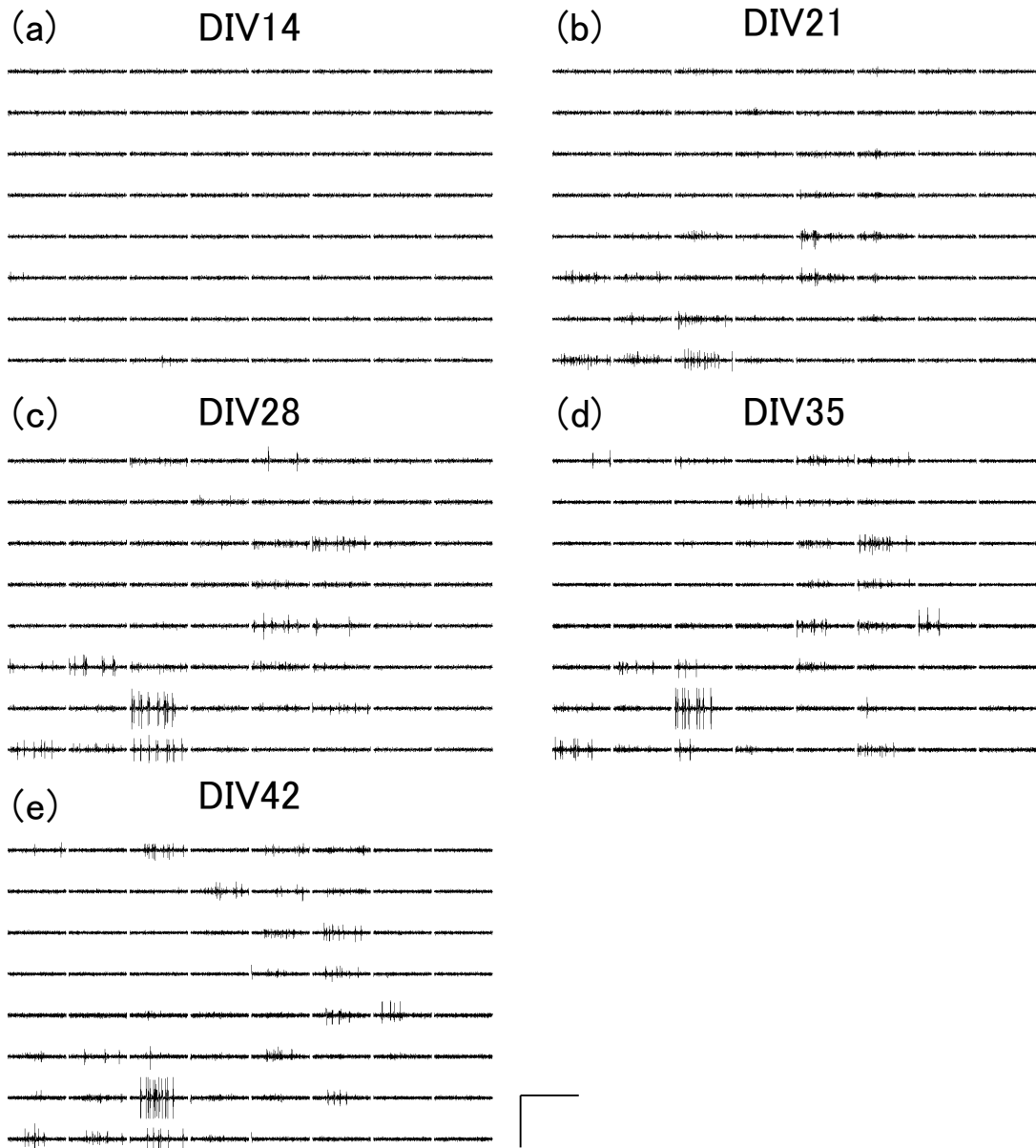


図 3.18 7.5 mM ブドウ糖濃度の培養液・初期密度 7800 cells / mm² で培養した神経回路網の、培養日数に依存した自発性神経活動波形の変化. (a) DIV14, (b) DIV21, (c) DIV28, (d) DIV35, (e) DIV42. スケールバーは 100 μV \times 200 ms.

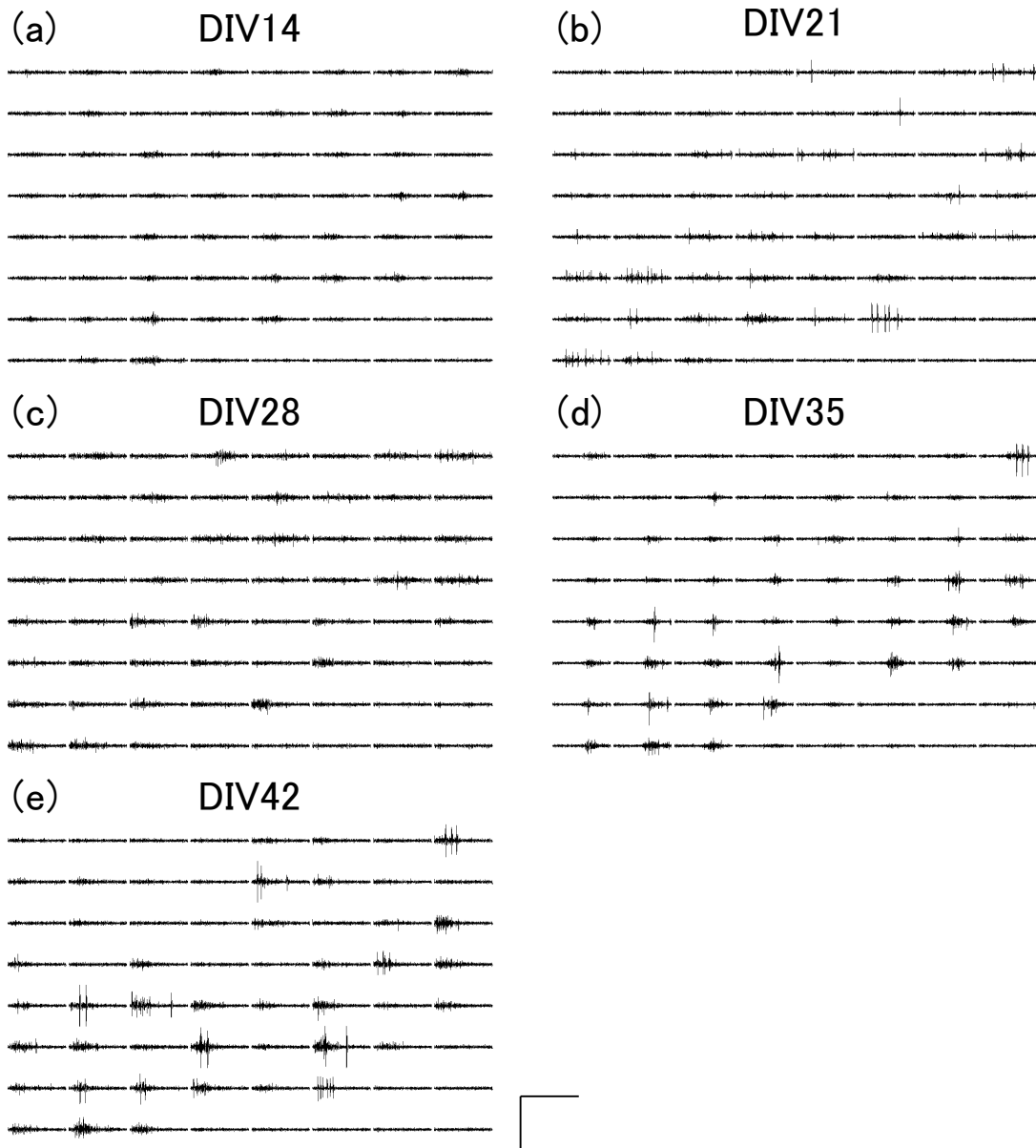


図 3.19 30 mM ブドウ糖濃度の培養液・初期密度 $7800 \text{ cells} / \text{mm}^2$ で培養した神経回路網の、培養日数に依存した自発性神経活動波形の変化. (a) DIV14, (b) DIV21, (c) DIV28, (d) DIV35, (e) DIV42. スケールバーは $100 \mu\text{V} \times 200 \text{ ms}$.

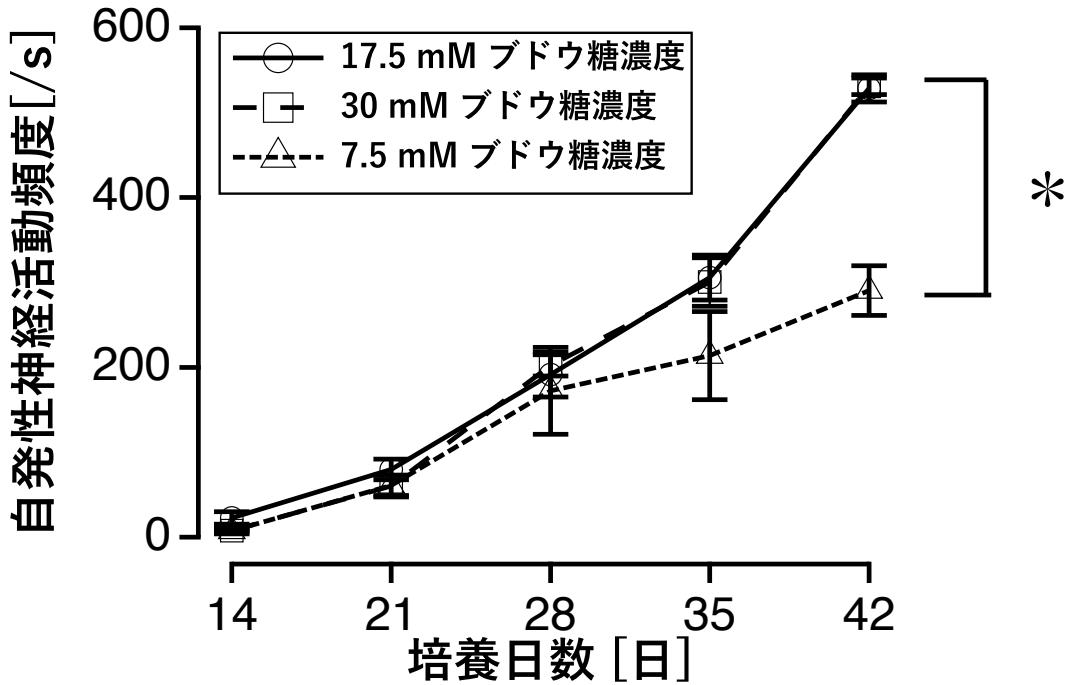


図 3.20 7.5, 17.5, 30 mM ブドウ糖濃度の培養液・初期密度 7800 cells / mm² で培養した神経回路網の培養日数に依存した自発性神経活動頻度。エラーバーは標準誤差を示す (E18DIV14-42, N = 6)。*はマン・ホイットニーの U 検定による有意差を示す (p < 0.01)。

続いて、7.5 mM ブドウ糖濃度の培養液・初期密度 7800 cells / mm²、17.5 mM ブドウ糖濃度の培養液・初期密度 7800 cells / mm² で培養した神経回路網、及び 30 mM ブドウ糖濃度の培養液・初期密度 7800 cells / mm² の条件で培養した神経回路網の自発性神経活動からバースト活動と同期バースト活動を検出した (図 3.21-図 3.22)。計測した全 64 電極における 1 分間の平均自発性バースト活動頻度は、7.5 mM ブドウ糖濃度の培養液・初期密度 7800 cells / mm² で培養した神経回路網において、DIV14 で 4.00 ± 0.62, DIV21 で 61.32 ± 9.61, DIV28 で 236.32 ± 42.19, DIV35 で 288.20 ± 31.45, DIV42 で 429.04 ± 54.61 (それぞれ平均値 ± 標準誤差, N = 6), 17.5 mM ブドウ糖濃度の培養液・初期密度 7800 cells / mm² で培養した神経回路網において、DIV14 で 34.84 ± 7.75, DIV21 で 144.48 ± 12.71, DIV28 で 354.32 ± 22.03, DIV35 で 704.16 ± 62.08, DIV42 で 1062.40 ± 18.33 (それぞれ平均値 ± 標準誤差, N = 6), 30 mM ブドウ糖濃度の培養液・初期密度 7800 cells / mm² で培養した神経回路網において、DIV14 で 0.43 ± 0.051, DIV21 で 7.45 ± 0.98, DIV28 で 35.39 ± 1.03, DIV35 で 51.36 ± 1.82, DIV42 で 85.99 ± 2.63 (それぞれ平均値 ± 標準誤差, N = 6) であった。

また、計測した神経回路網における 1 分間の平均自発性同期バースト活動頻度は、7.5 mM ブドウ糖濃度の培養液・初期密度 7800 cells / mm² で培養した神経回路網において、DIV14 で 6.16 ± 0.69, DIV21 で 19.88 ± 0.91, DIV28 で 27.00 ± 1.52, DIV35 で 44.88 ± 7.38, DIV42 で 29.48 ± 1.68 (それぞれ平均値 ± 標準誤差, N = 6), 17.5 mM ブドウ糖濃度の培

養液・初期密度 $7800 \text{ cells} / \text{mm}^2$ で培養した神経回路網において、DIV14 で 14.32 ± 1.15 , DIV21 で 22.96 ± 0.53 , DIV28 で 27.72 ± 1.19 , DIV35 で 36.64 ± 1.93 , DIV42 で 51.48 ± 4.91 (それぞれ平均値 \pm 標準誤差, $N = 6$), 30 mM ブドウ糖濃度の培養液・初期密度 $7800 \text{ cells} / \text{mm}^2$ で培養した神経回路網において、DIV14 で 0.73 ± 0.071 , DIV21 で 1.76 ± 0.050 , DIV28 で 2.58 ± 0.064 , DIV35 で 4.91 ± 0.56 , DIV42 で 4.95 ± 0.49 (それぞれ平均値 \pm 標準誤差, $N = 6$) であった。ブドウ糖濃度 30 mM の培養液・初期密度 $7800 \text{ cells} / \text{mm}^2$ で培養した神経回路網の自発性バースト活動, 及び自発性同期バースト活動は, ブドウ糖濃度 17.5 mM の培養液・初期密度 $7800 \text{ cells} / \text{mm}^2$ で培養した神経回路網と同様にバースト活動頻度, 同期バースト活動頻度が增加することが明らかとなった。また, それぞれの DIV において通常の完全培地で培養した神経回路網の自発性神経活動と比して頻度については有意差は認められなかった。

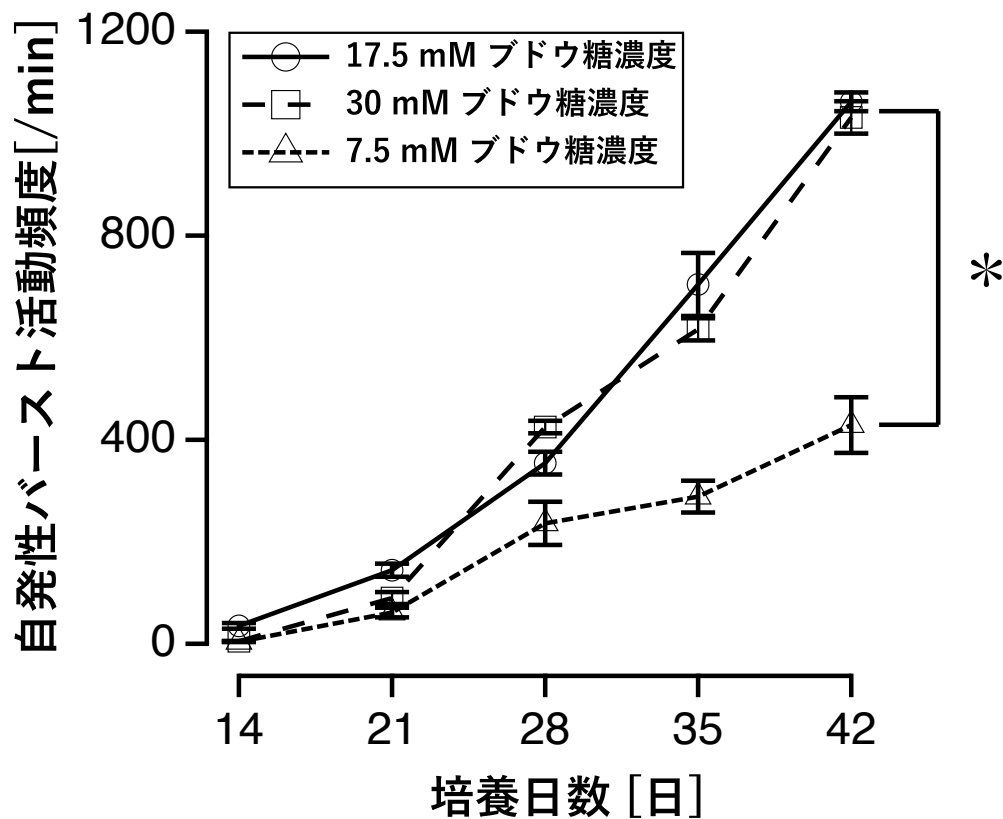


図 3.21 7.5 mM ブドウ糖濃度の培養液・初期密度 $7800 \text{ cells} / \text{mm}^2$, 17.5 mM ブドウ糖濃度の培養液・初期密度 $7800 \text{ cells} / \text{mm}^2$, 30 mM ブドウ糖濃度の培養液・初期密度 $7800 \text{ cells} / \text{mm}^2$ で培養した神経回路網の培養日数に依存した自発性バースト活動頻度。エラーバーは標準誤差を示す (E18DIV14-42, $N = 6$)。* はマン・ホイットニーの U 検定による有意差を示す ($p < 0.01$)。

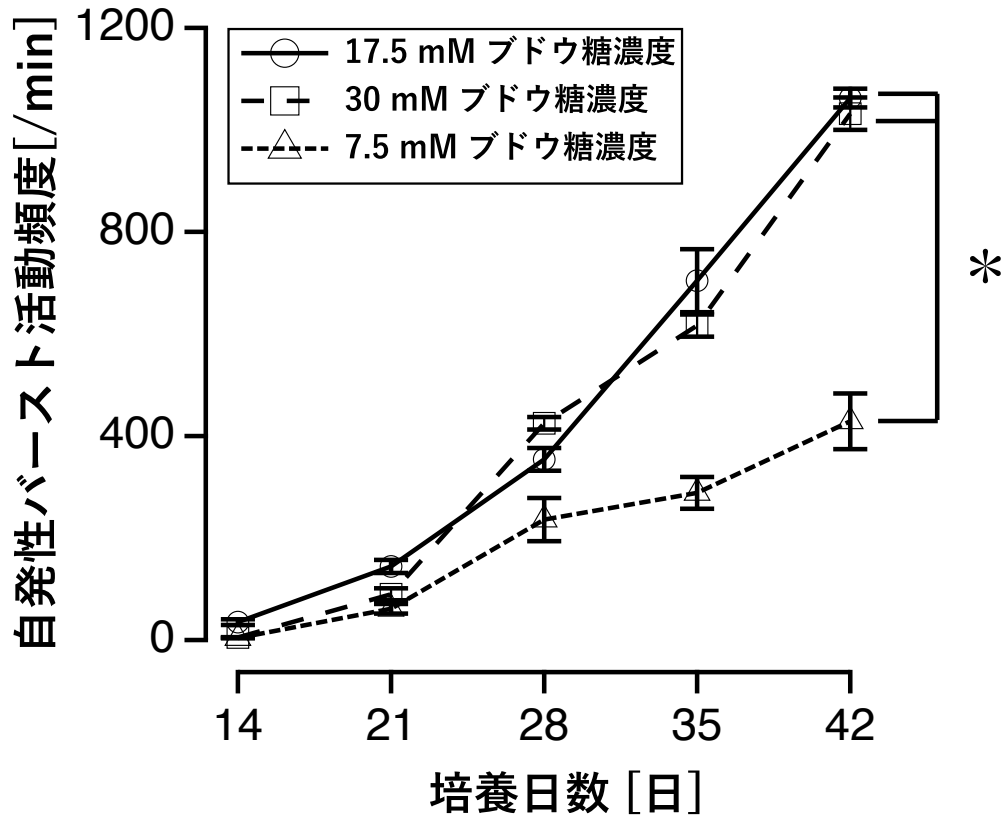


図 3.22 7.5 mM ブドウ糖濃度の培養液・初期密度 $7800 \text{ cells} / \text{mm}^2$, 17.5 mM ブドウ糖濃度の培養液・初期密度 $7800 \text{ cells} / \text{mm}^2$, 30 mM ブドウ糖濃度の培養液・初期密度 $7800 \text{ cells} / \text{mm}^2$ で培養した神経回路網の培養日数に依存した自発性同期バースト活動頻度. エラーバーは標準誤差を示す (E18DIV14-42, N = 6).

3.3.5 低密度で培養された神経回路網の自発性神経活動

ブドウ糖濃度 7.5 mM の培養液・初期密度 $7800 \text{ cells} / \text{mm}^2$ で培養した神経回路網において、自発性神経活動頻度は培養日数が経過するに伴って増加したが、ブドウ糖濃度 17.5 mM の培養液・初期密度 $7800 \text{ cells} / \text{mm}^2$ で培養した神経回路網と比して自発性神経活動頻度が有意に低かった。これは、培養過程で神経細胞同士がシナプスを形成し、神経回路網が成熟することで要求されるエネルギー量が増加するのに対し、培養液中のブドウ糖量が少ないことによる低エネルギー量が律速条件となって神経回路網を構成する個々の神経細胞の活動頻度が減少して擬似的に神経細胞数が少ない場合と同等の自発性神経活動頻度になった可能性と、もしくは神経回路網の成熟に伴って、残存する神経細胞やシナプスの密度が減少した可能性とが考えられる。

一般的に分裂増殖しない神経細胞は、培養日数の経過と共に細胞数が減少する。培養系では、神経細胞は培地に添加されているブドウ糖からしかエネルギーを得ることが出来ないことから、神経回路網を構成する残存神経細胞数又はシナプス密度と培養時のブドウ糖量は相

関があることが考えられる。そこで、ブドウ糖濃度 7.5 mM の培養液・初期密度 7800 cells / mm² で培養した神経回路網の自発性神経活動と、培養された神経細胞数の相関を解析するため、培養開始時に MED プロブに播種する神経細胞の初期密度を 2600 cells/mm² (10 万 cells 播種)、ブドウ糖濃度 17.5 mM の培養液で培養した神経回路網の自発性神経活動を計測した。本実験においても、ブドウ糖濃度 17.5 mM の培養液・初期密度 2600 cells/mm² で培養した神経回路網の自発性神経活動を DIV14 から 7 日毎に 300 秒間計測した (図 3.23, 3.24)。

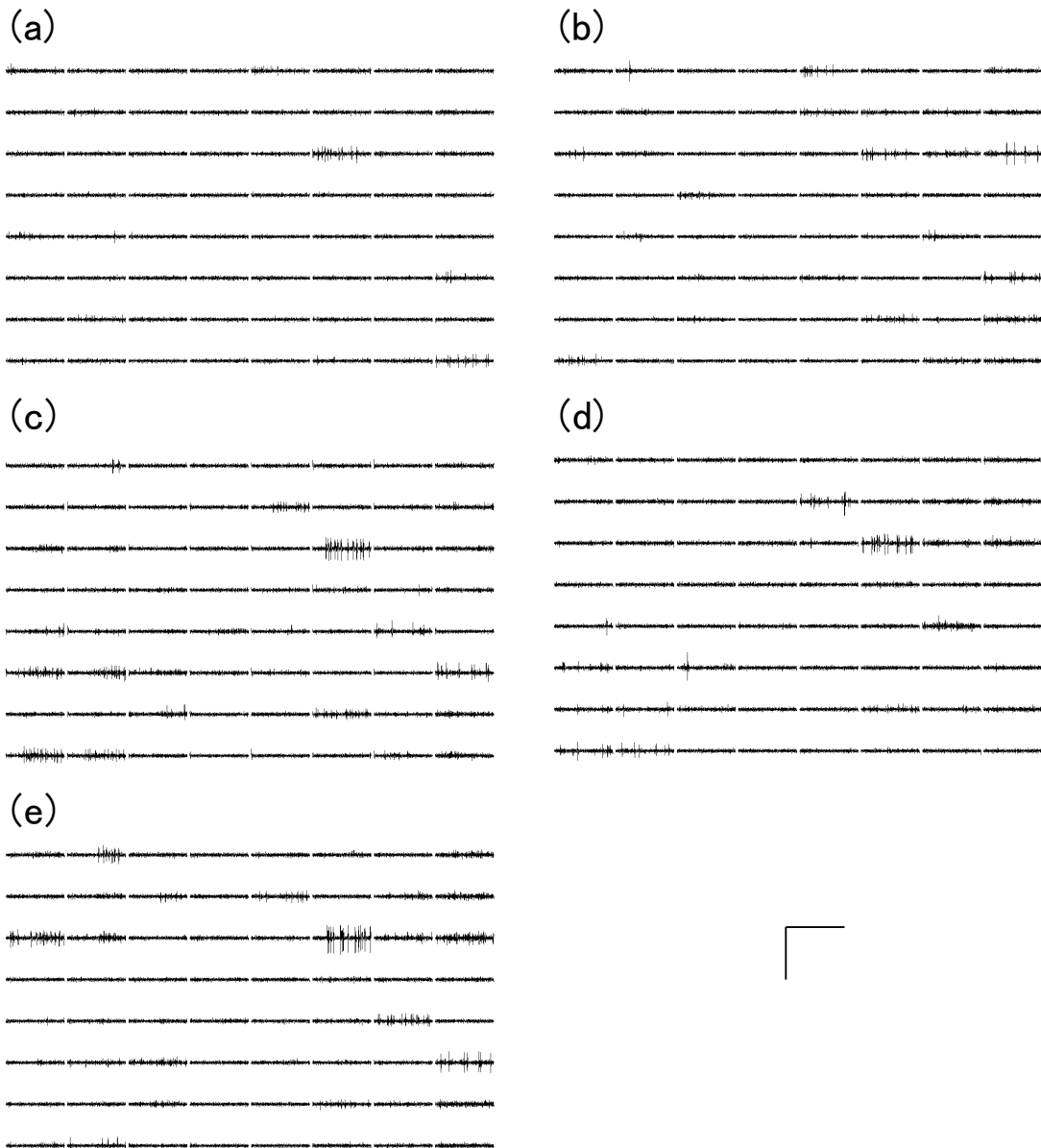


図 3.23 17.5 mM ブドウ糖濃度の培養液・初期密度 2600 cells / mm² で培養した神経回路網の、培養日数に依存した自発性神経活動波形の変化。(a) DIV14, (b) DIV21, (c) DIV28, (d) DIV35, (e) DIV42. スケールバーは 100 μV × 200 ms.

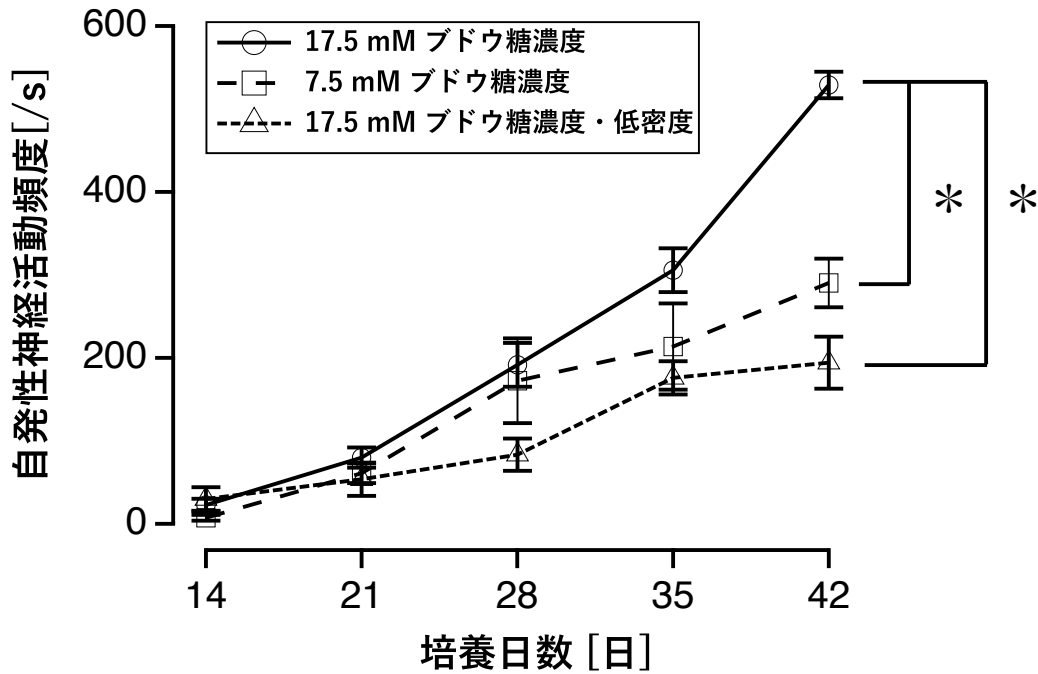


図 3.24 7.5 mM ブドウ糖濃度の培養液・初期密度 7800 cells / mm², 17.5 mM ブドウ糖濃度の培養液・初期密度 7800 cells / mm², 17.5 mM ブドウ糖濃度の培養液・初期密度 2600 cells / mm² で培養した神経回路網の培養日数に依存した自発性神経活動頻度. エラーバーは標準誤差を示す (E18DIV14-42, N = 6). * はマン・ホイットニーの U 検定による有意差を示す (p < 0.01).

計測した全 64 電極における 1 秒間の平均自発性神経活動頻度は、ブドウ糖濃度 17.5 mM の培養液・初期密度を 2600 cells/mm² で培養した神経回路網において、DIV14 で 29.89 ± 14.22, DIV21 で 53.59 ± 20.00, DIV28 で 83.44 ± 19.50, DIV35 で 175.78 ± 19.91, DIV42 で 194.32 ± 31.33 (それぞれ平均値 ± 標準誤差, N = 6) であった. マン・ホイットニーの U 検定によりブドウ糖濃度 17.5 mM の培養液・初期密度 7800 cells/mm² で培養した神経回路網との間で、DIV28 以降の自発性神経活動頻度で p < 0.01 で有意差が認められた. ブドウ糖濃度 17.5 mM の培養液・初期密度を 7800 cells/mm² で培養した神経回路網と比して、初期に播種した細胞数が少ない神経回路網の場合、自発性神経活動の頻度は特に DIV28 以降で有意に低かった.

低密度で培養された神経回路網では、培養日数に依存して自発性神経活動頻度が増加するが、自発性神経活動頻度そのものは高密度で培養された神経回路網に比べて有意に低下した. 自発性神経活動頻度の低下に伴い、自発性バースト活動や自発性同期バースト活動に変化があると考えられる. そこで、本研究では 17.5 mM ブドウ糖濃度の培養液・初期密度 2600 cells / mm² で培養した神経回路網の自発性神経活動からバースト活動と同期バースト活動を検出した (図 3.25,3.26). 計測した全 64 電極における 1 分間の平均自発性バースト活動頻度は、DIV14 で 57.24 ± 14.30, DIV21 で 100.28 ± 20.47, DIV28 で 151.56 ± 22.36, DIV35 で 299.28 ± 14.51, DIV42 で 249.68 ± 20.95 (それぞれ平均値 ± 標準誤差, N = 6) であった.

両条件で培養した神経回路網の自発性神経活動頻度の間において、マン・ホイットニーのU検定により DIV35 の場合に $p < 0.01$ ，DIV42 の場合に $p < 0.01$ の有意差が認められた。

また、計測した神経回路網における1分間の平均自発性同期バースト活動頻度は、DIV14で 11.88 ± 1.26 ，DIV21で 22.68 ± 3.00 ，DIV28で 22.04 ± 0.48 ，DIV35で 38.68 ± 3.21 ，DIV42で 33.64 ± 2.31 （それぞれ平均値 \pm 標準誤差， $N = 6$ ）であった。ブドウ糖濃度 17.5 mM の培養液・初期密度 2600 cells / mm² で培養した神経回路網において、自発性バースト活動、及び自発性同期バースト活動は、ブドウ糖濃度 17.5 mM の培養液・初期密度 7800 cells / mm² で培養した神経回路網と同様にバースト活動頻度が増加することが明らかとなったが、自発性バースト活動頻度においては DIV35 以降で有意に減少した。

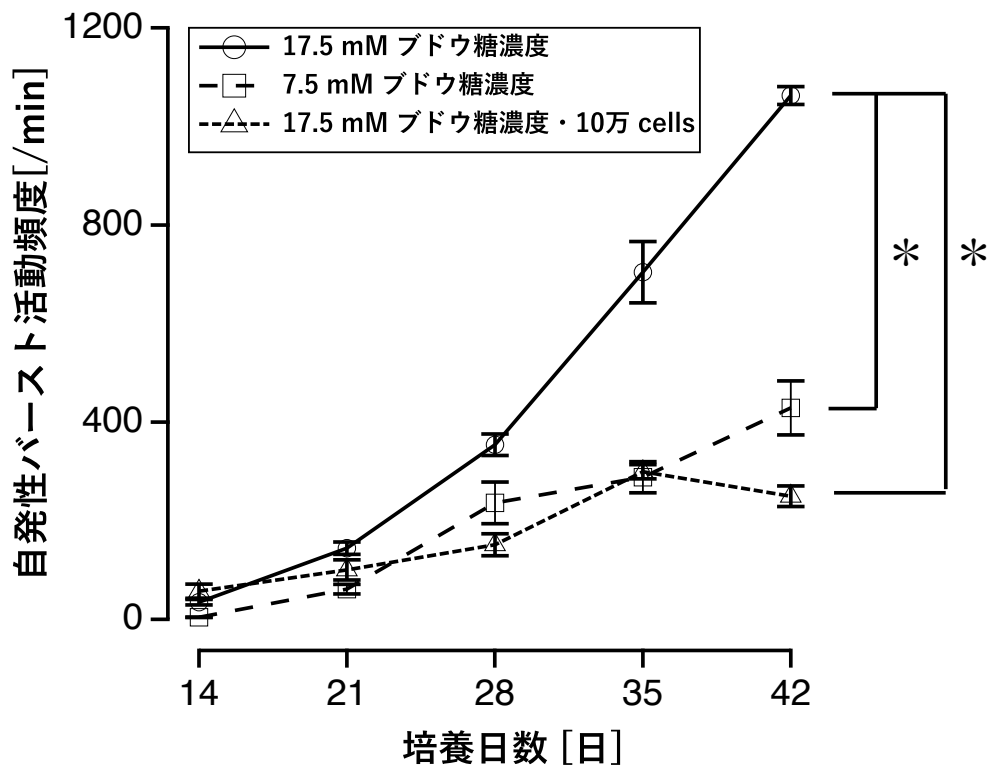


図 3.25 7.5 mM ブドウ糖濃度の培養液・初期密度 7800 cells / mm²，17.5 mM ブドウ糖濃度の培養液・初期密度 7800 cells / mm²，17.5 mM ブドウ糖濃度の培養液・初期密度 2600 cells / mm² で培養した神経回路網の培養日数に依存した自発性バースト活動頻度。エラーバーは標準誤差を示す (E18DIV14-42, $N = 6$)。*はマン・ホイットニーのU検定による有意差を示す ($p < 0.01$)。

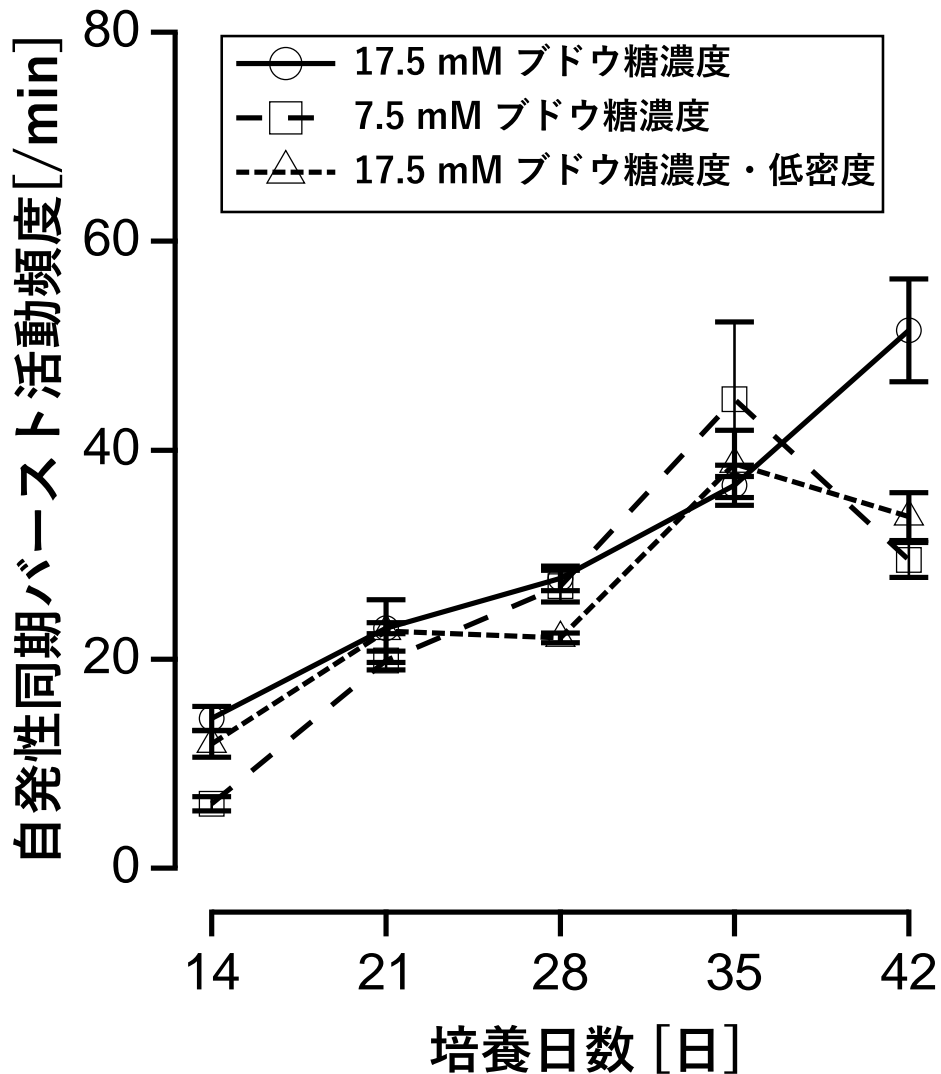


図 3.26 7.5 mM ブドウ糖濃度の培養液・初期密度 7800 cells / mm², 17.5 mM ブドウ糖濃度の培養液・初期密度 7800 cells / mm², 17.5 mM ブドウ糖濃度の培養液・初期密度 2600 cells / mm² で培養した神経回路網の培養日数に依存した自発性同期バースト活動頻度. エラーバーは標準誤差を示す (E18DIV14-42, N = 6).

17.5 mM, 30 mM ブドウ糖濃度の培養液・初期密度が 7800 cells/mm² の培養神経回路網において、自発性神経活動頻度、自発性バースト活動頻度、同期バースト活動頻度に有意差は無かった。自発性神経活動が神経回路網の内部状態を表象する指標であるとすれば、両条件で培養された神経回路網は、培養中のブドウ糖濃度に適応した状態で形成されることが示唆された。

3.4 考察

3.4.1 細胞外ブドウ糖濃度と自発性神経活動頻度との関係性

本研究において、培養神経回路網から MED プローブ上に培養された培養神経回路網の自発性神経活動は細胞外ブドウ糖濃度に依存して変化することが明らかとなった (図 3.9 - 3.10)。培養液のブドウ糖濃度である 17.5 mM 付近までは、自発性神経活動は細胞外ブドウ糖濃度の増加に伴って増加し、それ以上の細胞外ブドウ糖濃度では、逆に自発性神経活動頻度が減少した。従って、培養神経回路網において、至適なブドウ糖濃度は培養液のブドウ糖濃度に近くなることが示唆された。ブドウ糖は神経細胞の主要なエネルギー源であり、生体の脳においては必要量より血糖が不足した場合、神経活動を維持するためアストロサイトに貯蔵されているグリコーゲンの分解によってただちに補填され神経細胞に供給される [69]。しかし、生体と比してグリア細胞の数が少ない培養系では栄養的なサポートが不十分であるため、低ブドウ糖濃度における自発性神経活動頻度の低下は蓋然性がある。活動電位の発生は直接的にブドウ糖濃度によって制御されている訳ではないので、自発性神経活動頻度が細胞外ブドウ糖濃度に強く依存するのは別途何らかのメカニズムが内在していることが考えられる。

3.4.2 ブドウ糖毒性に関する検討

本研究においては 30 mM ブドウ糖の条件で自発性神経活動の減少が観察される、30 mM ブドウ糖は糖尿病において現実的に生じうるブドウ糖濃度であり、グルコース毒性を誘導する条件として用いられる [61]。グルコース毒性とは、解糖系や電子伝達系におけるタンパク分子の糖化、分裂促進因子活性化タンパク質キナーゼ (Mitogen-activated Protein Kinase, MAPK) 系の活性化によって細胞死を引き起こす現象である。しかしながら、30 mM の高ブドウ糖濃度の外液に置換して 40 分間経過した後も、通常の完全培地に戻すことで再び培養を継続することが可能であり、その翌日には自発性神経活動の頻度も実験前と同程度かやや高頻度な状態にまで回復した (図 3.11 - 3.12)。また、カルセイン-AM とエチディウムホモダイマー-1 で染色した画像を解析した結果、10 mM ブドウ糖濃度細胞外記録溶液に暴露したことによる神経細胞の生存率と、30 mM ブドウ糖濃度細胞外記録溶液に暴露したことによる神経細胞の生存率との間に有意な差は見られなかった (図 3.13)。

神経細胞死は培養中에서도日常的に起こっている現象であり、自発性神経活動頻度が有意に低下するほどの神経細胞死が起こっている可能性は低い。従って本系においては、30 mM ブドウ糖下でブドウ糖毒性による不可逆的な変化が生じて、そのために自発性神経活動の頻度が減少している可能性は少ないと考えられる。グルコース毒性の作用は細胞死や神経栄養因子の不全など、その効果が現れるまでに 3 日程度の時間が必要であると考えられるが、本研究で報告している高ブドウ糖濃度での自発性神経活動の減弱は溶液置換後 20 分程度で発現する現象である。時間スケールを考えると、MAP キナーゼ系の活性化 [61] など、グルコース

毒性を引き起こす化学変化が直接シナプス伝達に作用して短期的・可逆的にシナプス伝達を低下させる可能性は考えられる。また、自発性電気活動は神経細胞間の相互作用によって発生するので、過密な回路網活動に伴う頻繁な活動電位発生後の不応期の積算などにより、自発性神経活動が抑制される可能性も考えられる。

細胞外の高ブドウ糖濃度が自発性神経活動頻度を減少させるメカニズムについては、様々な可能性が考えられ、その候補の一つとして ATP 依存性 K^+ チャネル (KATP) による影響が考えられる。SNr における GABA 作動性神経細胞の場合は、KATP が活動頻度の調整に主要な役割を果たしている。KATP は、細胞内の ATP 量が多い場合に、開孔確率が上昇する K^+ チャネルであり、これが細胞内 ATP の検出に関与している可能性が報告されている [37,38]。KATP は海馬領域にも存在することが報告されており [39]、本系においても細胞の興奮性が KATP により調節されることで自発性神経活動頻度が制御されている可能性がある。

本研究では、生体内のホメオスタシスやブドウ糖のセンシングには積極的に関与していないと考えられる海馬の神経細胞においても、ブドウ糖濃度の増加に伴って自発性神経活動が活発化すること、20 mM 以上の高濃度では却って自発性活動は減弱することを示した。これは神経細胞の代謝により細胞内 ATP の量が影響を受けた結果であると考えられる。

3.4.3 高ブドウ糖濃度下で培養された神経回路網のグルコース至適濃度のシフト

本研究では、ブドウ糖濃度を 30 mM の高濃度にして培養した培養神経回路網における自発性神経活動も計測した。30 mM ブドウ糖濃度の培養液で培養した神経回路網と、通常の 17.5 mM ブドウ糖濃度の培養液で培養した神経回路網における自発性神経活動頻度には有意な差がなく (図 3.14)、高ブドウ糖濃度の培養液を用いた培養によって自発性神経活動頻度が著しく低下することはなかった。これは、自発性神経活動頻度が単純にブドウ糖の多寡によって決定されているわけではなく、神経細胞の成熟、グリア細胞の数、神経回路網におけるシナプス密度や興奮/抑制性シナプスの割合など様々なパラメータによる影響を受け、最終的にある平衡状態に達することでその神経回路網特有の活動パターンが生成されているためであり、ブドウ糖濃度によってこれらのパラメータが変化しても相互に補填されるためであると考えられる。また、30 mM ブドウ糖濃度の培養液で培養した培養神経回路網における細胞外ブドウ糖濃度が 30 mM の時、自発性神経活動頻度が最大であった (図 3.15 - 3.16)。このことは、培養時のブドウ糖を高濃度に変更したことで、自発性神経活動頻度に対する培養神経回路網の自発性神経活動頻度と細胞外ブドウ糖濃度の間にある至適濃度が高濃度側にシフトしたことを示唆している。従って、神経細胞は培養時のブドウ糖濃度に適応し、その濃度との差分によって自発性神経活動頻度を決定していると考えられる。

細胞外ブドウ糖濃度は、生体にとって生存か死を決定する重要性をもつ。生存に結びつく状態が「快」であると解釈すれば、ブドウ糖の至適濃度は各神経細胞が個別に識別しうる報酬信号と考えることができる。あえて飛躍を恐れずに言えば、細胞外ブドウ糖濃度に依存し

た自発性神経活動の変化は、生体の最も始原的な情動を反映した活動の変化だと考えられる。

3.4.4 培養時のブドウ糖濃度に依存した神経回路網形成

本実験において、ブドウ糖濃度 17.5 mM・初期密度 7800 cells/mm² で培養した神経回路網の自発性神経活動を DIV10 前後から確認した。分散培養した神経回路網の自発性神経活動は、培養日数の経過に伴って自発性神経活動頻度が増加し、活動パターンが変化するという知見が多く報告されており [6, 19, 20]、分散播種された神経細胞が自律的にシナプス結合を形成して、再構成された神経回路網においても、回路網の成熟と情報処理には相関があると考えられる。本研究においても、神経細胞の初代培養において一般的なブドウ糖濃度である 17.5 mM で培養した神経回路網の自発性神経活動を DIV14 から 7 日毎に計測した結果、培養日数の経過に依存して自発性神経活動パターンが複雑になり、自発性神経活動頻度が増加したことが確認された。

培養神経回路網の自発性神経活動は、培養日数の経過に伴って広範囲で同期的なバースト状の活動を呈することが報告されている [6, 19, 25]。本研究で用いた培養系でも培養日数が経過することでバースト活動が観察された (図 3.21-図 3.22)。通常の条件で培養された神経回路網において、培養日数の経過に伴って自発性バースト活動頻度と自発性同期バースト活動頻度が増加した。バースト活動は神経回路網の機能的な構造変化を表現していると考えられており [25]、神経回路網の成熟・発展において重要な役割を示すと考えられている。

また、ブドウ糖濃度を低濃度 (7.5 mM)、及び高濃度 (30 mM) に調整した培養液を用いて MED プローブ上で神経回路網を培養した。培養中に自発性神経活動を計測、解析することで神経回路網培養時の細胞外ブドウ糖濃度の変化による影響を解析した。ブドウ糖濃度 30 mM の培養液・初期密度 7800 cells/mm² で培養した神経回路網を培養の自発性神経活動を DIV14 から 7 日毎に計測した結果、ブドウ糖濃度 30 mM の培養液・初期密度 7800 cells/mm² で培養した神経回路網と同様に自発性神経活動頻度、自発性バースト頻度、自発性同期バースト頻度が培養日数の経過に伴って増加した (図 3.20)。また、自発性同期バースト活動に関しては、DIV35 において僅かに自発性同期バースト活動頻度が増加したが、有意差は無く自発性神経活動を指標とした場合に両条件の間に差は少ないことが示された。自発性神経活動が神経回路網の内部状態を表象すると考えると、この両条件の間に内部条件の差が無く、分散播種された神経細胞は培養時のブドウ糖濃度に適応して神経回路網を形成することが示唆された。

一方、ブドウ糖濃度 7.5 mM の培養液・初期密度 7800 cells/mm² で培養した神経回路網の自発性神経活動頻度は、培養日数の経過に伴って増加したが、ブドウ糖濃度 17.5 mM の培養液・初期密度 7800 cells/mm² で培養した神経回路網と比して自発性神経活動頻度と自発性バースト活動頻度が有意に低下し、自発性同期バースト活動頻度には有為な差は無かった (図 3.23, 3.24)。これは、低ブドウ糖濃度下で培養することにより、自発性神経活動やバースト活動を発生させるためのエネルギーが不足し、活動を分散して同期的な活動を維持した可能性がある。また、神経細胞を低密度で播種し、培養した神経回路網においても通常の条

件で培養した神経回路網と比して自発性神経活動頻度、自発性バースト活動頻度は低下するが、自発性同期バースト活動頻度に有意な差は無かった。これらの結果から、神経回路網は構成する細胞数が少ない場合でも一部の神経細胞が同期的な神経活動を維持するよう調整されたことが考えられる。

3.5 結論

分散培養された神経回路網における自発性神経活動頻度は、細胞外ブドウ糖濃度により変化し、培養中のブドウ糖濃度に近い 15 mM で最大となった。また、細胞外ブドウ糖濃度が 20 mM 以上の高濃度である場合、神経活動頻度は却って減衰することが明らかとなった。

培養液のブドウ糖濃度である 17.5 mM は、自発性神経活動頻度を最大にする 15 mM に近く、さらにブドウ糖濃度が 30 mM である培養液で培養した培養神経回路網では、細胞外ブドウ糖濃度 30 mM で自発性神経活動頻度が最大となった。この結果から、培養神経回路網は、培養時の細胞外ブドウ糖濃度に適応し、その差分に反応して自発性神経活動を調整している可能性が示唆された。

神経細胞の初代培養に一般的なブドウ糖濃度よりも高いブドウ糖濃度で培養した場合、自発性神経活動頻度は飽和し、変化しなかった。また、一般的な条件よりも低ブドウ糖濃度で培養した場合、培養条件に合わせた形で全体的な神経活動頻度が調整されている可能性を示した。特に低ブドウ糖濃度で培養した神経回路網では、自発性神経活動頻度、自発性バースト活動頻度が減少したが、同期バースト活動頻度を維持するよう神経回路網が形成されることが示唆された。

これらのことから、分散培養神経回路網は回路網形成の段階で外部の環境に適応してその規模や活性度を調整している可能性が考えられる。

第 4 章

ファジィ自己組織化マップを用いた神経電気活動の識別

4.1 序論

外界の事象は、それぞれに対応する感覚器からの入力によって誘導された神経活動パターンに表象されると考えられている [70]. 従来の知見では、外界の情報が単一の神経細胞及び複数の神経細胞によって一対一対応的に表現されるという仮説が提唱されてきた [71]. この仮説には、有限である単一神経細胞の活動が外界の無数の事象と対応付けられるのか、という問題が生じる. また、ある事象に対応した神経細胞が死滅した場合、その事象に関する記憶を全て失ってしまうという脆弱性が生じる. 脳内において、神経細胞の死滅は日常的に起きる現象であり、この仮説では脳内での情報の保持に支障をきたす可能性が高い. 現在では脳の情報表現は特定の神経細胞集団により分散的に実現されているという説が有力であり [72], 神経回路網は実際にこの分散表現に適した特性を持つ. 神経回路網は多数の神経細胞により構成されており、その電気活動は複雑な時空間ダイナミクスを形成している. 従って、物理的な構造が同一であるような神経回路網においても多数の同期的な神経電気活動パターンが形成され得る. このような、同期的な活動パターンを形成する神経細胞集団を D.O. ヘップはセルアセンブリと表現した [70]. 神経回路網においては、特定の情報に対して対応するセルアセンブリが存在し、活動する神経細胞の組み合わせによる神経活動の時空間パターンが情報表現となることを提唱した. このように、神経回路網が動的にグループを形成して活動することで、複雑で多様な活動パターンを形成し、外界の無数にある事象に対して組み合わせで表現することが可能である. 現在、このセルアセンブリ仮説は神経科学において基本的な理論となっている.

本研究では、MED プローブ上に培養したラット胎児大脑海馬由来の神経回路網が発する神経電気活動を計測し、解析した. MED プローブ上で培養した神経回路網は、外部からの刺激入力が無い状態で発生する自発性神経活動を計測可能である他、選択した特定の電極に対して刺激電流を印加することで誘発応答を計測することが可能である [45]. 特定の電極を複数回電流刺激した際に発生する誘発応答の活動パターンは互いに類似しており、概ね再現可能である. 更に、異なる電極を電流刺激した際の誘発応答は互いに異なり、その活動パターンは分離することがある [41]. この活動パターンの分離は、神経回路網が独立した固有のサブネットワークを持ち、異なる入力に対して複数の神経電気活動パターンで表象することが可能であることを示唆する. このように、神経回路網が発する神経電気活動の時空間パターンは、神経回路網の内部状態を表現しており、何らかの情報表現を行っていると考えられる [44]. また、自発性神経活動は神経回路網の応答にとっては雑音であり、誘発応答は互いに独立した神経電気活動であるとされてきたが、近年では自発性神経活動は特定の時空間パターンを内包し、神経回路網の内在的な状態を表現していると考えられつつある [9,31,73]. さらに自発性神経活動と誘発応答は同一の神経回路網が発生する神経電気活動であるため、その2つの活動は相互に影響し合っていると予想される.

神経回路網の時空間ダイナミクスにおいて、自発性神経活動を神経回路網の内部状態の指

標として解析した例が報告されている [74]. 分散培養された神経回路網において, 自発性神経活動が DIV10 前後から観察される. MEA を用いた研究例により, 自発性神経活動は培養初期には無相関に神経活動を起こしているが, 1 週間を経過するまでに周期的かつ同期的に活動する傾向に変化することが報告されている [75]. 一定期間以上培養された神経回路網は, その自発性神経活動が培養日数に依存して同期的に変化する [6, 19, 76]. 特徴的なのは, 神経電気活動が高密度にかつ同期的に発生するネットワークバーストと呼ばれる神経電気活動で, 神経回路網の情報表現において重要な空間パターンであるとされている. このように, 外部からの入力に応答して神経回路網が発する神経電気活動は特徴的な空間パターンとして外界の事象を表現することが理論のみならず生体の神経回路網においても確認されている.

本研究では, MED プローブ上で培養されたラット胎児海馬由来神経回路網の自発性神経活動と誘発応答を計測し, 神経電気活動が表現する空間パターンを識別することを試みた. 結果として, 自発性神経活動と誘発応答は同じ空間パターンを共有し, 誘発応答は自発性神経活動が持つ豊富な空間パターンを電流刺激の印加により再現よく引き出された結果である可能性が示唆された.

3 章で報告したように, 自発性神経活動パターンが細胞外ブドウ糖濃度変化によって影響されるのであれば, 同じ空間パターンを共有している誘発応答の空間パターンも大きく影響を受けると考えられる. つまり, 自発性神経活動と誘発応答との関係性が細胞外ブドウ糖濃度によって影響されるのであれば, 神経電気活動による情報表現が個々の細胞のエネルギー供給状態によって影響を受けることになり大変興味深い.

4.2 実験材料・手法

本章での実験に関しては, 細胞培養と細胞外電位多点計測の基本的な手法については第 2 章で記述した手法と同様である. ここでは, 実験スキームについてのみ記述する.

4.2.1 誘発応答

本研究では, 自発性神経活動に加え, 電流刺激による誘発応答を計測した. MED プローブ上の 2 個の異なる電極に電流刺激を印加した際に発生する誘発応答を計測した. 誘発応答を解析するためには, 誘発応答が再現よく発生する電極に刺激電流を印加する必要がある. 本研究において, 刺激電流を印加する電極 (刺激電極) の選定スキームは以下の通りである. まず, 自発性神経活動を 3 分間計測し, 電極ごとの自発性神経活動頻度を検出した. 自発性神経活動が高頻度で検出される電極は, 電極近傍に神経細胞が存在する可能性が高いため, 検出された自発性神経活動頻度が上位の電極から順に刺激電流を 5 秒ごとに 10 回印加し, 誘発応答が再現よく確認出来る電極を刺激電極として選定した. また, 本研究では誘発応答パターンが異なる 2 個の刺激電極を選択するため, 誘発応答の活動パターンが出来る限り重複しない 2 電極を選定した. 印加する刺激電流の振幅は, 培養された神経細胞と電極との位置

関係や、電極の状態によって変化するが、刺激印加による細胞へのダメージを最小限に抑えるため、十分な誘発応答が確認出来る最低限の振幅に留めた。本研究では、刺激電流の振幅は $5\mu\text{A}$ 程度であった。

細胞外電位多点計測システムで計測・保存されたデジタル化された細胞外電位データに対し、低域カットオフ周波数 200 Hz 、高域カットオフ周波数 2000 Hz のバンドパスデジタルフィルタを適用し、移動平均との差分を算出して波形を平坦化させ、本論文の第2章で記述した手法により平均値と標準偏差を基準として算出された閾値を 100 ミリ秒 ごとに設定し、閾値を超えた振幅のピーク点をスパイクとして検出した。

続いて、計測されたデジタル細胞外電位データから神経活動を表すスパイクを検出した。本実験では、刺激電流印加直後 3 ミリ秒 の細胞外電位は刺激電流印加によるアーティファクトとして、スパイク検出前に除外した。

本実験では、神経電気活動パターンを 64 電極それぞれから 100 ミリ秒 ごとに検出されたスパイク数を要素とする 64 次元特徴ベクトルとして表現した。この特徴ベクトルはある時刻における神経電気活動の空間パターンのスナップショットである (図 4.1)。

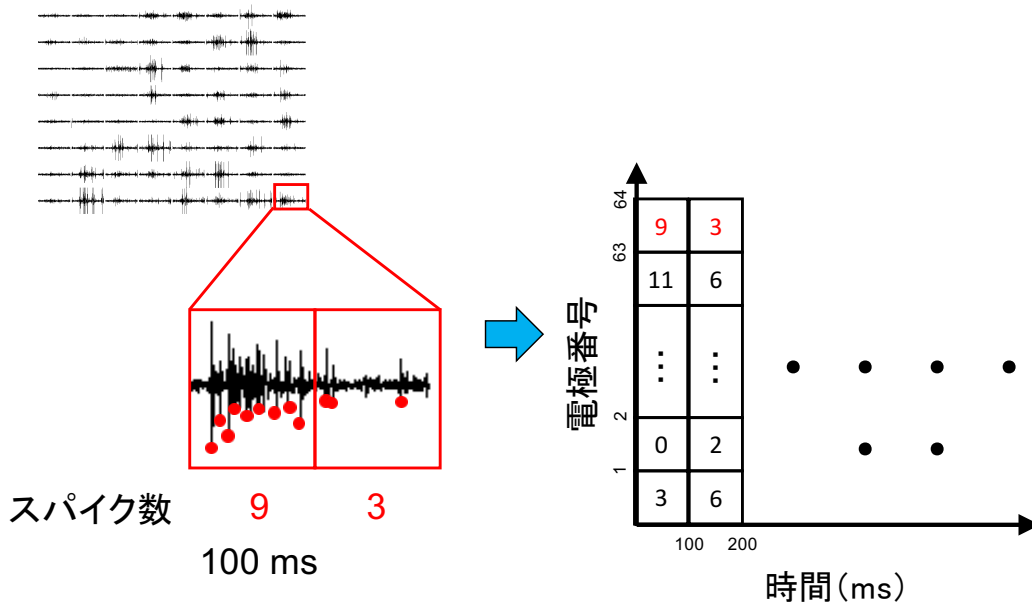


図 4.1 64 次元特徴ベクトルの作成方法概要。

4.2.2 自己組織化マップによる神経電気活動パターンの識別

本研究では、 64 個のそれぞれの電極から計測された神経活動のスパイク数を 64 次元特徴ベクトルを入力とし、随時教師無し学習を行いながら入力された多次元ベクトルを 2 次元平面上に写像する自己組織化マップ (Self-Organization Map, SOM) を用いて神経電気活動パターンを識別した。SOM はニューラルネットワークの一種であり、高次元データ同士の類似度を指標として 2 次元マップ上に次元縮約するパターン解析手法である。本研究では、類似

度の指標としてベクトル間のユークリッド距離を用いた SOM (Euclidian-SOM, E-SOM) を用いた。

E-SOM の 2 次元出力層の各ユニット t は, i 番目に入力された入力ベクトルの各要素に対応した 64 次元の参照ベクトルを持つ。それぞれの参照ベクトルは神経電気活動の空間パターンを示す。SOM の入力層に特徴ベクトルを時系列順に入力し, 参照ベクトルとのユークリッド距離が最小となるユニットをそれぞれの勝者ユニットとして決定した (図 4.2, 式 4.1, 4.2)。

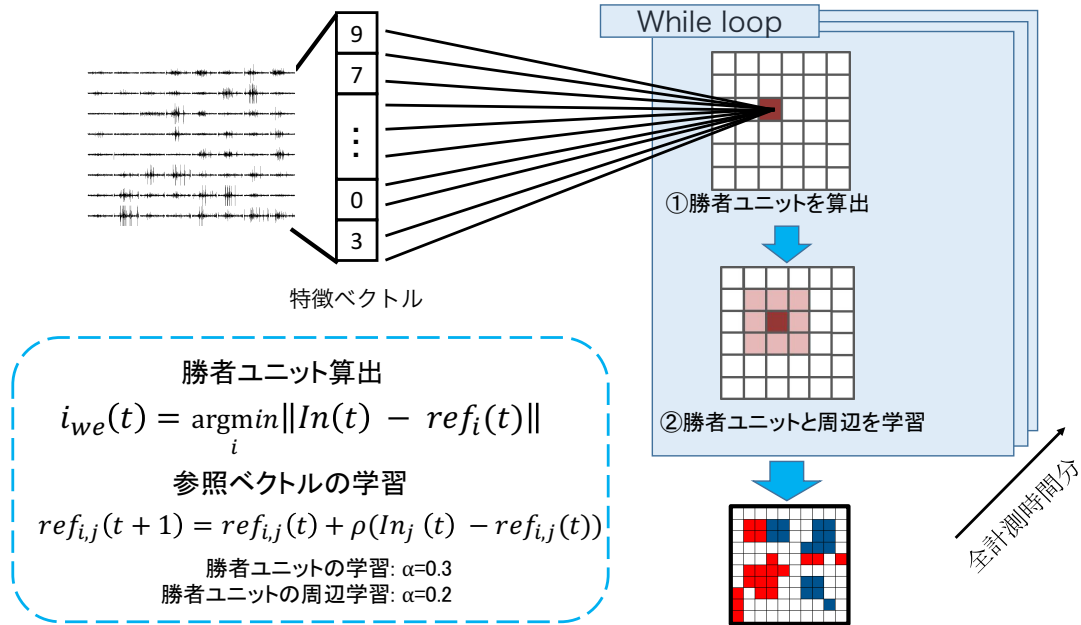


図 4.2 E-SOM の概要.

$$i_{we}(t) = \operatorname{arg min}_i \|In(t) - ref_i(t)\| \quad (4.1)$$

$$W_e(t) = W(i_{we}(t)) \quad (4.2)$$

ここで, $i_{we}(t)$ は, t 番目の入力に対する勝者ユニットのユニット番号, $W_e(t)$ は t 番目の入力に対する E-SOM の勝者ユニットを, $In(t)$ は t 番目の入力ベクトル, $ref_i(t)$ は t 番目の入力ベクトルと比較する i 番目の参照ベクトルを示す。勝者ユニットの選出後, 選出されたユニットの参照ベクトルを入力された特徴ベクトルの値に近づけるように学習させた。同時に, 勝者ユニットの周辺のユニットの参照ベクトルも入力された特徴ベクトルの値に近づけた。本研究では, 勝者ユニットと勝者ユニットの周辺半径 3 ユニットを学習させた (式 4.3)。

$$ref_{i,j}(t+1) = ref_{i,j}(t) + \rho(In_j(t) - ref_{i,j}(t)) \quad (4.3)$$

ここで, $ref_{i,j}(t+1)$ は i 番目の参照ベクトルの j 番目の要素を, ρ は学習係数を, $In_j(t)$ は入力ベクトルの j 番目の要素を示す。学習計数は, 勝者ユニットにおいては 0.3, 勝者ユニットの周辺ユニットにおいては 0.2 と経験的に決定した。

自己組織化マップは、時系列順に入力されたベクトルに対して教師無し学習を繰り返し行い、結果として2次元マップ空間（出力層）上の近傍同士のユニットは類似した参照ベクトルを持ち、互いに類似した入力パターンに対する勝者ユニットとなる。

E-SOM は類似した神経活動パターンに対応する勝者ユニットは出力層の近傍に写像するが、勝者ユニットが出力層のどのユニットに写像されるかは各ユニット（参照ベクトル）の初期値に大きく依存する。従って、特定の神経活動パターンを識別するためには、予め想定された領域に勝者ユニットを写像する必要がある。そこで、本研究では異なる2個の電極に電流刺激を印加した時に発生する誘発応答（誘発応答1, 2）と刺激が入力されていない時に発生する自発性神経活動を計測し、E-SOM 出力層に対する初期値として設定した。

初期値には、5秒ごとに誘発応答1, 誘発応答2, 自発性神経活動を100ミリ秒計測する試行を1スweepとし、それぞれの活動から得た64次元特徴ベクトルをE-SOMの各初期値として設定した。本研究では、E-SOMの出力層を経験的に30×30の900ユニットとした。初期値設定の回数は経験的に300スweepとし、出力層の1-10列目は誘発応答1, 11-20列目は自発性神経活動, 21-30列目は誘発応答2の特徴ベクトルを入力した(図4.3)。

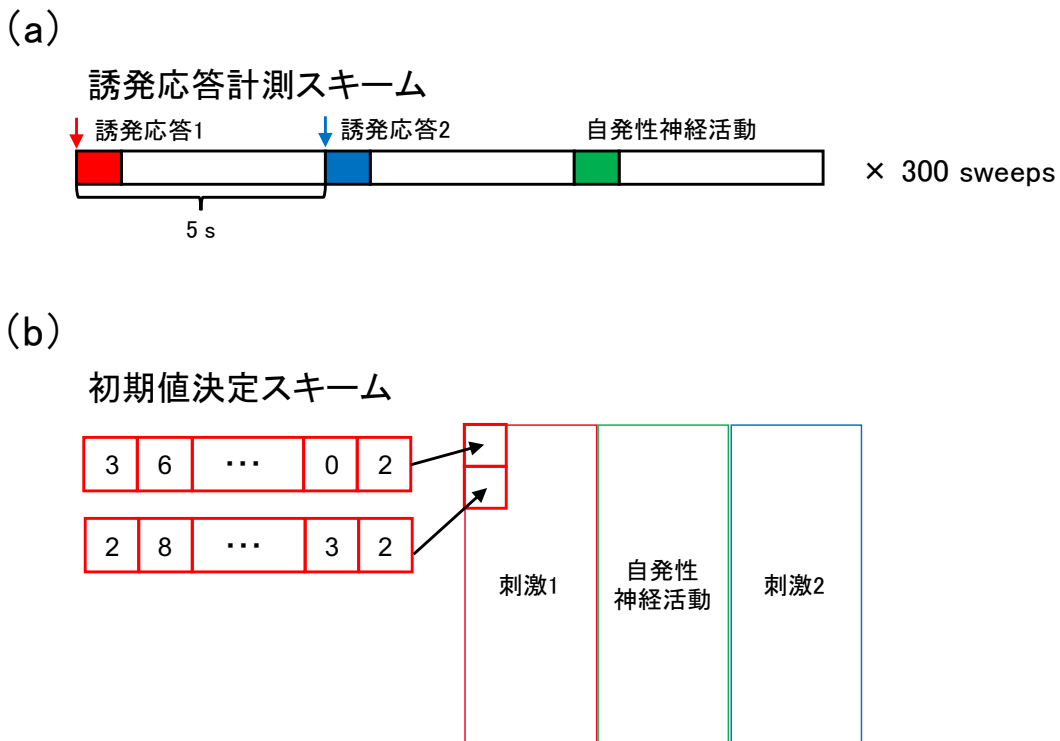


図 4.3 E-SOM 出力層の初期ベクトル決定方法。(a) 誘発応答の計測スキーム, (b) E-SOM の初期値決定スキーム。

4.2.3 ファジィ自己組織化マップによる神経電気活動パターンの識別

神経電気活動を初めとする生物のデータはばらつき、曖昧性を持つ。本研究では、曖昧性を取り扱う目的で SOM をファジィ化した Fuzzy-SOM (F-SOM) を用いた。F-SOM では、入力ベクトルと参照ベクトルとの類似度の指標を三角型メンバシップ関数の適合度とし、参照ベクトルの各要素にメンバシップ関数を格納した (図 4.4-a)。

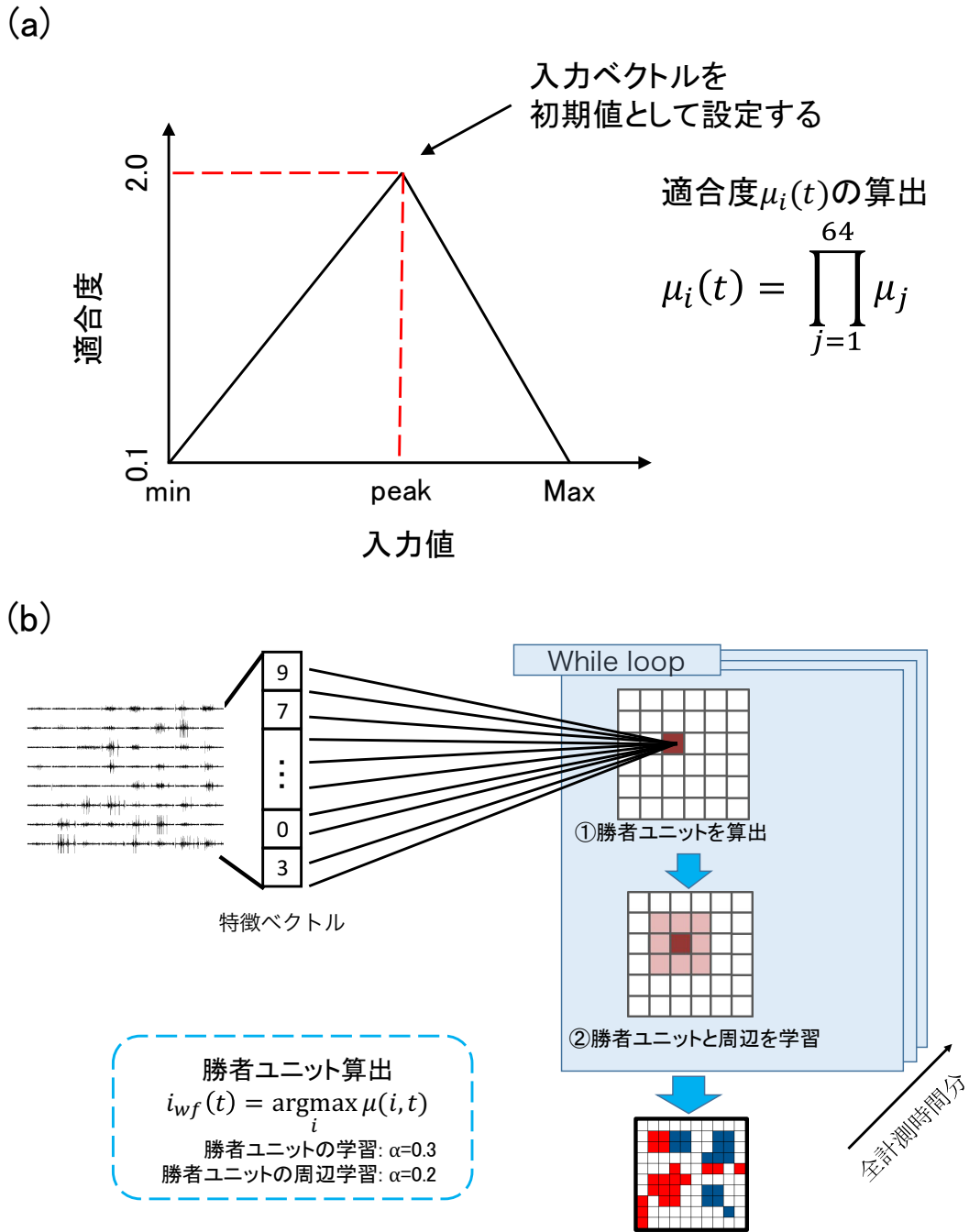


図 4.4 F-SOM の概要. (a) 三角型ファジィメンバシップ関数の概要と適合度 $\mu_i(t)$ の算出, (b) F-SOM の勝者ユニット決定方法の概要.

メンバシップ関数は入力の最小値 (min), 適合度のピーク (peak), 最大値 (Max) で構成される。本研究では, メンバシップ関数の入力の最小値を 0, 最大値を各電極における 100 ミリ秒毎の最大のスパイク数とした。また, 適合度は 0.1 から 2 とした。

F-SOM の 2 次元出力層の各ユニット i は, t 番目に入力された入力ベクトルの各要素に対応した 64 次元の参照ベクトルを持つ。SOM の入力層に特徴ベクトルを時系列順に入力し, t 番目の入力ベクトルと i 番目の参照ベクトルとの適合度を求めた (式 4.4)。

$$\mu_i(t) = \prod_{j=1}^{64} \mu_j \quad (4.4)$$

ここで, $\mu_i(t)$ は t 番目の入力ベクトルと i 番目のファジィルールとの適合度を, μ_j は入力ベクトルの j 番目の要素と参照ベクトルの j 番目の要素のメンバシップ関数に入力したときのファジィ数を示す。F-SOM では, μ_i が最大となるユニットをそれぞれの勝者ユニットとして決定した (図 4.4-b, 式 4.5, 4.6)。

$$i_{wf}(t) = \arg \max_i (\mu(i, t)) \quad (4.5)$$

$$W_f(t) = W(i_{wf}(t)) \quad (4.6)$$

ここで, ここで, $i_{wf}(t)$ は, t 番目の入力に対する勝者ユニットのユニット番号, $W_f(t)$ は t 番目の入力に対する F-SOM の勝者ユニットを, $In(t)$ は t 番目の入力ベクトル, $ref_i(t)$ は t 番目の入力ベクトルに対応する i 番目の参照ベクトルを示す。勝者ユニットの選出後, 選出されたユニットのメンバシップ関数のピークに対する入力を, 入力された特徴ベクトルの値に近づけるように学習させた。同時に, 勝者ユニットの周辺のユニットの参照ベクトルについても同様にした。本研究では, 勝者ユニットと勝者ユニットの周辺半径 3 ユニットの学習させた。学習は最急降下法を用い, 学習係数は勝者ユニットにおいては 0.3, 勝者ユニットの周辺ユニットにおいては 0.2 と経験的に決定した。

F-SOM においても, E-SOM と同様に異なる 2 個の電極に電流刺激を印加した時に発生する誘発応答 (誘発応答 1, 2) と刺激が入力されていない時に発生する自発性神経活動を計測し, F-SOM 出力層に対する初期値を設定した。

初期値には, 5 秒ごとに誘発応答 1, 誘発応答 2, 自発性神経活動を 100 ミリ秒計測する試行を 1 スウィープとし, それぞれの活動から得た 64 次元特徴ベクトルの各要素を, 三角型メンバシップ関数の頂点の位置として F-SOM の各初期値として設定した。本研究では, F-SOM の出力層を経験的に 30×30 の 900 ユニットのとした。初期値設定の回数は経験的に 300 スウィープとし, 出力層の 1 – 10 列目は誘発応答 1, 11 – 20 列目は自発性神経活動, 21 – 30 列目は誘発応答 2 の特徴ベクトルを入力した (図 4.5)。

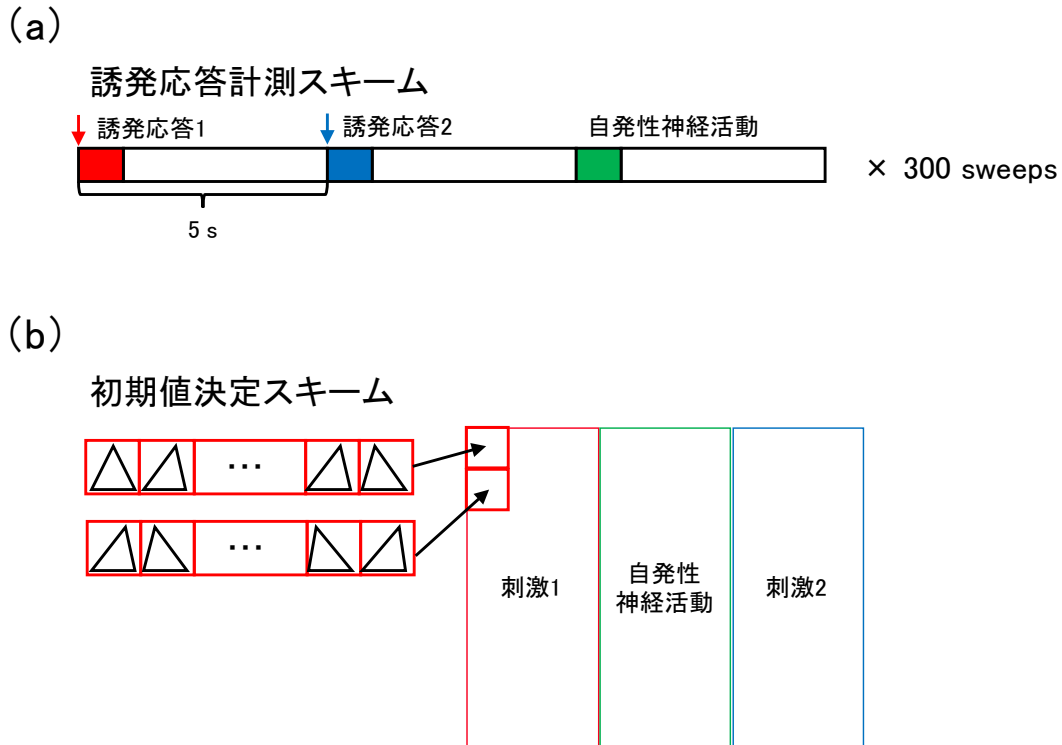


図 4.5 F-SOM 出力層の初期ベクトル決定方法. (a) 誘発応答の計測スキーム, (b) F-SOM の初期値決定スキーム.

4.2.4 神経活動パターン解析の実験スキーム

電流刺激に対する神経活動の応答パターンを解析するため、5 秒ごとに 100 ミリ秒の誘発応答 1, 誘発応答 2, 自発性神経活動を計測した. この 1 連の計測を 1 スウィープとし, 本研究では 500 スウィープ計測した細胞外電位データから得た特徴ベクトルを E-SOM, F-SOM にそれぞれ入力した.

SOM は入力された特徴ベクトルに対応する勝者ユニットを選定した. 全計測時間分の特徴ベクトルを入力後, SOM の出力結果よりそれぞれの勝者ユニットの空間的分布を解析した.

また, 本論文 3 章で用いた手法と同様の方法で細胞外記録溶液に溶液置換し, 細胞外ブドウ糖濃度が 10 mM, 30 mM の場合の電流刺激に対する神経活動の誘発応答パターンを解析した. 5 秒ごとに 100 ミリ秒の誘発応答 1, 誘発応答 2, 自発性神経活動を計測した. この 1 連の計測を 1 スウィープとし, 本研究では 500 スウィープ計測した細胞外電位データから作成した得た特徴ベクトルを E-SOM, F-SOM にそれぞれ入力した. 本実験では, 細胞外ブドウ糖濃度が 10 mM の状態で 5 秒ごとに誘発応答 1, 誘発応答 2, 自発性神経活動を 100 ミリ秒計測する試行を 1 スウィープとし, 300 スウィープ計測した 64 次元特徴ベクトルを初期値とした.

4.3 実験結果

4.3.1 自発性神経活動と誘発応答パターンの識別

本研究で用いた培養神経回路網において、自発性神経活動、誘発応答 1、誘発応答 2 を確認した (図 4.6)。自発性神経活動、誘発応答 1 及び誘発応答 2 はそれぞれ異なった空間パターンを示した (図 4.7)。

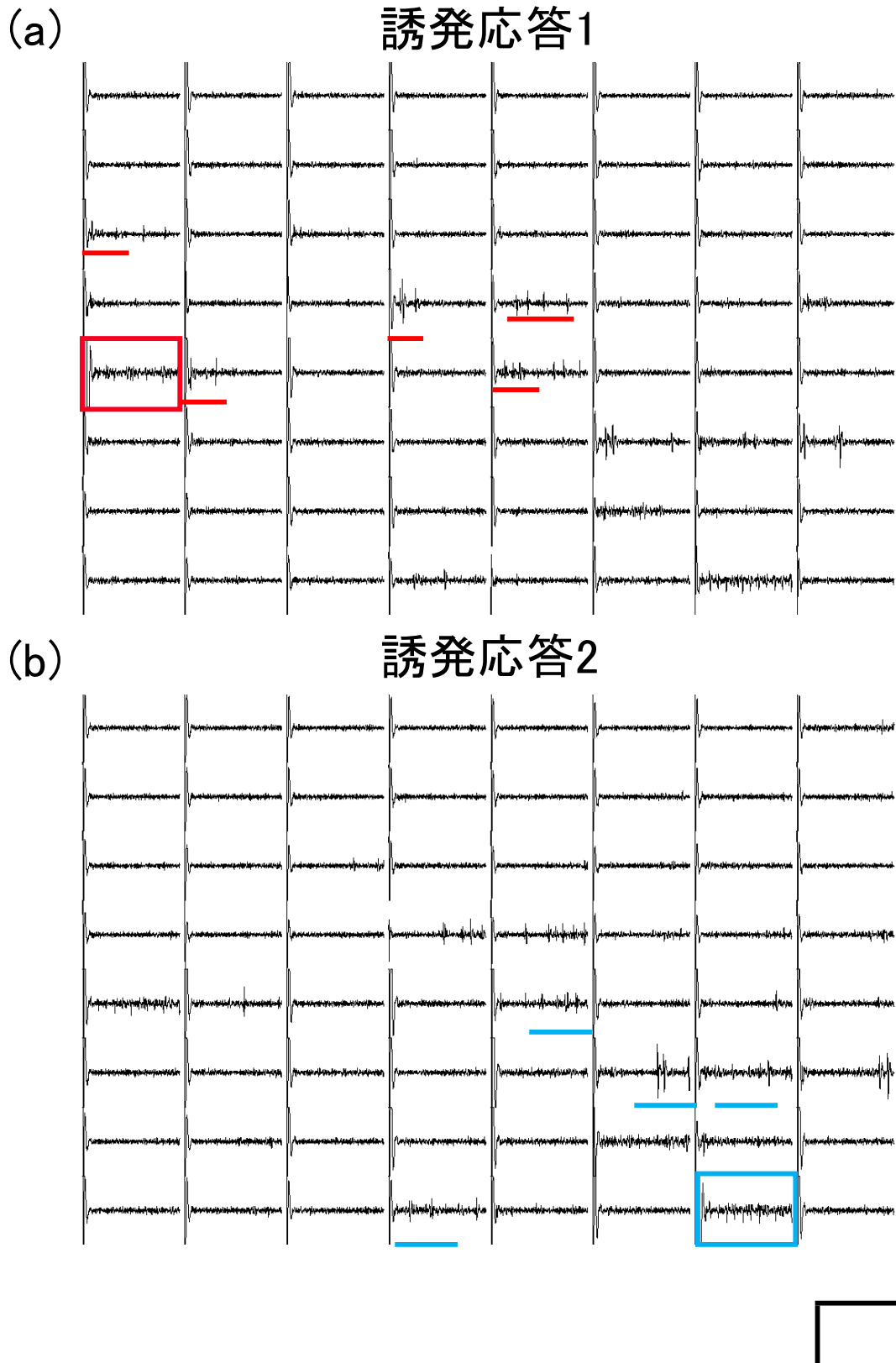


図 4.6 誘発応答 1, 2 の神経電気活動の一例 (E18DIV43). (a) 誘発応答 1. 赤枠は刺激電極を, 赤線は刺激誘発応答を示す. (b) 誘発応答 2. 青枠は刺激電極を, 青線は刺激誘発応答を示す. スケールバーは $200 \mu\text{V} \times 100 \text{ms}$.

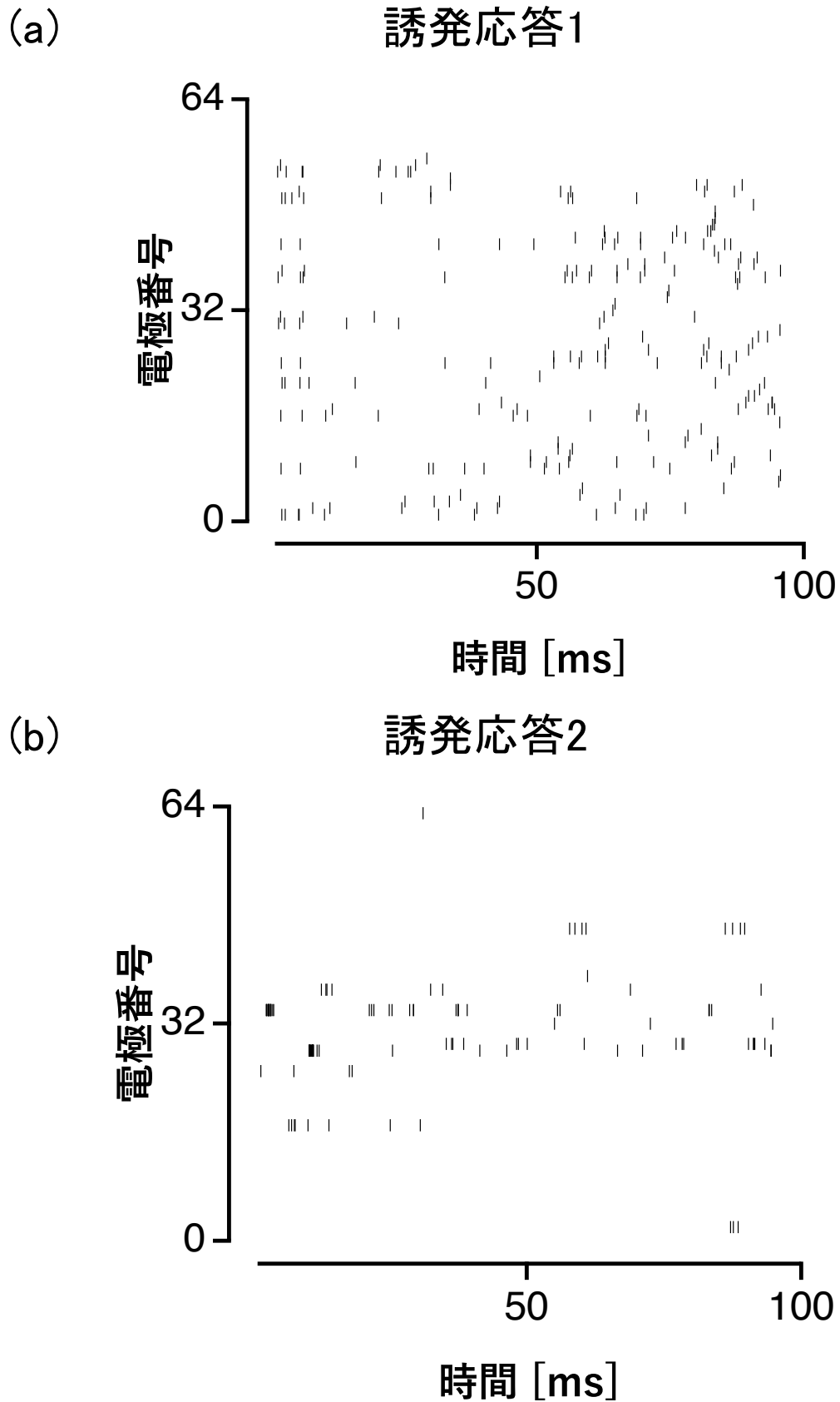


図 4.7 電流刺激印加直後における誘発応答 1, 2 のラスタープロット (E18DIV43). 図 4.6 と同じ神経回路網のデータを用い, それぞれ 10 スウィープ分をオーバーレイした. (a) 誘発応答 1. (b) 誘発応答 2.

初期値設定を行った E-SOM の出力層に、500 スウィープ計測した 100 ミリ秒の自発性神経活動と誘発応答 1, 及び誘発応答 2 から生成した特徴ベクトルを入力し、勝者ユニットを写像した (図 4.8)。本実験には E18DIV22-54 の培養神経回路網を用いた。

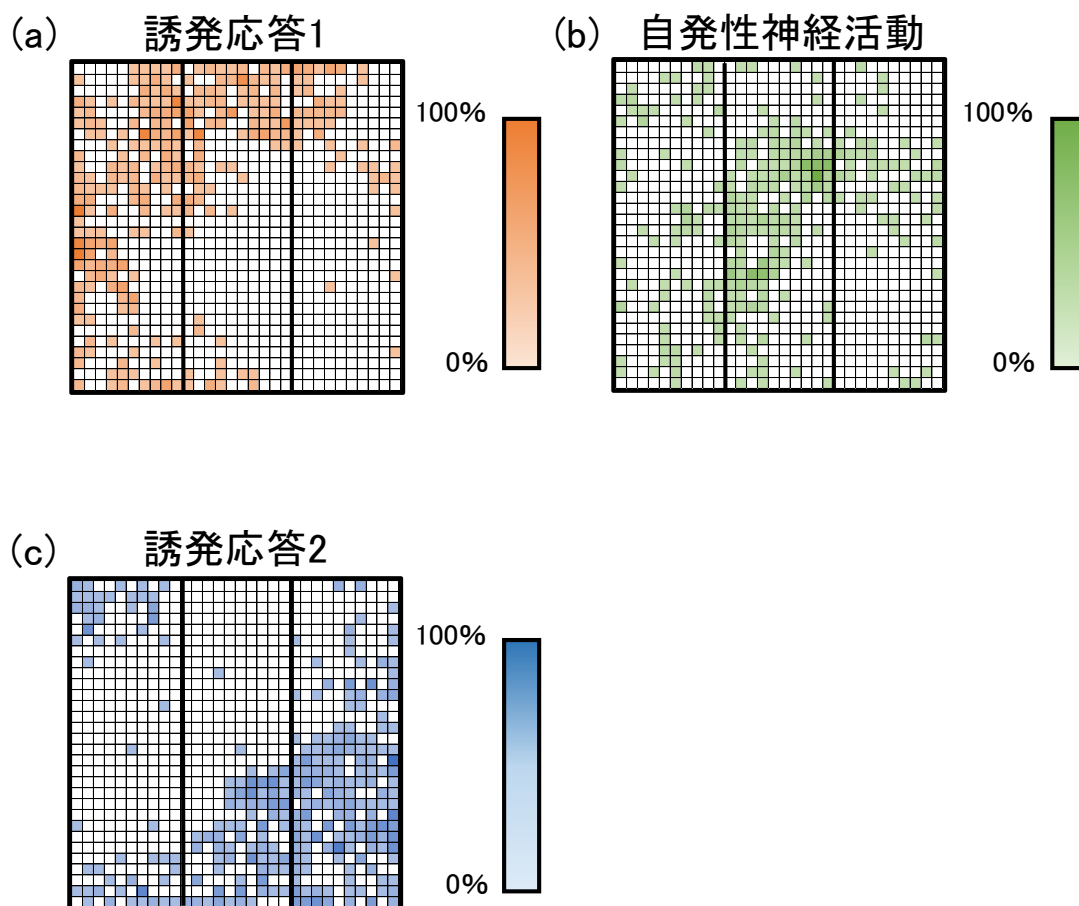


図 4.8 E-SOM で誘発応答 1, 自発性神経活動, 誘発応答 2 を写像した結果を濃淡マップで表した一例 (E18DIV37)。(a) 誘発応答 1, (b) 自発性神経活動, (c) 誘発応答 2。スケールは選択回数が最大のユニットの選定回数を 100% とする。

E-SOM の出力層において、自発性神経活動、及び誘発応答 1, 誘発応答 2 はそれぞれ初期学習を行ったエリアを中心に再現よく写像された。そこで、自発性神経活動、誘発応答 1, 及び誘発応答 2 がそれぞれの初期値を設定したエリアに写像された割合を解析した (図 4.9)。

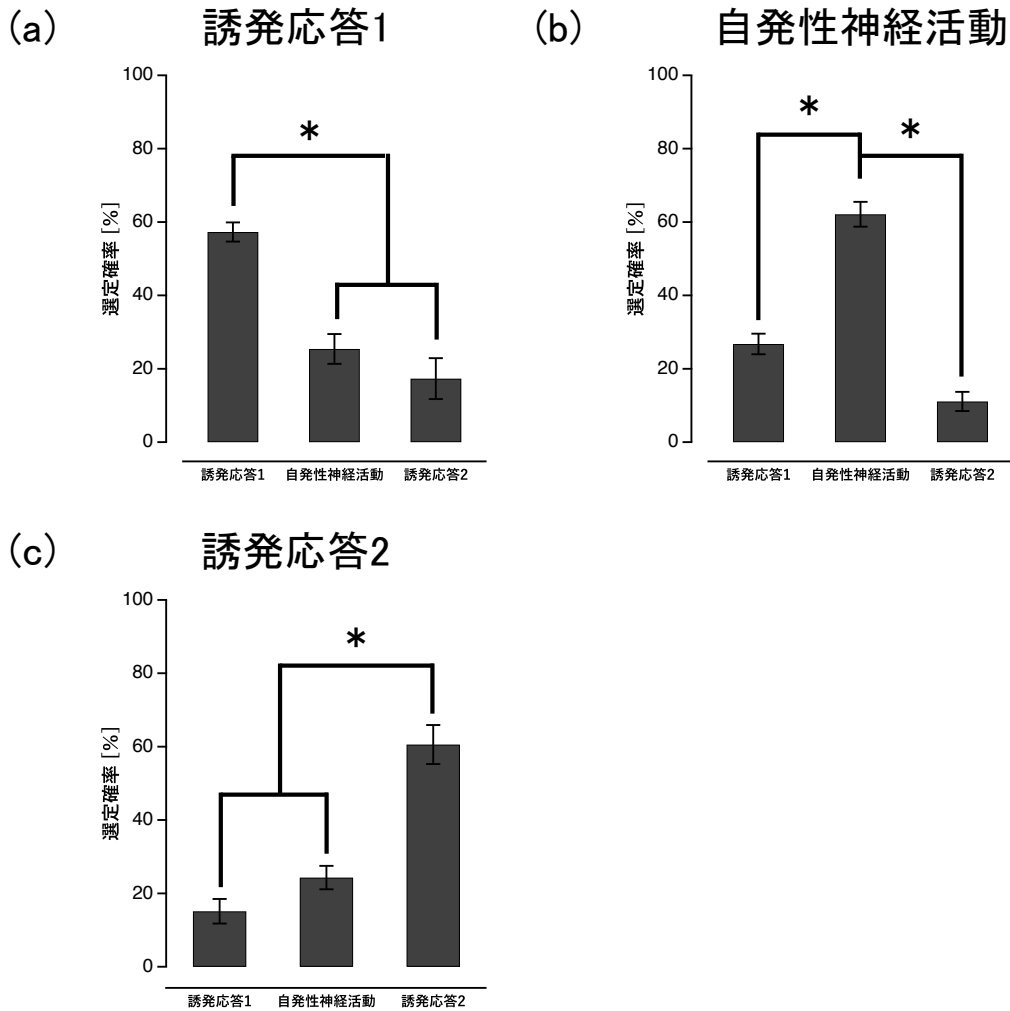


図 4.9 誘発応答 1, 自発性神経活動, 誘発応答 2 が E-SOM によってそれぞれの初期値設定を行ったエリアに写像された割合. (a) 入力 が誘発応答 1, (b) 入力 が自発性神経活動, (c) 入力 が誘発応答 2. エラーバーは標準誤差を示す (E18DIV22-54, N = 6). * はマン・ホイットニーの U 検定による有意差を示す ($p < 0.01$).

500 スウィープの誘発応答 1 に対する勝者ユニットが初期値を設定したそれぞれのエリアに写像された割合は, 誘発応答 1 のエリアにおいて $65.35 \pm 2.64\%$, 自発性神経活動のエリアにおいて $25.40 \pm 4.07\%$, 誘発応答 2 のエリアにおいて $17.30 \pm 5.59\%$ (それぞれ平均値 \pm 標準誤差, N = 6) であった. 勝者ユニットが誘発応答 1 のエリアに写像された割合と自発性神経活動のエリアに写像された割合との間, 誘発応答 1 のエリアと誘発応答 2 のエリアに写像された割合との間において, マン・ホイットニーの U 検定により $p < 0.01$ で有意差が認められた. 500 スウィープの自発性神経活動に対する勝者ユニットが初期値を設定したそれぞれのエリアに写像された割合は, 誘発応答 1 のエリアにおいて $26.77 \pm 2.89\%$, 自発性神経活動のエリアにおいて $62.13 \pm 3.40\%$, 誘発応答 2 のエリアにおいて $11.10 \pm 2.61\%$ (それぞれ平均値 \pm 標準誤差, N = 6) であった. 勝者ユニットが自発性神経活動のエリアに写像された割合と誘発応答 1 のエリアに写像された割合との間, 自発性神経活動のエリアと誘

発応答2のエリアに写像された割合との間において、マン・ホイットニーのU検定により $p < 0.01$ で有意差が認められた。500 スウィープの誘発応答2に対する勝者ユニットが初期値を設定したそれぞれのエリアに勝者ユニットが写像された割合は、誘発応答1のエリアにおいて $15.13 \pm 3.35\%$ 、自発性神経活動のエリアにおいて $24.30 \pm 3.20\%$ 、誘発応答2のエリアにおいて $60.57 \pm 5.33\%$ （それぞれ平均値 \pm 標準誤差, $N = 6$ ）であった。勝者ユニットが誘発応答2のエリアに写像された割合と自発性神経活動のエリアに写像された割合との間、誘発応答2のエリアと誘発応答1のエリアに写像された割合との間において、マン・ホイットニーのU検定により $p < 0.01$ で有意差が認められた。これらの結果は、予め初期値として設定したエリアに、自発性神経活動、及び誘発応答1, 2がそれぞれ比較的再現よく写像されたことを示す。

続いて、初期値設定を行ったF-SOMの出力層に、500 スウィープ計測した100ミリ秒の自発性神経活動と誘発応答1、及び誘発応答2から生成した特徴ベクトルを入力し、勝者ユニットを選定した（図4.10）。F-SOMの出力層において、自発性神経活動、及び誘発応答1、誘発応答2はそれぞれ初期学習を行ったエリアに再現よく写像された。

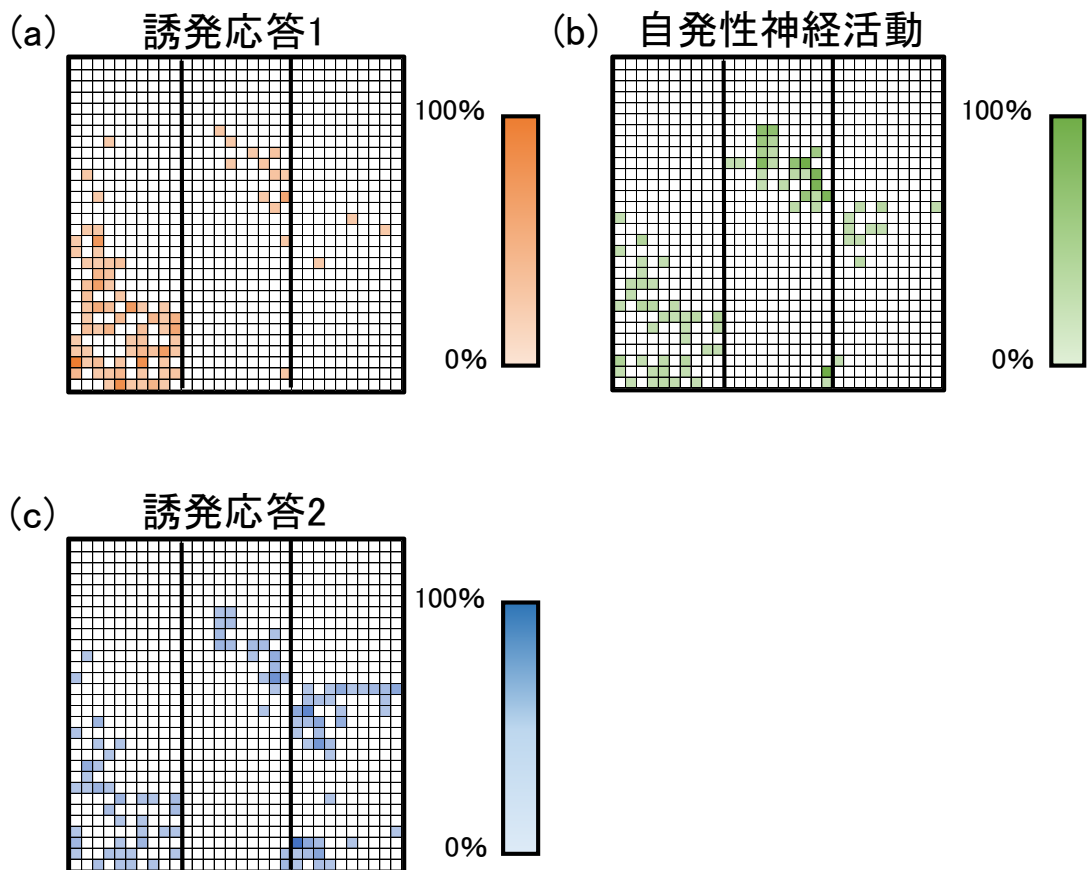


図4.10 F-SOMで誘発応答1、自発性神経活動、誘発応答2を写像した結果を濃淡マップで表した一例 (E18DIV37)。(a) 誘発応答1、(b) 自発性神経活動、(c) 誘発応答2。スケールは選択回数が最大のユニットの選定回数を100%とする。

F-SOMの出力層において、自発性神経活動、誘発応答1、及び誘発応答2がそれぞれの初

期値を設定したエリアに写像された割合を解析した (図 4.11).

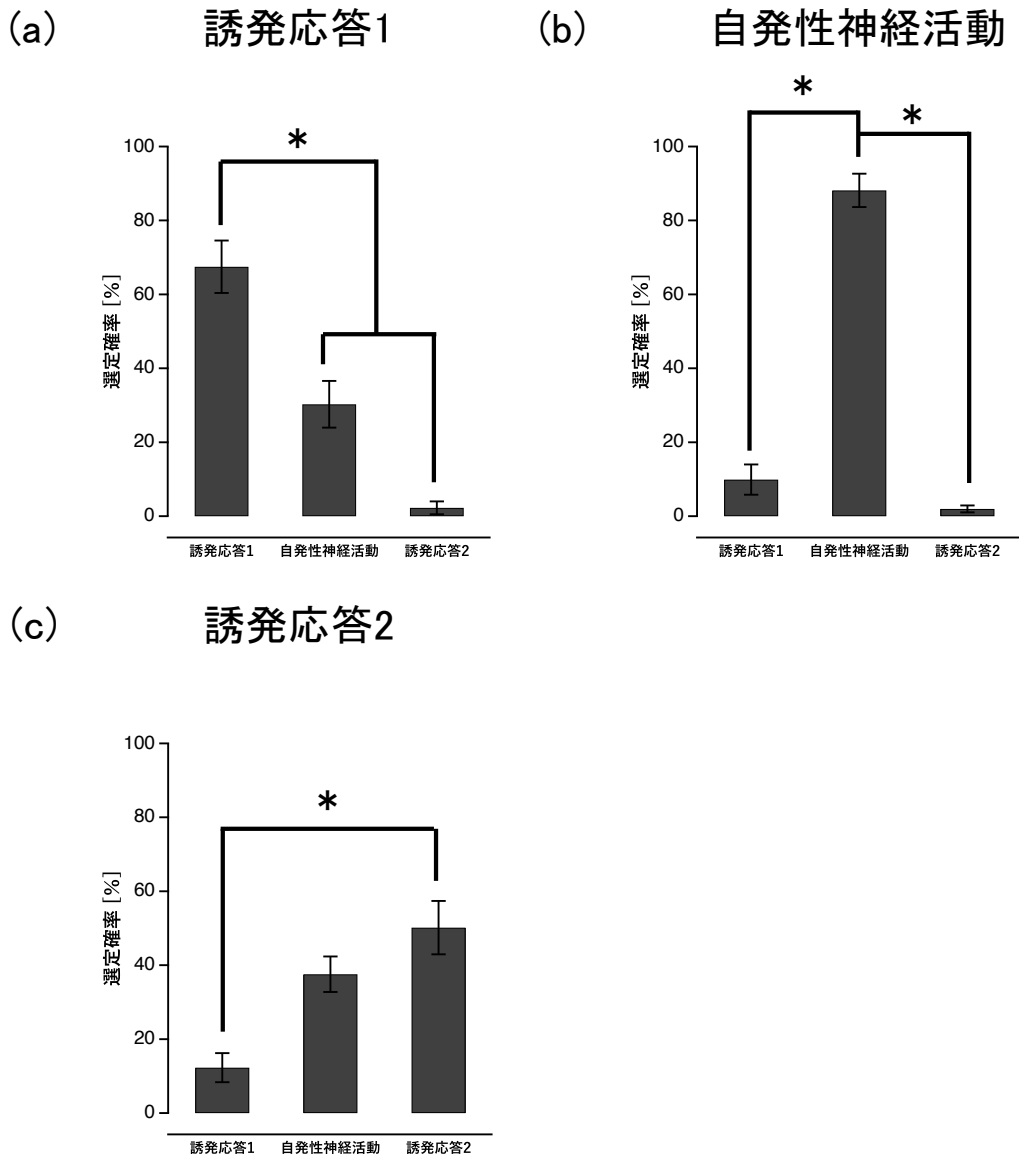


図 4.11 誘発応答 1, 自発性神経活動, 誘発応答 2 が F-SOM によってそれぞれの初期値設定を行ったエリアに写像された割合. (a) 入力が誘発応答 1, (b) 入力が自発性神経活動, (c) 入力が誘発応答 2. エラーバーは標準誤差を示す (E18DIV22-54, N = 6). * はマン・ホイットニーの U 検定による有意差を示す ($p < 0.01$).

500 スウィープの誘発応答 1 に対する勝者ユニットが初期値を設定したそれぞれのエリアに写像された割合は, 誘発応答 1 のエリアにおいて $65.35 \pm 2.64\%$, 自発性神経活動のエリアにおいて $30.27 \pm 6.33\%$, 誘発応答 2 のエリアにおいて $2.27 \pm 1.74\%$ (それぞれ平均値 \pm 標準誤差, N = 6) であった. 勝者ユニットが誘発応答 1 のエリアに写像された割合と自発性神経活動のエリアに写像された割合との間, 誘発応答 1 のエリアと誘発応答 2 のエリアに写像された割合との間において, マン・ホイットニーの U 検定により $p < 0.01$ で有意差が認められた. 500 スウィープの自発性神経活動に対する勝者ユニットが初期値を設定したそ

それぞれのエリアに写像された割合は、誘発応答1のエリアにおいて $9.90 \pm 4.88\%$ 、自発性神経活動のエリアにおいて $88.13 \pm 4.53\%$ 、誘発応答2のエリアにおいて $1.97 \pm 0.93\%$ （それぞれ平均値 \pm 標準誤差, $N = 6$ ）であった。勝者ユニットが自発性神経活動のエリアに写像された割合と誘発応答1のエリアに写像された割合との間、自発性神経活動のエリアと誘発応答2のエリアに写像された割合との間において、マン・ホイットニーのU検定により $p < 0.01$ で有意差が認められた。500回の誘発応答2に対する勝者ユニットが初期値を設定したそれぞれのエリアに勝者ユニットが写像された割合は、誘発応答1のエリアにおいて $15.13 \pm 3.35\%$ 、自発性神経活動のエリアにおいて $24.30 \pm 3.20\%$ 、誘発応答2のエリアにおいて $60.57 \pm 5.33\%$ （それぞれ平均値 \pm 標準誤差, $N = 6$ ）であった。勝者ユニットが誘発応答2のエリアと誘発応答1のエリアに写像された割合との間において、マン・ホイットニーのU検定により $p < 0.01$ で有意差が認められた。これらの結果より、F-SOMで写像した自発性神経活動、誘発応答1、誘発応答2の勝者ユニットは、予め初期値を設定したエリアに最も多く写像された。特に、同一のユニットが再現良く何度も選定される傾向があった。

続いて、自発性神経活動、誘発応答1、誘発応答2の特徴ベクトルを初期値として設定したエリアにE-SOM、F-SOMが選定した勝者ユニットがそれぞれのエリアに写像された割合を解析した（図4.12）。500スウィープの誘発応答1に対する勝者ユニットが誘発応答1で初期値を設定したエリアに写像された割合は、E-SOMでは $57.30 \pm 2.64\%$ 、F-SOMでは $67.47 \pm 7.10\%$ （それぞれ平均値 \pm 標準誤差, $N = 6$ ）、500スウィープの自発性神経活動に対する勝者ユニットが自発性神経活動で初期値を設定したエリアに写像された割合はE-SOMでは $62.13 \pm 3.40\%$ 、F-SOMでは $88.13 \pm 4.53\%$ （それぞれ平均値 \pm 標準誤差, $N = 6$ ）、500スウィープの誘発応答2に対する勝者ユニットが誘発応答2で初期値を設定したエリアに写像された割合はE-SOMでは $50.17 \pm 7.22\%$ 、F-SOMでは $60.57 \pm 5.33\%$ （それぞれ平均値 \pm 標準誤差, $N = 6$ ）であった。また、F-SOMとE-SOMの間において、自発性神経活動の特徴ベクトルを初期値として設定したエリアに自発性神経活動が写像された割合において、マン・ホイットニーのU検定により $p < 0.01$ で有意差が認められた。これらの結果から、E-SOMと比してF-SOMは微小な活動パターンの差異を吸収して類似のパターンを1つのユニットに対応させるので、誘発応答、及び自発性神経活動の識別に有効な手法であることが示唆された。

神経電気活動をE-SOM、F-SOMのいずれで解析した場合も、自発性神経活動と誘発応答は類似した空間パターンを共有したことを確認した。さらに、例えば誘発応答1の空間パターン入力に対し、誘発応答2の空間パターンと類似した神経電気活動が5-20%発生した。この結果は、神経回路網に対する入力と出力とが1対1で対応せず、電流刺激の印加により特定の神経電気活動パターンが確率的に引き出されている可能性を示唆する。

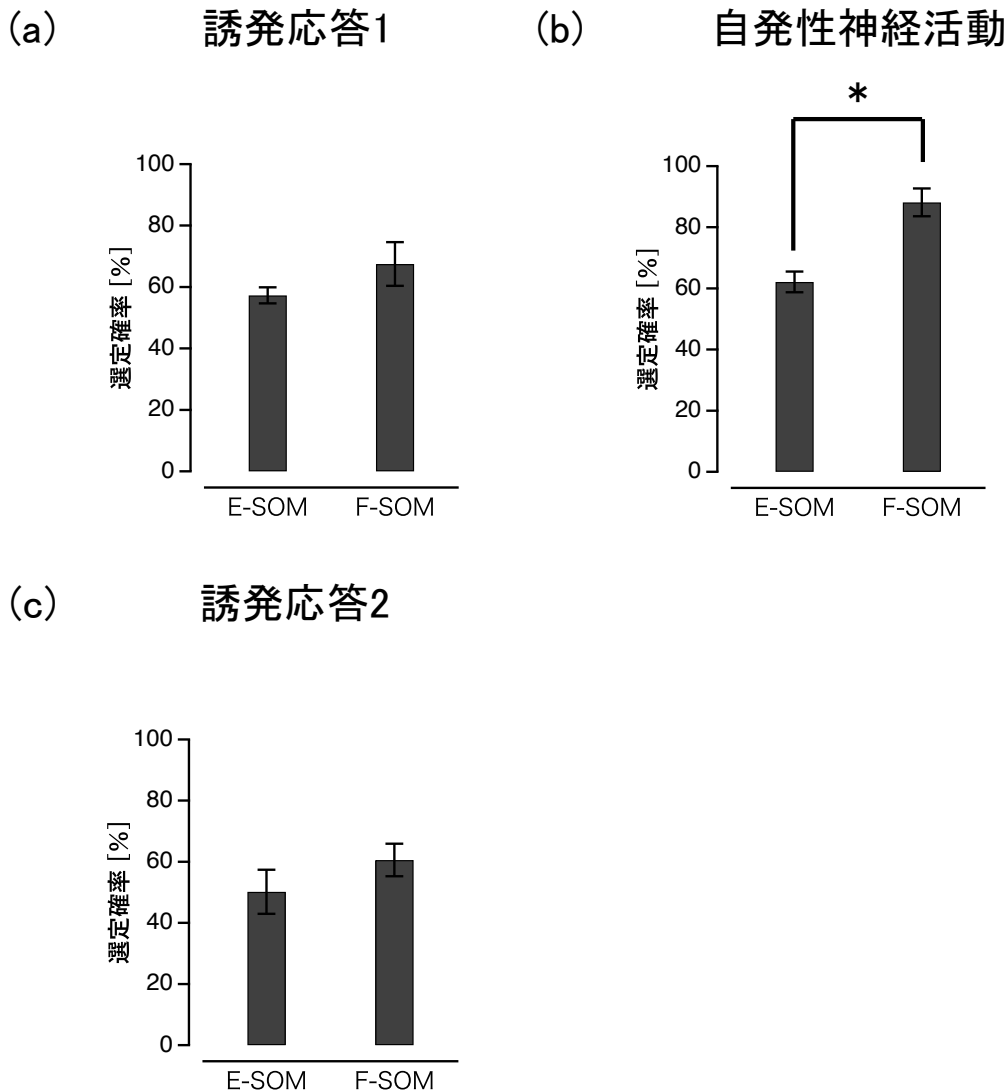


図 4.12 E-SOM, F-SOM において, 誘発応答 1, 自発性神経活動, 誘発応答 2 がそれぞれの初期値を設定したエリアに写像された割合. (a) 入力誘発応答 1, (b) 入力自発性神経活動, (c) 入力誘発応答 2. エラーバーは標準誤差を示す (E18DIV22-54, N = 6). * はマン・ホイットニーの U 検定による有意差を示す ($p < 0.01$)

4.3.2 細胞外ブドウ糖濃度と誘発応答パターンの再現性

E-SOM, F-SOM により誘発応答パターンと自発性神経活動パターンを識別可能であることが確認されたが, この指標を用いて細胞外のエネルギー源と神経電気活動パターンの再現性との関係性を解析した. 電気生理学的実験に通常用いられる濃度である 10 mM ブドウ糖濃度下で初期値設定を行った E-SOM の出力層に, 10 mM ブドウ糖濃度下, 30 mM ブドウ糖濃度下で 500 スウィープ計測した 100 ミリ秒の自発性神経活動と誘発応答 1, 及び誘発応答 2 から生成した特徴ベクトルを入力してそれぞれの勝者ユニットを写像し, 自発性神経活動, 誘発応答 1, 及び誘発応答 2 がそれぞれの初期値を設定したエリアに写像された割合を解析

した (図 4.13-4.16). 本実験には, E18DIV27-36 の培養神経回路網を用いた.

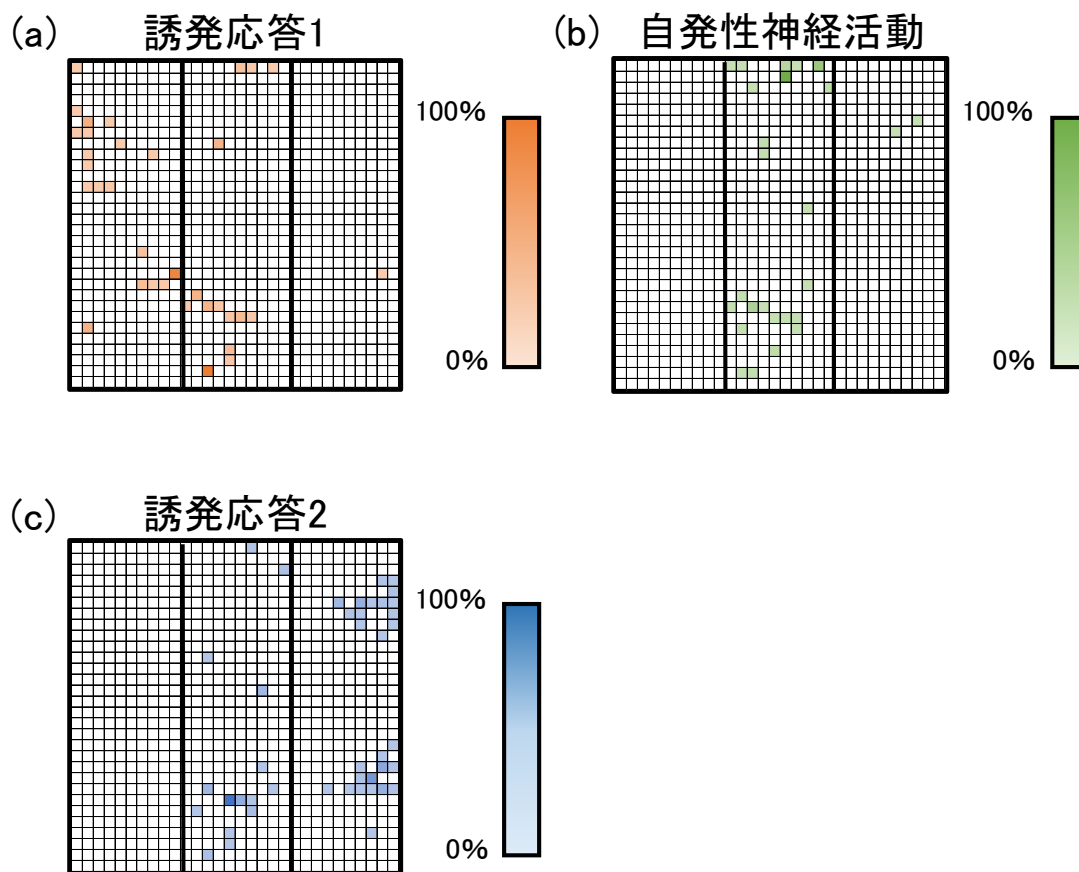


図 4.13 10 mM ブドウ糖下において E-SOM で誘発応答 1, 自発性神経活動, 誘発応答 2 を写像した結果を濃淡マップで表した一例 (E18DIV34). (a) 誘発応答 1, (b) 自発性神経活動, (c) 誘発応答 2. スケールは選択回数が最大のユニットの選定回数を 100% とする.

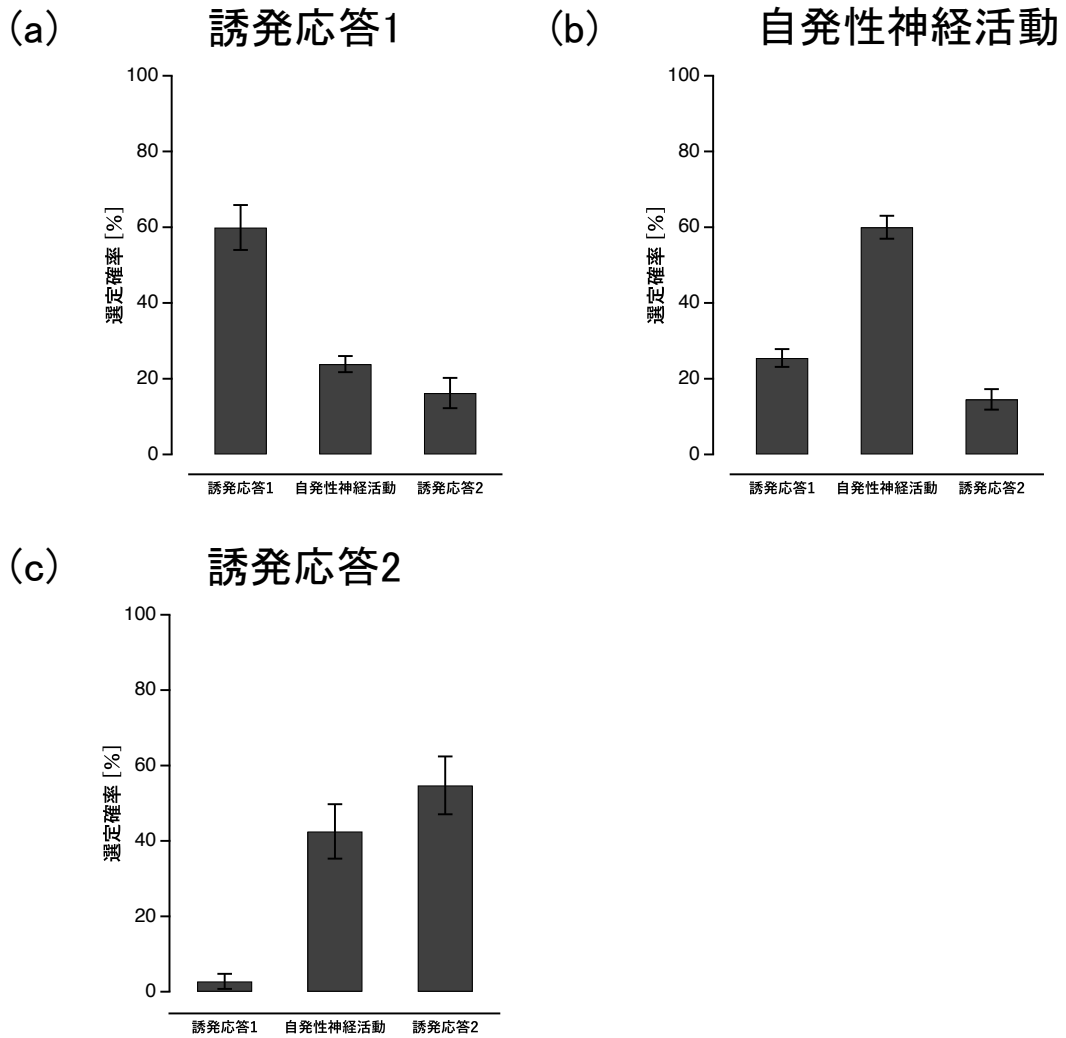


図 4.14 10 mM ブドウ糖濃度下で誘発応答 1, 自発性神経活動, 誘発応答 2 が E-SOM によってそれぞれの初期値設定を行ったエリアに写像された割合. (a) 入力誘発応答 1, (b) 入力自発性神経活動, (c) 入力誘発応答 2. エラーバーは標準誤差を示す (E18DIV27-36, N = 3).

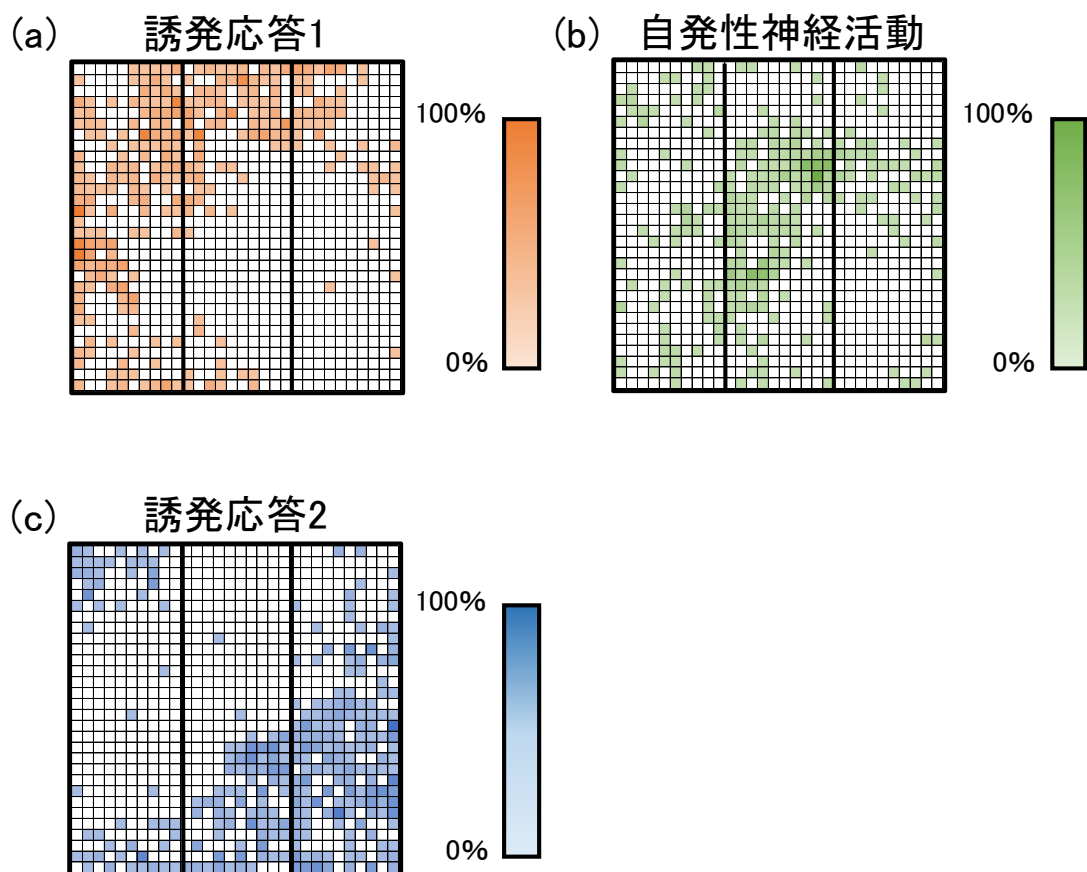


図 4.15 30 mM ブドウ糖下において E-SOM で誘発応答 1, 自発性神経活動, 誘発応答 2 を写像した結果を濃淡マップで表した一例 (E18DIV34). (a) 誘発応答 1, (b) 自発性神経活動, (c) 誘発応答 2. スケールは選択回数が最大のユニットの選定回数を 100% とする.

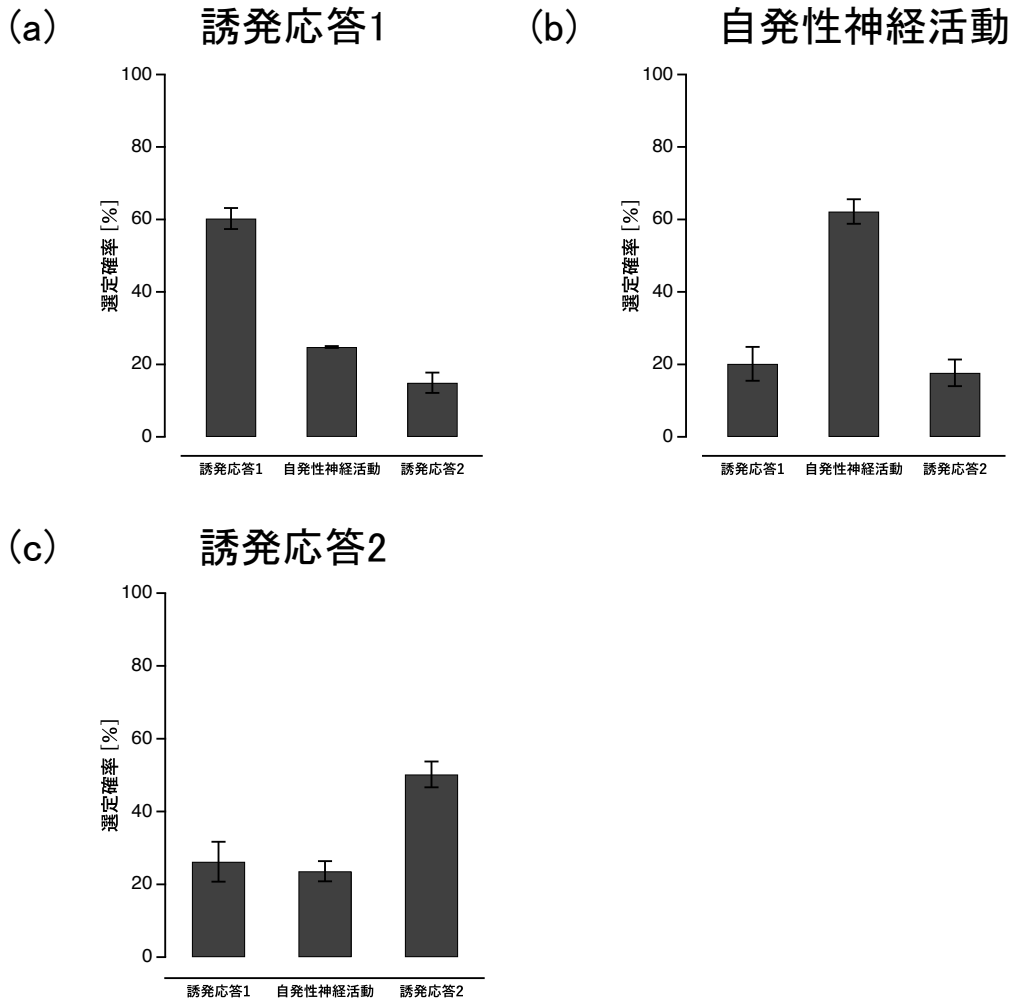


図 4.16 30 mM ブドウ糖濃度下で自発性神経活動，誘発応答 1，誘発応答 2 が E-SOM によってそれぞれの初期値設定を行ったエリアに写像された割合。(a) 入力誘発応答 1，(b) 入力自発性神経活動，(c) 入力誘発応答 2。エラーバーは標準誤差を示す (E18DIV27-36, N = 3)。

10 mM ブドウ糖濃度下において，E-SOM で 500 スウィープの誘発応答 1 に対する勝者ユニットが初期値を設定したそれぞれのエリアに写像された割合は，誘発応答 1 のエリアにおいて $59.93 \pm 5.92\%$ ，自発性神経活動のエリアにおいて $23.87 \pm 2.13\%$ ，誘発応答 2 のエリアにおいて $16.20 \pm 4.00\%$ （それぞれ平均値 \pm 標準誤差，N = 3）であった。勝者ユニットが誘発応答 1 のエリアに写像された割合と自発性神経活動のエリアに写像された割合との間，誘発応答 1 のエリアと誘発応答 2 のエリアに写像された割合との間において，マン・ホイットニーの U 検定により $p < 0.01$ で有意差が認められた。500 スウィープの自発性神経活動に対する勝者ユニットが初期値を設定したそれぞれのエリアに写像された割合は，誘発応答 1 のエリアにおいて $25.47 \pm 2.34\%$ ，自発性神経活動のエリアにおいて $60.00 \pm 3.02\%$ ，誘発応答 2 のエリアにおいて $14.53 \pm 2.71\%$ （それぞれ平均値 \pm 標準誤差，N = 3）であった。勝者ユニットが自発性神経活動のエリアに写像された割合と誘発応答 1 のエリアに写像された

割合との間、自発性神経活動のエリアと誘発応答2のエリアに写像された割合との間において、マン・ホイットニーのU検定により $p < 0.01$ で有意差が認められた。500 スウィープの誘発応答2に対する勝者ユニットが初期値を設定したそれぞれのエリアに勝者ユニットが写像された割合は、誘発応答1のエリアにおいて $15.60 \pm 4.93\%$ 、自発性神経活動のエリアにおいて $23.00 \pm 2.60\%$ 、誘発応答2のエリアにおいて $61.40 \pm 7.50\%$ （それぞれ平均値 \pm 標準誤差, $N = 3$ ）であった。勝者ユニットとして選定されたユニットの数は、培養液下（17.5 mM ブドウ糖）と比して低下したが、それ以外の勝者ユニットの分布の特徴は培養条件下とほぼ同様であった。

また、30 mM ブドウ糖濃度下において、500 スウィープの誘発応答1に対する勝者ユニットが初期値を設定したそれぞれのエリアに写像された割合は、誘発応答1のエリアにおいて $60.23 \pm 2.89\%$ 、自発性神経活動のエリアにおいて $24.80 \pm 0.25\%$ 、誘発応答2のエリアにおいて $14.93 \pm 2.80\%$ （それぞれ平均値 \pm 標準誤差, $N = 3$ ）であった。500 スウィープの自発性神経活動に対する勝者ユニットが初期値を設定したそれぞれのエリアに写像された割合は、誘発応答1のエリアにおいて $20.13 \pm 4.68\%$ 、自発性神経活動のエリアにおいて $62.20 \pm 3.39\%$ 、誘発応答2のエリアにおいて $17.67 \pm 3.68\%$ （それぞれ平均値 \pm 標準誤差, $N = 3$ ）であった。500 スウィープの誘発応答2に対する勝者ユニットが初期値を設定したそれぞれのエリアに勝者ユニットが写像された割合は、誘発応答1のエリアにおいて $26.20 \pm 5.48\%$ 、自発性神経活動のエリアにおいて $23.60 \pm 2.78\%$ 、誘発応答2のエリアにおいて $50.20 \pm 3.55\%$ （それぞれ平均値 \pm 標準誤差, $N = 3$ ）であった。未だ実験数が少なく、限定的な結果ではあるがE-SOMにおいては、10 mM ブドウ糖濃度下と30 mM ブドウ糖濃度下において、それぞれのエリアに写像される確率には概ね同等であった。

他方、F-SOMによる写像は培養液条件下と異なる傾向を示した。10 mM ブドウ糖濃度下で初期値設定を行ったF-SOMの出力層に、10 mM ブドウ糖濃度下、30 mM ブドウ糖濃度下で500 スウィープ計測した100 ミリ秒の自発性神経活動と誘発応答1、及び誘発応答2から生成した特徴ベクトルを入力してそれぞれの勝者ユニットを写像し、自発性神経活動、誘発応答1、及び誘発応答2がそれぞれの初期値を設定したエリアに写像された割合を解析した（図4.17-4.20）。

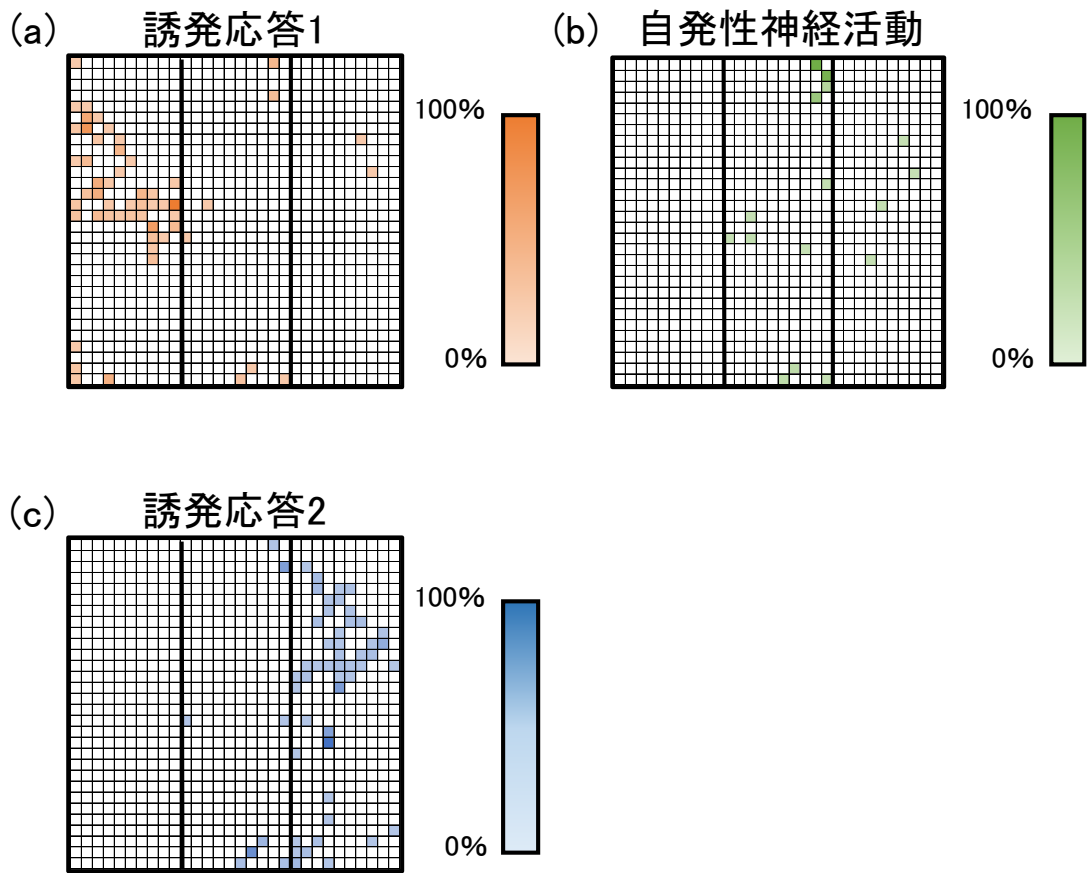


図 4.17 10 mM ブドウ糖下において F-SOM で自発性神経活動と誘発応答 1, 誘発応答 2 を写像した結果を濃淡マップで表した一例. (a) 誘発応答 1, (b) 自発性神経活動, (c) 誘発応答 2. スケールは選択回数が最大のユニットの選定回数を 100% とする.

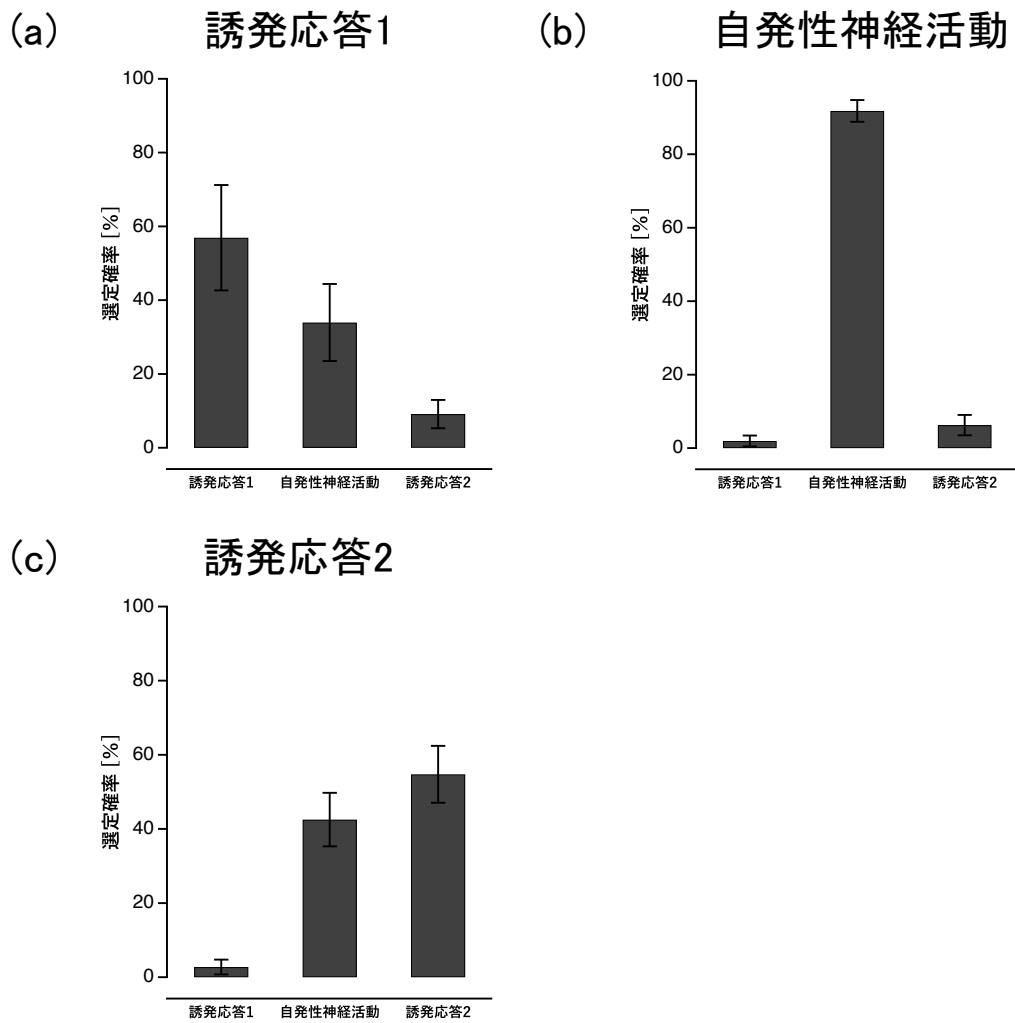


図 4.18 10 mM ブドウ糖濃度下で自発性神経活動，誘発応答 1，誘発応答 2 が F-SOM によってそれぞれの初期値設定を行ったエリアに写像された割合。(a) 誘発応答 1，(b) 自発性神経活動，(c) 誘発応答 2。エラーバーは標準誤差を示す (E18DIV27-36, N = 3)。

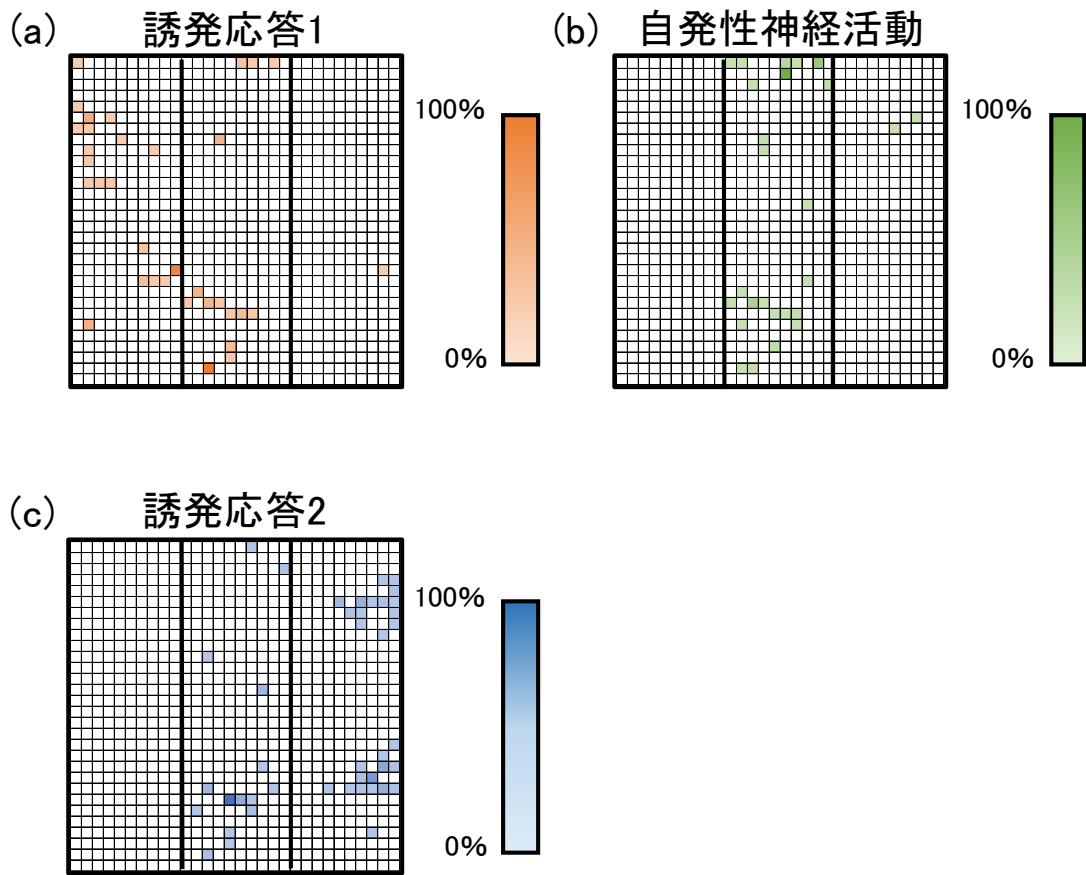


図 4.19 30 mM ブドウ糖下において F-SOM で自発性神経活動と誘発応答 1, 誘発応答 2 を写像した結果を濃淡マップで表した一例. (a) 誘発応答 1, (b) 自発性神経活動, (c) 誘発応答 2. スケールは選択回数が最大のユニットの選定回数を 100% とする.

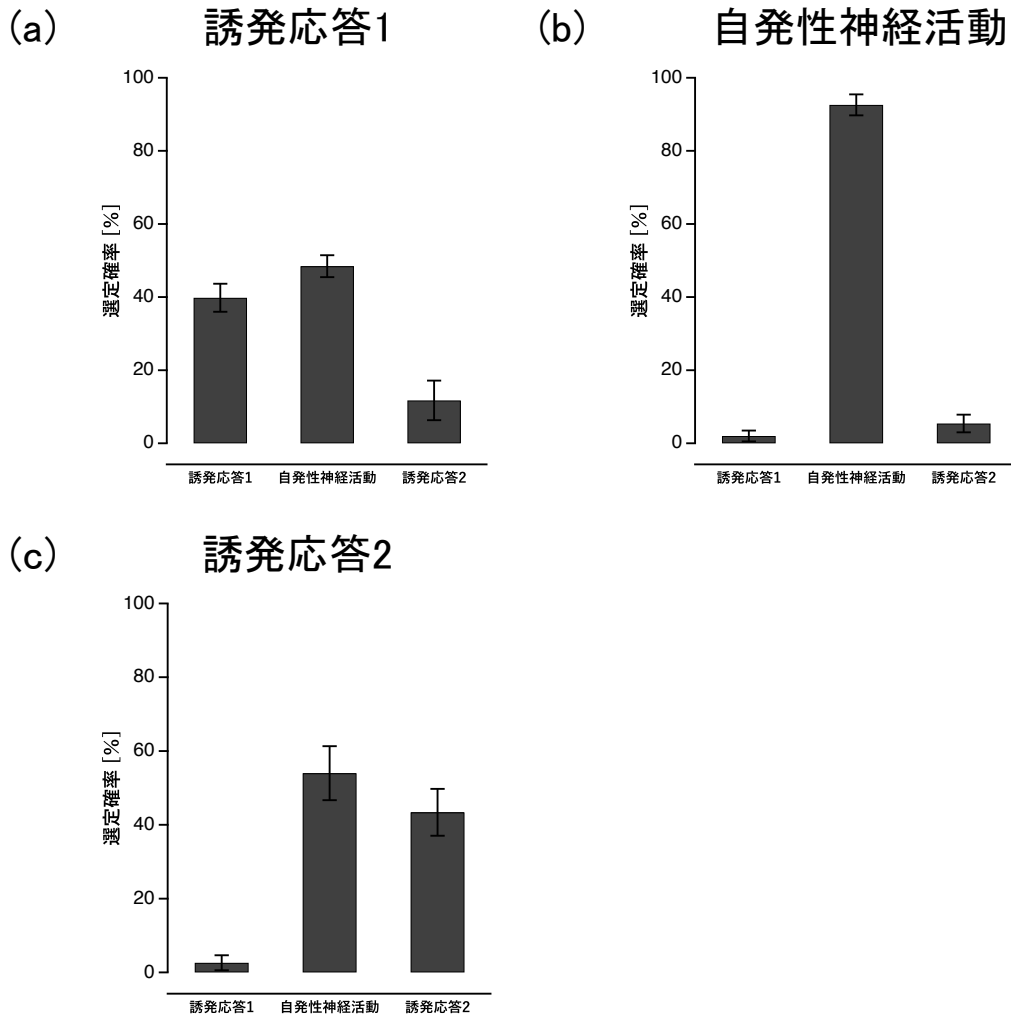


図 4.20 30 mM ブドウ糖濃度下で自発性神経活動，誘発応答 1，誘発応答 2 が F-SOM に よってそれぞれの初期値設定を行ったエリアに写像された割合。(a) 誘発応答 1，(b) 自発性神経活動，(c) 誘発応答 2。エラーバーは標準誤差を示す (E18DIV27-36, N = 3)。

10 mM ブドウ糖濃度下において，F-SOM で 500 スウィープの誘発応答 1 に対する勝者ユニットが初期値を設定したそれぞれのエリアに写像された割合は，誘発応答 1 のエリアにおいて $56.93 \pm 14.27\%$ ，自発性神経活動のエリアにおいて $33.93 \pm 10.45\%$ ，誘発応答 2 のエリアにおいて $9.13 \pm 3.83\%$ （それぞれ平均値 \pm 標準誤差，N = 3）であった。500 スウィープの自発性神経活動に対する勝者ユニットが初期値を設定したそれぞれのエリアに写像された割合は，誘発応答 1 のエリアにおいて $1.93 \pm 1.50\%$ ，自発性神経活動のエリアにおいて $91.80 \pm 2.98\%$ ，誘発応答 2 のエリアにおいて $6.27 \pm 2.77\%$ （それぞれ平均値 \pm 標準誤差，N = 3）であった。500 スウィープの誘発応答 2 に対する勝者ユニットが初期値を設定したそれぞれのエリアに勝者ユニットが写像された割合は，誘発応答 1 のエリアにおいて $2.73 \pm 2.00\%$ ，自発性神経活動のエリアにおいて $42.53 \pm 7.22\%$ ，誘発応答 2 のエリアにおいて $54.73 \pm 7.67\%$ （それぞれ平均値 \pm 標準誤差，N = 3）であった。また，30 mM ブドウ糖濃度下において，500 スウィープの誘発応答 1 に対する勝者ユニットが初期値を設定したそれ

ぞれのエリアに写像された割合は、誘発応答1のエリアにおいて $39.80 \pm 3.84\%$ 、自発性神経活動のエリアにおいて $48.47 \pm 3.00\%$ 、誘発応答2のエリアにおいて $11.73 \pm 5.42\%$ （それぞれ平均値 \pm 標準誤差， $N = 3$ ）であった。500 スウィープの自発性神経活動に対する勝者ユニットが初期値を設定したそれぞれのエリアに写像された割合は、誘発応答1のエリアにおいて $2.00 \pm 1.47\%$ 、自発性神経活動のエリアにおいて $92.60 \pm 5.40\%$ 、誘発応答2のエリアにおいて $5.40 \pm 2.41\%$ （それぞれ平均値 \pm 標準誤差， $N = 3$ ）であった。500 スウィープの誘発応答2に対する勝者ユニットが初期値を設定したそれぞれのエリアに勝者ユニットが写像された割合は、誘発応答1のエリアにおいて $2.60 \pm 2.04\%$ 、自発性神経活動のエリアにおいて $54.00 \pm 7.33\%$ 、誘発応答2のエリアにおいて $43.40 \pm 6.34\%$ （それぞれ平均値 \pm 標準誤差， $N = 3$ ）であった。実験回数が少なく限定的な結果ではあるが、F-SOM においては、10 mM ブドウ糖濃度下と 30 mM ブドウ糖濃度下において、それぞれのエリアに写像される確率が大きく変化し、30 mM ブドウ糖濃度下では誘発応答が自発性神経活動と類似した活動パターンであると識別される確率が高くなった。

4.4 考察

4.4.1 自己組織化マップにより選定された勝者ユニットの空間的分布

本研究で用いた MED プローブ上に培養したラット胎児大脳海馬由来分散培養神経回路網において、自発性神経活動と選定した2電極に刺激電流を印加した際の誘発応答を確認した（図4.6）。独立した2個の刺激電極に対応した誘発応答は、互いに異なる空間パターンを示した（図4.7）。本研究では、自発性神経活動、及び異なる2個の電極に刺激電流を印加した直後に発生する誘発応答を100ミリ秒ずつ計測し、その空間パターンを64次元特徴ベクトルとして表現した。また、作成した特徴ベクトルを自己組織化マップに入力して勝者ユニットを選定した（図4.8-図4.9）。勝者ユニットは入力された神経活動パターンを2次元平面に写像したものであり、勝者ユニット同士の距離は活動パターン間の類似度を反映している。特定の電極に刺激電流を印加した際の誘発応答の空間パターンは全く同一では無く、相当多くの異なるパターンを含有していた。特に、刺激電流の印加により、自発性神経活動と類似した空間パターンも比較的多く誘発されることが示された。

E-SOM においては自発性神経活動、誘発応答1、2のエリアにそれぞれ写像された勝者ユニットの空間的分布のばらつきが大きくなった。これは、ユークリッド距離の算出結果が神経電気活動パターン同士の微小な違いに大きく影響されることを反映している（図4.8）。

SOM の出力層を3つに分割し、その参照ベクトルの初期値として異なる誘発応答と自発性神経活動パターンに対応する特徴ベクトルを割り当てた。それぞれの区分ごとに300個のデータを割り当てたが、これまでの実験から経験的にこの数は充分1刺激に対する誘発応答パターンのバリエーションを網羅していると考えられる。例として、1つの電極からの刺激で誘発された活動パターンの勝者ユニットが自発性神経活動のエリア内で選定された場合、そ

れはその入力された誘発応答パターンが、その300スイープ分の誘発応答パターンのどれよりも自発性神経活動で現れた活動パターンの1つとよく類似していたことを意味する。すなわち、この勝者ユニットの参照ベクトルに対応する自発性神経活動パターンが電流刺激によって発現したことを意味している。

一方、F-SOMで写像された結果は初期値設定と周辺学習によって、一部の領域に集まった(図4.10)。これはユークリッド距離とは対照的に、ファジィ化によりF-SOMが類似した神経電気活動空間パターンの微小な相違を吸収したためだと考えられる。つまり、ある程度類似した活動パターンは同一のものとして同じユニットが勝者として選定されるため、1つの勝者ユニットあたりの選定回数が多い傾向となる。加えてF-SOMの場合、メンバシップ関数により特徴ベクトルの要素であるスパイク数の多寡がある一定の範囲内に正規化されるため、それぞれの要素の勝者ユニット選定に対する影響が均一化された可能性がある。しかしながら、F-SOMで解析した場合においても、誘発応答と自発性神経活動は初期値を設定したそれぞれのエリアに再現よく写像されたため、神経電気活動空間パターンの分類に有効であることが示された(図4.11)。

また、F-SOMは、E-SOMと比して自発性神経活動の初期値を設定したエリアに自発性神経活動に対応した勝者ユニットが写像された割合が有意に高かった(図4.12)。これは、自発性神経活動が表現する豊富な神経電気活動空間パターンをファジィ化の過程が吸収したためであると考えられる。結果として、それぞれの誘発要因による活動パターンに対応する勝者ユニットの分布が互いに分離する傾向になった。以上より、神経電気活動などの生体データを扱うためにファジィ数を用いる有効性を示せたと考える(図4.12)。

4.4.2 自発性神経活動と誘発応答との関係性

自発性神経活動は外界の事象とは独立して発生しており、外界の事象との対応を持たないと考えられる傾向にあった。この考え方に従うと、外界からの入力により誘発される活動パターンに背景的に存在する自発性神経活動が加算されることで、誘発応答の活動パターンの再現性が損なわれることになる。これらのことから、自発性神経活動は刺激誘発応答に対する雑音であると捉えられる傾向があった。しかしながら、近年の知見では自発性神経活動の中に特定の時空間パターンが存在し[9]、これが神経回路網の内部状態に対応しているとされる。本研究での解析により、自発性神経活動と誘発応答の空間パターンは類似の活動パターンを共有し、対応する勝者ユニットの分布の境界は曖昧であった。すなわち、従来の考え方における雑音と応答信号との一部の類似性が示されたことになる。

自発性神経活動と誘発応答はそれぞれ独立した神経電気活動であると考えられていた。一例として、神経電気活動を数学的にモデル化する際、膜電位変動の項とノイズ項とがそれぞれ独立して定義されることが多い[77]。神経電気活動とノイズとを分けて定式的に定義するのは、自発性神経活動と誘発応答は全く別物の神経電気活動という考えによるものであるが、そうであれば、自己組織化マップによって自発性神経活動と誘発応答が同じ領域に写像され

る可能性は殆どないはずである。勝者ユニットの写像が参照ベクトルの初期値にのみ依存するのであれば、自発性神経活動は自発性神経活動を初期値として設定させたエリア、誘発応答1、誘発応答2はそれぞれの神経電気活動は初期値を設定したエリアにのみ写像されるはずであるが、誘発応答1、誘発応答2はしばしば他の神経電気活動を初期値として設定させたエリアに写像された。これは、刺激電流の印加により誘発された誘発応答の空間パターンに自発性神経活動の空間パターンと類似したパターンが多く含まれていたためであると考えられる。すなわち電流刺激により特定の神経電気活動パターンが誘発されるが、それはそれぞれの刺激入力と出力が1対1対応している訳では無く、電流刺激により自発性神経活動と類似した神経電気活動パターンが誘発される、すなわちこれらのパターンは誘発応答と自発性神経活動とに共有されていることになる。

これらの結果は、神経回路網において誘発された神経電気活動の持つパターンは自発性神経活動にも内包されており、刺激電流の印加によって自発性神経活動パターンに内包された豊富な空間パターンから限定的な空間パターンが確率的に引き出されているという仮定と一致する (図 4.21)。

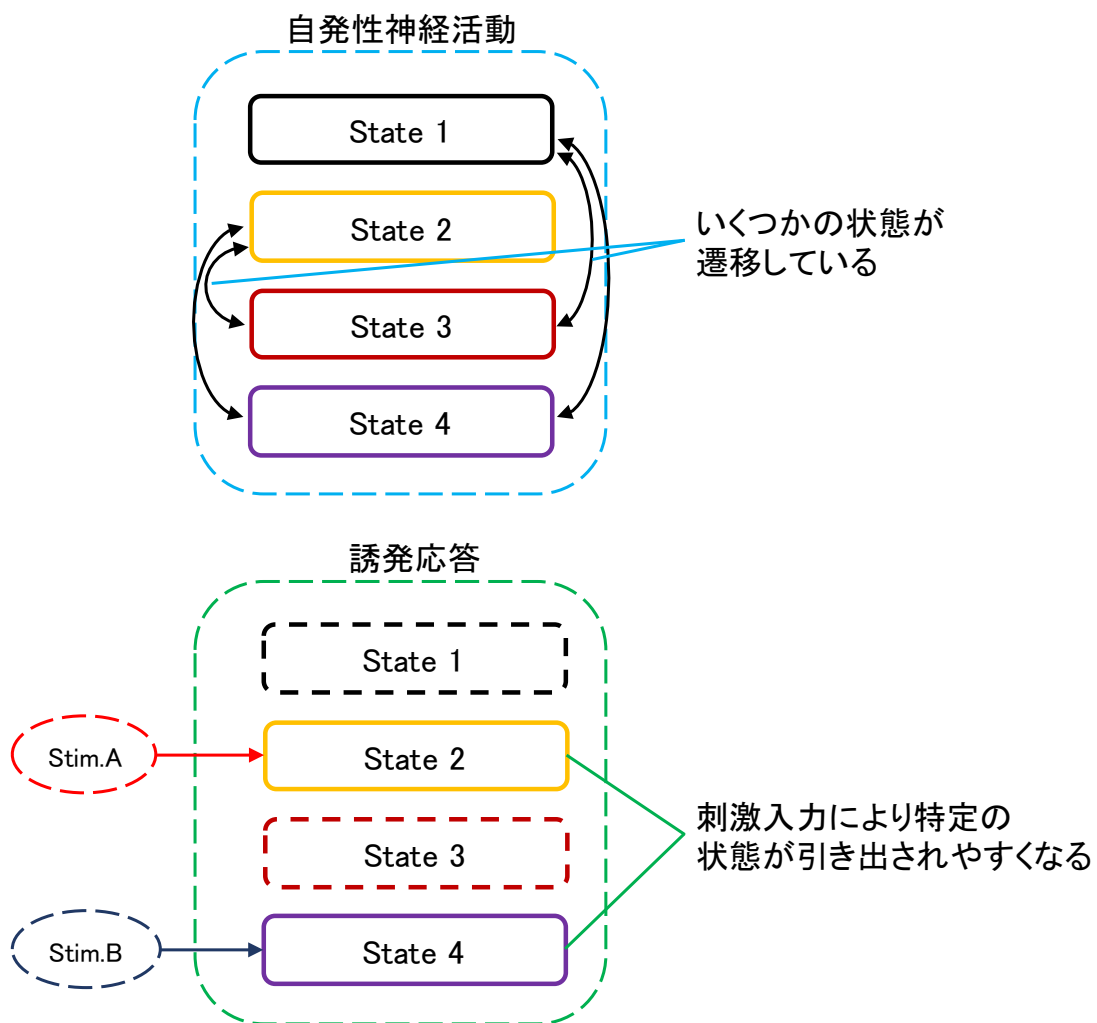


図 4.21 自発性神経活動と誘発応答との関係性の模式図。

4.4.3 細胞外ブドウ糖濃度と誘発応答パターンの再現性

細胞外ブドウ糖濃度を変更した場合に、自発性神経活動頻度が変化することから、自発性神経活動パターンも大きく変化していると予想された(第3章図3.10)。本実験において、細胞外ブドウ糖濃度を変えて、E-SOM, F-SOM によりそれぞれ神経活動空間パターンの分類を試みた(図4.13-4.20)。まだ例数が少なく限定的な結果ではあるが、E-SOM においては初期値設定したエリアにそれぞれの神経電気活動が再現良く写像され、細胞外ブドウ糖濃度が変わってもそれぞれの選定確率に大きな違いは無かった。しかしながら、F-SOM においては10 mM ブドウ糖濃度条件下と比して30 mM ブドウ糖濃度条件下では自発性神経活動の選定確率が上昇し、相対的に誘発応答の選定確率が減少した。F-SOM は神経電気活動の活動頻度がメンバシップ関数によりある一定の範囲内に正規化される傾向があるため、自発性神経活動の識別確率がE-SOM と比して有意に高い(図4.12-b)。自発性神経活動パターンの変化に起因して類似した誘発応答と自発性神経活動とを1つの活動パターンであると識別した可能性がある。30 mM ブドウ糖条件では自発性神経活動の頻度は大きく変わらなかったが、誘発応答の再現性は低くなっているのでは無いかと予想される。

活動パターンを表現した特徴ベクトルは、スパイクを検出する時間窓の幅に強く影響されることが考えられる。本研究では、100 ミリ秒という比較的長い時間窓で特徴ベクトルを作成している。培養された神経回路網においても、リカレントネットワークが形成されていることが知られており、刺激電流を印加するタイミングに依存して神経電気活動の空間パターンが変化することが報告されている[53]。従って、100 ミリ秒という長い時間窓で特徴ベクトルを作成することで刺激直後の誘発応答と、刺激が伝播した後の神経電気活動が加算された特徴ベクトルとなる可能性がある(図4.22)。50 ミリ秒以下の時間窓で特徴ベクトルを作成することで、自発性神経活動と誘発応答の境界が明確に示され、分類精度が向上する可能性がある。これは今後の解析における課題としたい。

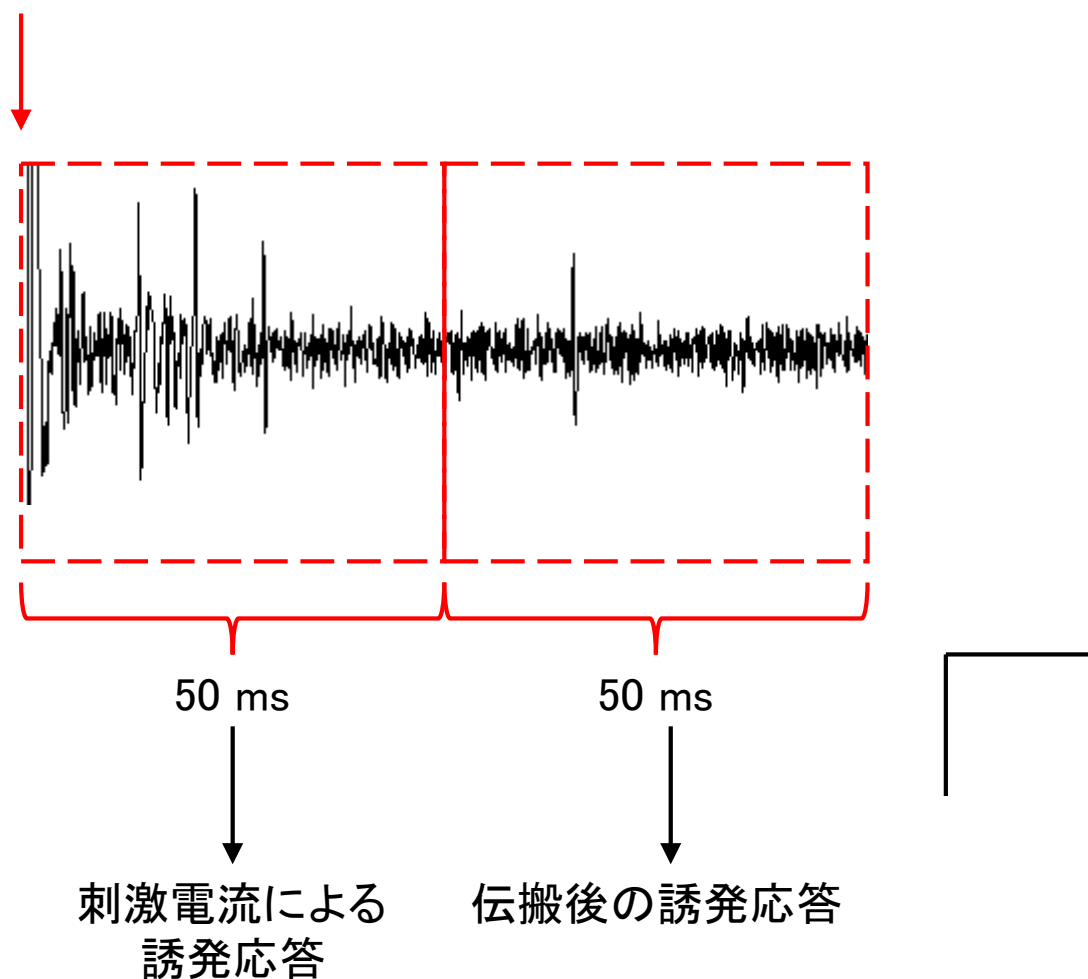


図 4.22 刺激電流を印加した結果発生する誘発応答と、回路網内を伝搬した結果発生する誘発応答の一例。赤矢印は刺激電流印加時刻を示す。スケールバーは $100 \mu\text{V} \times 25 \text{ms}$ 。

4.5 結論

培養神経回路網において、自発性神経活動と刺激による誘発応答の空間的活動パターンがある程度再現良く分離することを確認しながらも、両者は互いに共通した神経電気活動パターンを有していることを明らかにした。このことから、神経回路網は特定の入力に対応した特定の出力をするのではなく、ある入力に対する出力は、いくつかの活動パターンの中から確率的に選択されたものである可能性が考えられる。

細胞外ブドウ糖濃度を変化させた場合の神経電気活動パターンについて、ファジィ SOM を用いて識別を試みたところ、高ブドウ糖濃度下では自発性神経活動の識別確率が上昇した。このことから、高ブドウ糖濃度条件下においては自発性神経活動パターンと誘発応答パターンの類似性が上昇する可能性が示唆された。

第 5 章

活動パターンテンプレートを用いた誘発応答 伝播の推定

5.1 序論

神経回路網を構成する神経細胞は互いに電気信号（活動電位）をやりとりすることで高次機能を実現している [1]。神経細胞で発生した活動電位は、神経細胞間を繋ぐ通信ケーブルの役割をする軸索を伝播し、他の神経細胞に伝播される。

一度活動電位が発生した神経細胞は、活動電位の発生直後数ミリ秒間活動電位が発生しない状態、あるいは活動電位の振幅が小さくなる不応期と呼ばれる期間になる。活動電位の発生後は約5ミリ秒の間活動電位が発生しにくい状態を生じることが、神経回路網を伝播する信号伝播を非線形にし、神経回路網の複雑なダイナミクスを発生させる [1]。

ネットワークダイナミクスを定量化する手法として、神経活動の同期性に着目した研究が行われている [16, 78–82]。神経細胞の同期的活動は、シナプス形成の密度や培養神経細胞の数に影響を受ける可能性があるが、この予想に反し、同期性のパラメータは分散培養された神経細胞の密度に非依存的事であることが報告されている [16]。この報告ではネットワークダイナミクスを表現するものとして、全計測電極から、全計測時間で観測されたスパイク活動を切り出し、加算平均したものをネットワークスパイクと定義した。ネットワークスパイクは、培養系における神経回路網全体の出力の平均値として捉えることが出来る。培養する神経細胞の密度を変え、ネットワークサイズを増減させながら各条件におけるネットワークスパイクの特性を比較したところ、算出されるネットワークスパイクには本質的な相違は認められず、ネットワークスパイクの特性はネットワークサイズに依存しないことが示唆された。また、バーストリーダーと呼ばれるバースト活動の初期相から安定的に活動する神経細胞が存在することや、ネットワークスパイクのピークに近づくにつれて多くの神経細胞が同期的に活動することが示唆されており [79]、ネットワーク中の神経細胞の集団としての振る舞いが詳細に報告された。さらに、刺激を加えることで神経細胞間の機能的結合は変化すると考えられ、ネットワーク活動の時空間パターンもまた、これに伴って変化することが示唆されている [83]。これらのネットワークダイナミクスは活動電位の伝播により生成されており、この信号の伝播は回路網の物理的構造とシナプス伝達効率によって制御される機能的結合状態によって調整される。

神経回路網において、神経細胞間の機能的な結合は物理的なシナプス結合と同義ではない。シナプス結合の構造を形成していることを意味する物理的結合に対し、シナプス前細胞から後細胞へ電気化学的シグナル伝達が行われる状態であるとき、この2つの神経細胞は機能的結合を形成しているという。シナプス結合が物理的に存在していても、そのみではシナプスが機能しない場合がある。例えば、軸索を伝播してきた活動電位がシナプス前終末に達した時にシナプス前終末から神経伝達物質が放出されない場合がある。さらに神経伝達物質がシナプス前細胞において放出されたとしても、シナプス後膜上の受容体が活性化しなければシナプス伝達は成立しない。例えば、海馬 CA1 領域では、NMDAR が発現していないシナプスが存在し、この場合シナプス前細胞から神経伝達物質が放出されてもシナプス後

電位は発生しない。このシナプスは、シナプス後細胞が強く脱分極したときのみシナプス伝達という機能を発揮する。このようなシナプスをサイレントシナプスという [84]。機能的な結合は神経細胞の状態に依存し、物理的構造と機能的結合とは互いに影響し合うため、シナプスの空間分布はシナプス可塑性とネットワーク構造の双方に依存することが報告されている [85]。

神経回路網において、特定の電極に対する電流刺激による誘発応答パターンは互いに類似しており、ほぼ再現可能である。他方、異なる電極への電流刺激による誘発応答パターンは互いに異なる場合があることから [41]、培養神経回路網は独立した複数のパターンを表現することが可能であることが示唆されている。すなわち、神経回路網の時空間パターンは、神経回路網全体の一つの状態を表しており、何らかのシンボルを表象している可能性がある [9,44]。一方、自発性神経活動はネットワークの内在的な状態に影響を与えると考えられるため [31,73]、自発性神経活動と誘発応答パターンは相互に影響を与えあっていると予想される。従って、自発性神経活動の時空間パターンが系の内部状態、つまり基底的なネットワークダイナミクスを構成し、入力応答を制御しているという仮説が立てられる。神経活動の時空間パターンダイナミクスを刺激誘発応答の伝播という観点で解析することは神経回路網における情報処理伝達機構を解明する上で大変重要であると考えられる。

神経回路網に対する電流刺激入力の影響が回路網内を伝播し、これによって誘発応答パターンが形成されるのであれば、刺激入力の影響は入力点を中心として周辺に向かうと考えられる。松井らは、自発性神経活動に近い神経電気活動パターンのテンプレートを作成し、電流刺激の入力が活動パターンに影響する時間領域を明らかにした [86]。そこで、本研究ではこのテンプレートを用いた解析を適用し刺激信号が伝播して自発性神経活動と誘発応答が互いに影響し合う様式を解析した。本研究では、MEDプローブを用いた細胞外電位多点計測データから神経電気活動を表すスパイクを検出し、その空間パターンを解析した。解析する際に、従来の研究では特定の時間窓を設定し、この幅に存在する各電極の活動電位スパイク数を算出することで特徴ベクトルを生成し、神経回路網の状態を表現していた。このような解析方法は、時間窓の幅が特徴ベクトルの性質に大きな影響を及ぼすが、この時間窓の幅を特定する明確な基準はなく、経験的又は慣習的に設定されることがほとんどである。神経細胞の活動電位が発生した後、次に発生可能となるまでの時間（不応期）はほぼ一定であることから、最小限の時間窓を5ミリ秒に設定することで、時間窓ごとに精々1個の活動電位しか入らないようにすることができ、時間窓幅の恣意性を解消できる [86,87]。

そこで本章で扱う実験においては、刺激入力によって神経活動を誘発したことによる影響の継続時間及び空間領域を推定し、誘発応答の伝播様式の推定を試みた。複数回の刺激入力によって誘発された活動を全試行分加算平均し、安定的神経電気活動パターンと言えるテンプレートを設け、時間軸方向において局所的な神経電気活動パターンとこのテンプレートとの差分値を計算した。この差分値の時間推移を指標として、刺激による誘発応答活動パターンの安定性を解析し、自発性神経活動との関係性を検討した。

また、誘発応答の伝搬特性を解析して得た結果をもとに、細胞外ブドウ糖濃度を変化させ

て誘発応答の伝播解析を試みた。

5.2 実験材料・手法

実験材料は、本論文の2章で記述したMEDプローブ上に培養したラット胎児大脑海馬領域由来の培養神経回路網である。また、細胞外電位多点計測については2章に記述した手法と同様であり、刺激電極の選定と電流刺激・誘発応答の計測は4章で記述した手法と同様である。細胞外電位多点計測は2章で記述した通常の培養液(17.5 mM ブドウ糖濃度)のまま行い、実験によって10 mM, 30 mM ブドウ糖濃度を含む細胞外記録溶液を用いて行った。本章で記述する実験において異なるのは、電流刺激スキーム及び解析手法であるので以下に記述する。

5.2.1 誘発応答計測実験スキーム

選定した1つの刺激電極に対する電流刺激を60秒ごとに印加し、誘発応答を計測した。本章に記述する実験では、刺激ごとの細胞外電位計測を1スイープとし、合計50スイープの誘発応答を計測した。計測された細胞外電位から、3章で記述した手法により電流刺激印加によるアーティファクトを除外した後、2章で記述した活動電位スパイクを検出した。続いて、64個の各電極から検出されたスパイク数から64次元特徴ベクトルを作成した。検出されたスパイク数から特徴ベクトルを作成する場合、特定の時間窓を設定し、その時間窓内で検出されたスパイク数を要素として用いる必要がある。しかしながら、時間窓の範囲において活動頻度が偏る等、時間窓の決定には恣意性が生じる可能性がある。一例を挙げると、ある100ミリ秒の区間の内に同じ個数のスパイクが発生したとする。さらに、そのスパイクが前半の50ミリ秒にのみ集中して発生し、後半の50ミリ秒では発生しない場合、逆に前半の50ミリ秒ではスパイクが発生せず、後半の50ミリ秒ではスパイクが多く発生する場合があったとする。特徴ベクトルを作成する時間窓を50ミリ秒とするとこの2例は違うパターンとして記述されるが、時間窓を100ミリ秒とすると、この2例は同様の活動パターンとして認識される。このように、ある特定の時間窓におけるスパイク数の変遷を解析する場合、時間窓の決定に伴う恣意性が生じることが考えられる(図5.1)。

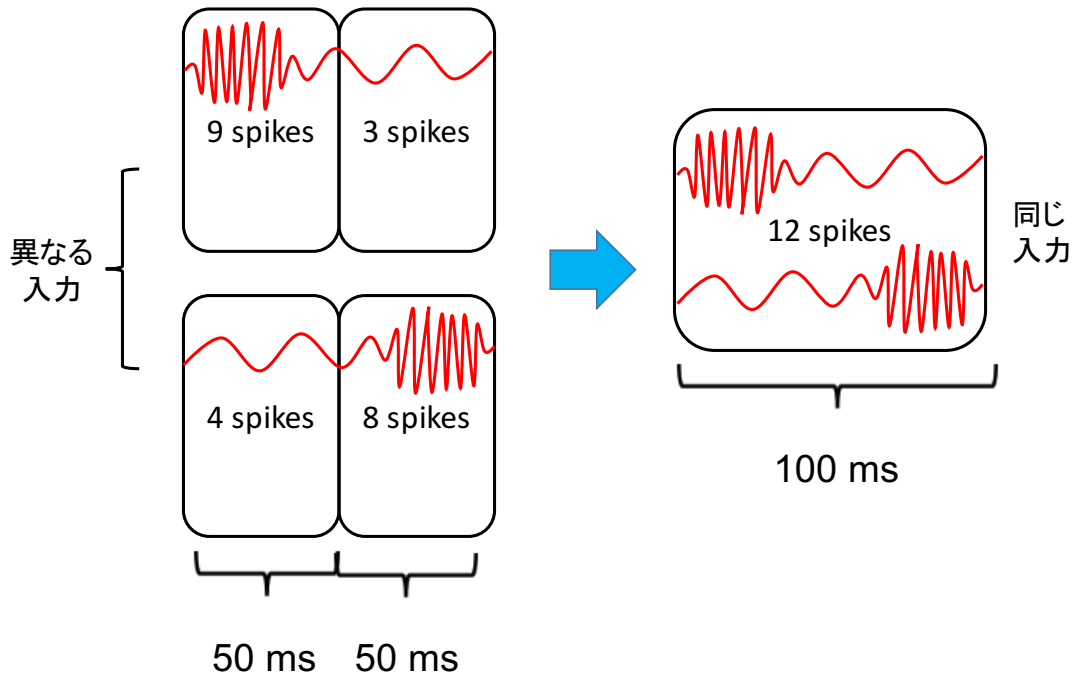


図 5.1 64次元特徴ベクトルの作成方法概要.

スパイク状の活動を示す神経細胞の活動電位において、電位変動は発生から収束までが約2ミリ秒であり、活動電位発生直後に約2-3ミリ秒の不応期が存在する。従って、5ミリ秒の時間窓においては、精々1回の活動電位が発生する [87]。そこで、本章で行う実験では100ミリ秒毎にスパイクを検出した際の検出時刻を記録し、スパイク数を5ミリ秒毎に計数することで、5ミリ秒の幅を持つ時間窓で計数した活動電位スパイクをもとに特徴ベクトルを作成した。特徴ベクトルの要素の値は0か1となり、スパイク発生の有無を表現することになる (図 5.2)。

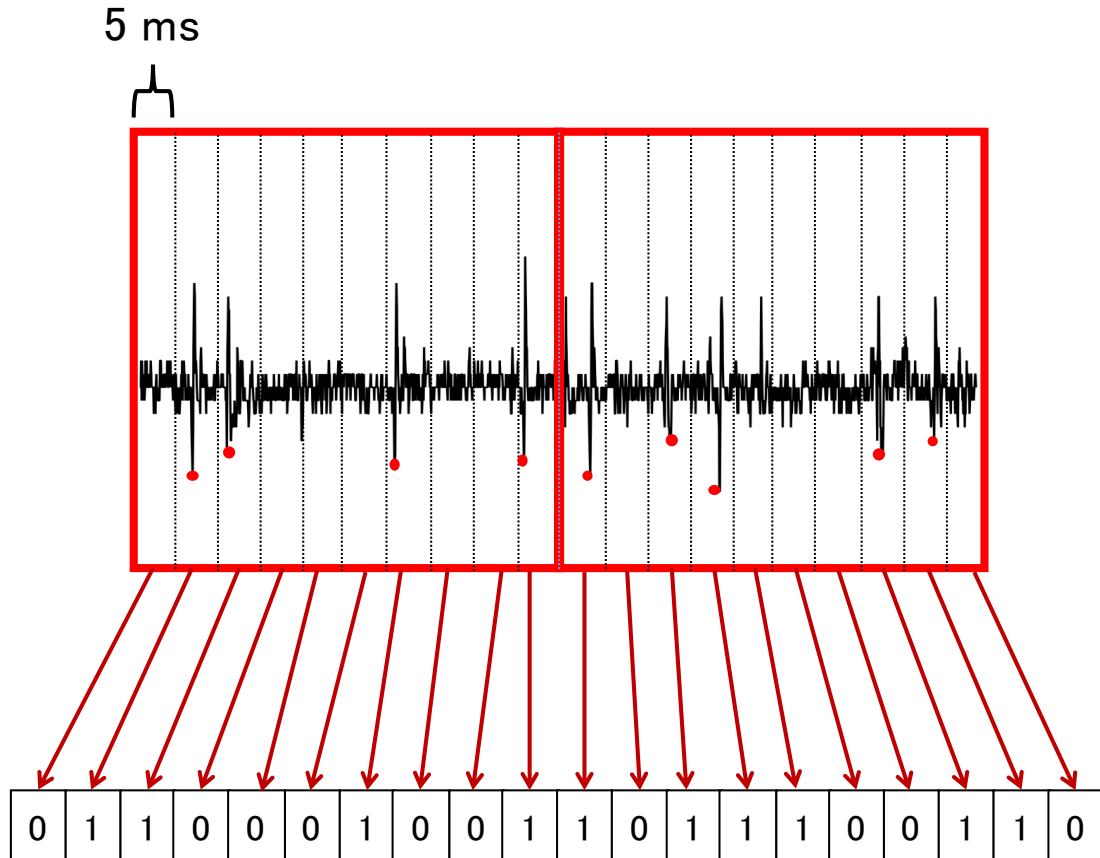


図 5.2 解析時間窓 5 ミリ秒での特徴ベクトル作成の概要.

1つの電極近辺に複数の神経細胞が存在する場合、上記の仮定が崩れ、0, 1以外の要素を持つ特徴ベクトルが生成される。ただし、本実験では殆どの電極でこのような例は発生しなかった。このような、0, 1以外の要素を持つ特徴ベクトルが生じる電極は解析から除外した。

本研究では、50分間の自発性神経活動と60秒に1回刺激電流を印加する試行を1スイープとし、合計50スイープの誘発応答を計測した(図5.3)。

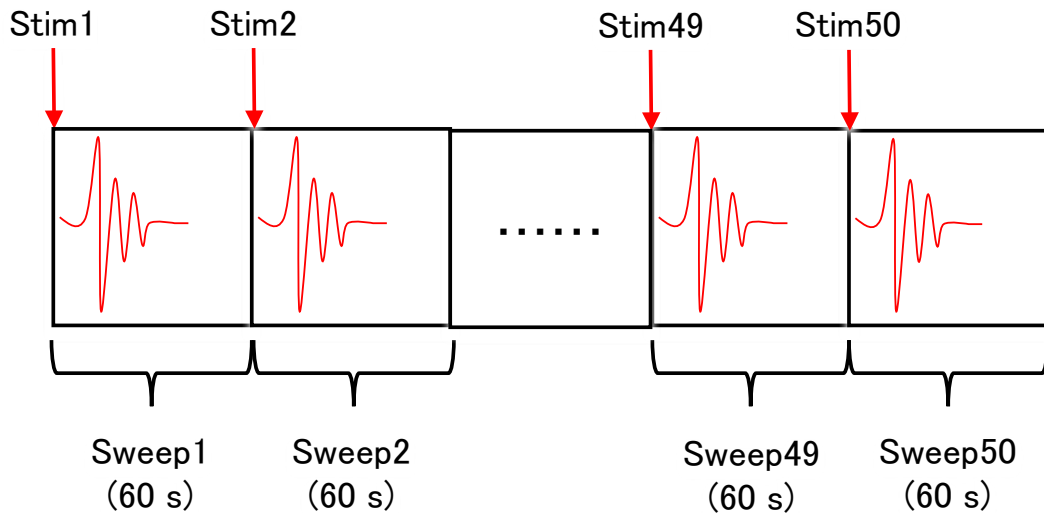


図 5.3 誘発応答計測の実験スキーム.

また、本論文 3 章で用いたブドウ糖濃度 10 mM、または 30 mM の細胞外記録溶液に溶液置換し、細胞外ブドウ糖濃度がそれぞれ 10 mM、30 mM の状態で 60 秒に 1 回刺激電流を印加する試行を 1 スウィープとし、合計 50 スウィープの誘発応答も解析した (図 5.4).

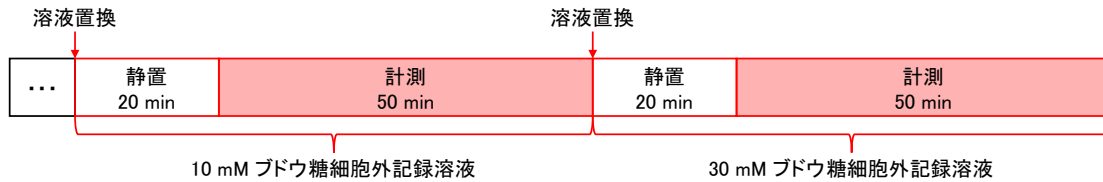


図 5.4 細胞外記録溶液を用いた誘発応答計測の実験スキーム.

5.2.2 局所的神経活動パターンテンプレート

本研究では、64 個それぞれの電極において 5 ミリ秒の時間窓でスパイクが検出された場合を 1、検出されなかった場合を 0 とした特徴ベクトルを作成した。さらに、電流刺激印加による誘発応答の特徴的な活動パターンを解析するため、神経活動パターンテンプレートを作成した [86]。テンプレートの作成方法を以下に記述する。初めに、各スウィープの平均スパイク数を算出した。続いて、テンプレート作成の閾値として 64 電極全ての平均スパイク数を算出し、各電極における平均スパイク数がこれを上回った場合に、この電極における活動を 1 とし、下回った電極における活動を 0 とし、各スウィープにおける空間領域が制限された神経活動空間パターンのテンプレートを作成した。このテンプレートを時間軸集約活動パターンテンプレート (Time Overlaid Spatial Pattern template, TOSP テンプレート) と定義した (図 5.5)。

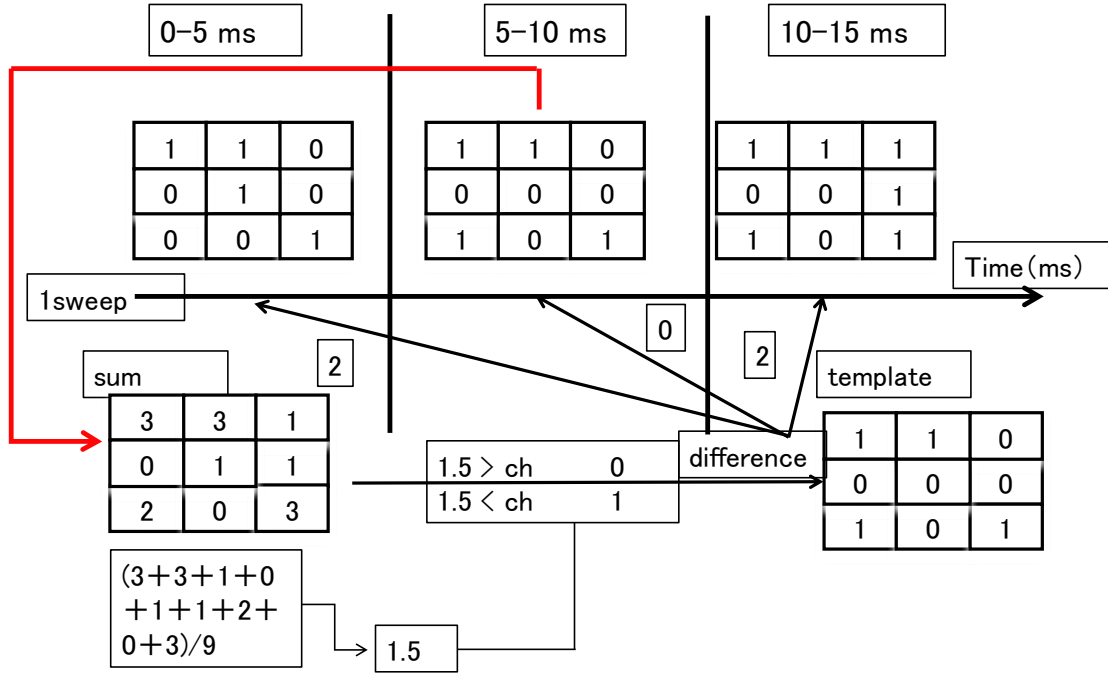


図 5.5 TOSP の概要.

これにより得られた TOSP テンプレートと、各時間窓におけるスパイクの有無を表現した特徴ベクトルとの差の絶対値を算出し、全スイープに渡って時間窓毎に平均した。スイープ番号を sw 、64 個の電極を 8×8 のアレイ状に配置した際の電極番号を i 、時間窓 t における合計スパイク数を $n_{i,t}^{sw}$ とすると、計測時間 t_m としたときの計測時間全域の合計 ST_i^{sw} は、

$$ST_i^{sw} = \sum_{t=1}^{t_m} n_{i,t}^{sw} \quad (5.1)$$

また、スイープ sw における TOSP テンプレート作成の閾値 Th_{sw} を以下のように設定した。

$$Th_{sw} = \frac{1}{64} \times \sum_{i=1}^{64} ST_i^{sw} \quad (5.2)$$

時間軸集約活動パターンである $TOSP_{i,j}^{sw}$ は、

$$TOSP^{sw} = \begin{cases} 1, (ST^{sw} \geq Th_{sw}) \\ 0, (ST^{sw} < Th_{sw}) \end{cases} \quad (5.3)$$

また、TOSP との差分の絶対値の合計 DT_t^{sw} は、

$$DT_t^{sw} = \sum_{i=1}^{64} |n_{i,t}^{sw} - TOSP_i^{sw}| \quad (5.4)$$

これらより、全スイープ数を sw_m とし、TOSP との差分値の合計を全スイープで平均した値である mDT_t を算出した。

$$mDT_t = \frac{1}{sw_m} \sum_{sw=1}^{sw_m} \quad (5.5)$$

mDT_t は、各スイープ、各電極における 5 ミリ秒ごとの空間パターンを、全計測時間に渡って時間軸に沿って集約し、平均したテンプレートとの差分の各スイープ間で平均したものを示す。すなわち、 mDT_t は全計測時間において平均的な神経電気活動パターンとの差異を示す (図 5.6)。

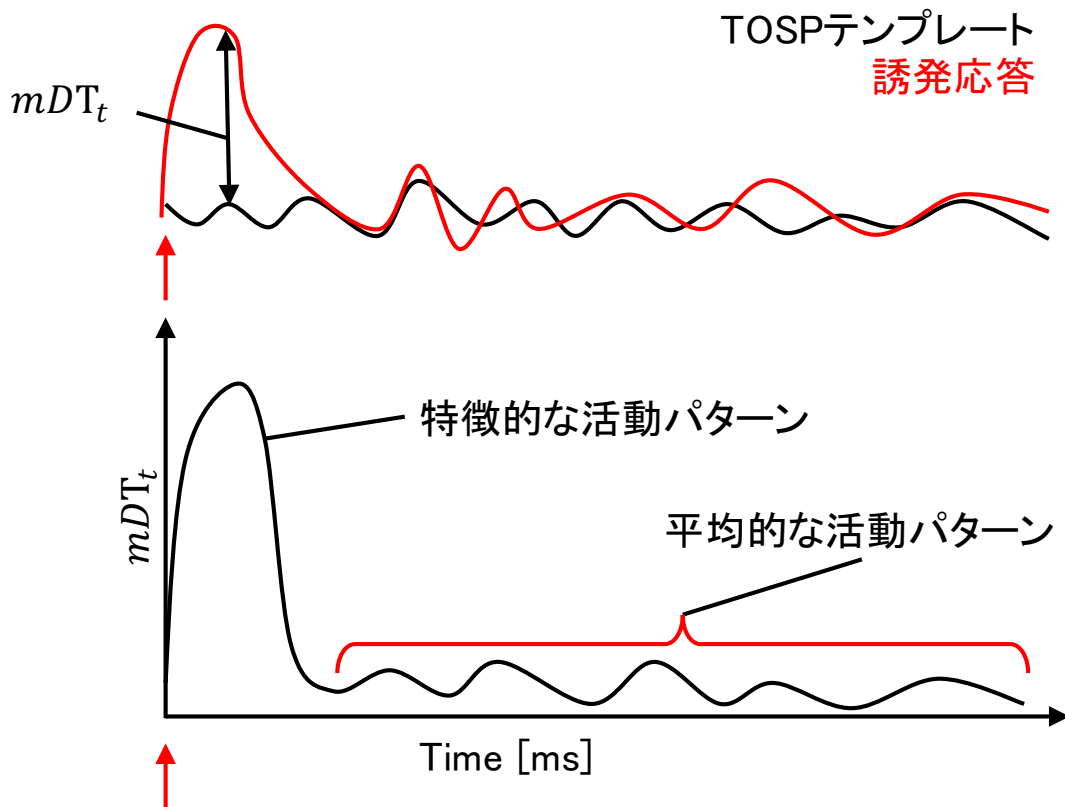


図 5.6 mDT_t の概要。赤矢印は刺激電流印加時刻を示す。

本実験では電気信号の伝搬を解析するために、注目した電極の周囲に限定した局所的な TOSP テンプレート (局所 TOSP テンプレート) を作成し、各領域における mDT_t の時間推移を解析した。この場合、ある電極を中心として半径 1 電極分の範囲 (3 × 3) の 9 電極から局所的テンプレートを作成し、 mDT_t を計算した。注目電極を 1 つずつずらして解析し、8 × 8 電極の内 36 領域について解析した (図 5.7)。

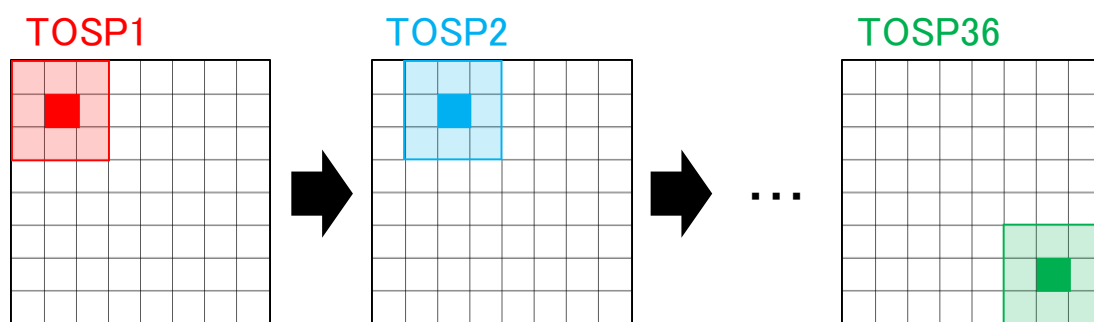


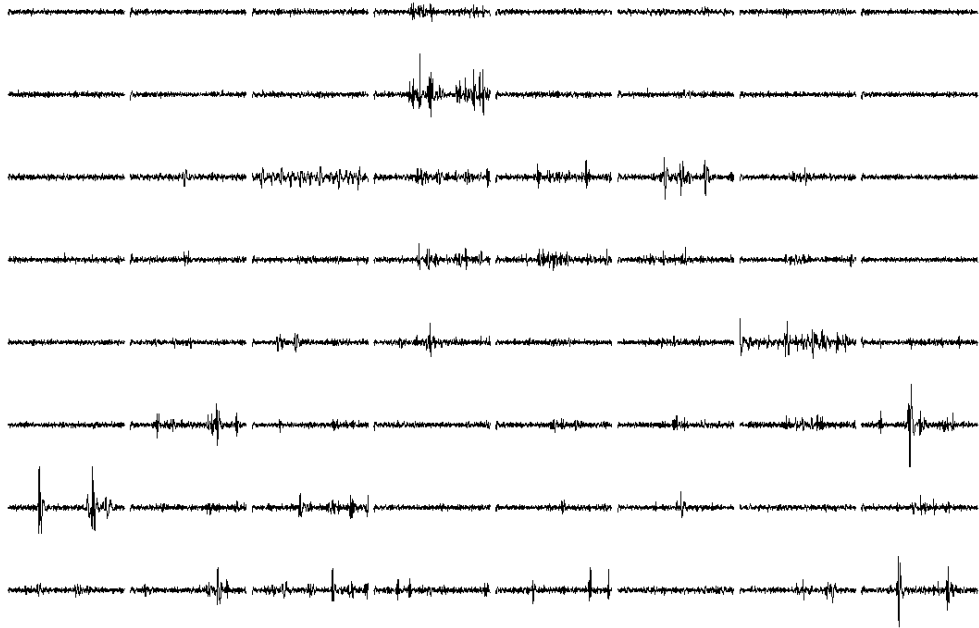
図 5.7 空間領域を限定した TOSP の作成方法の概要.

5.3 実験結果

5.3.1 誘発応答の局所的伝播

本研究で用いた細胞外電位多点計測システムを用いて、MED プローブ上に培養されたラット胎児大脑海馬領域由来神経回路網の自発性神経活動を計測した。(図 5.8-a).

(a)



(b)

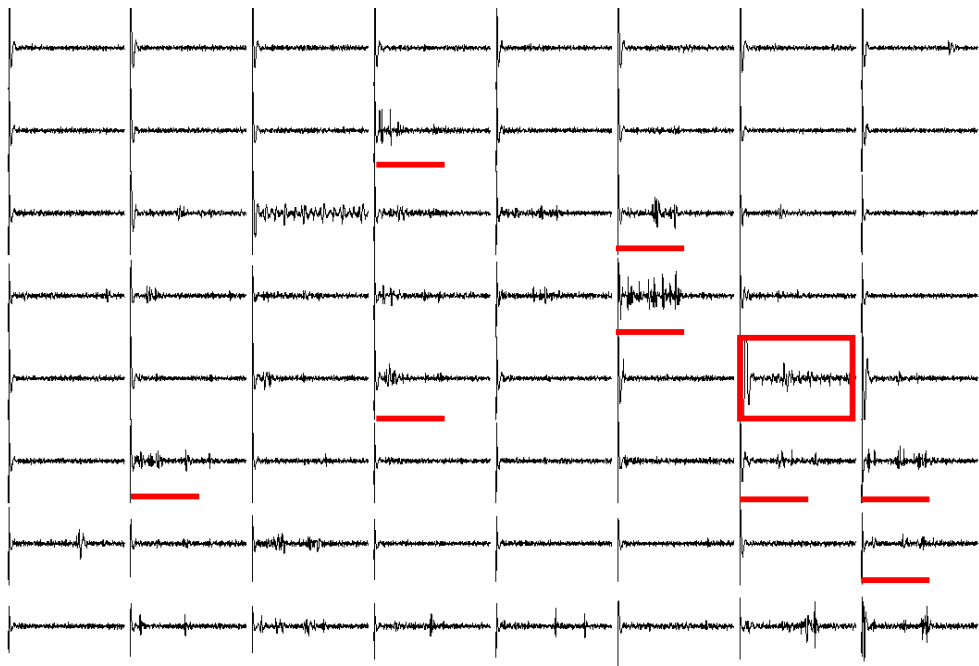


図 5.8 自発性神経活動と誘発応答の一例 (E18DIV42). (a) 自発性神経活動, (b) 誘発応答. 赤枠は刺激電極, 赤線は誘発応答の例を示す. スケールバーは $100 \mu\text{V} \times 100 \text{ms}$.

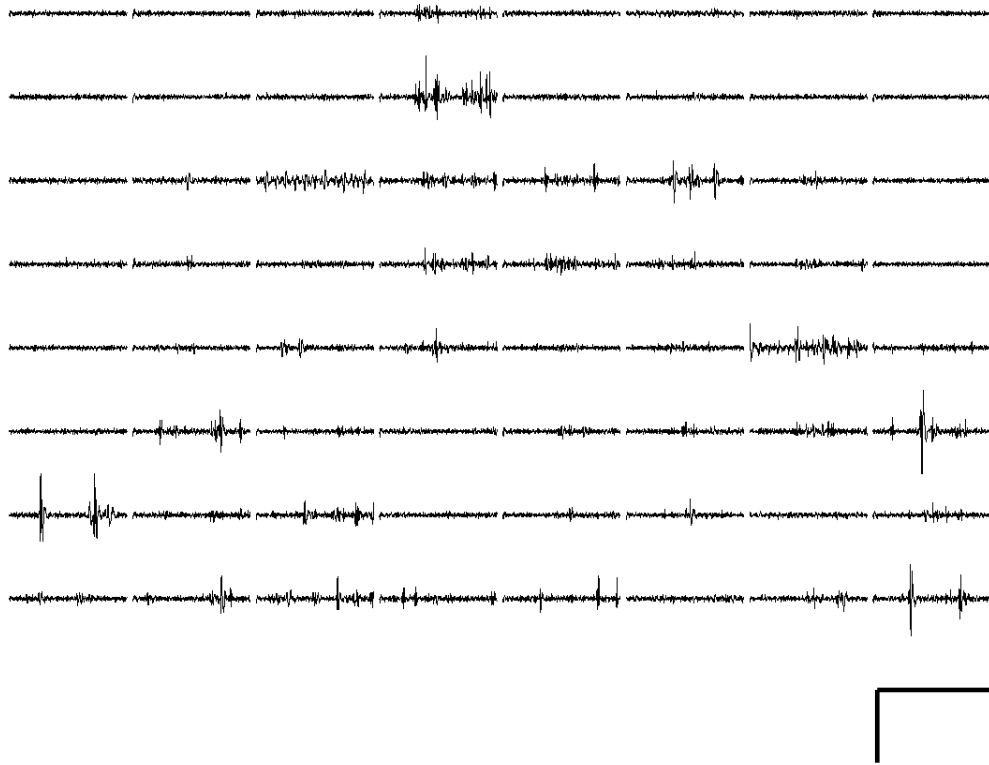
自発性神経活動の計測には E18DIV28-56 の神経回路網を用いた. 全 64 電極から計測され

た合計自発性神経活動の 1 秒間における自発性神経活動頻度は 548.44 ± 36.78 (平均値 \pm 標準誤差, $N = 6$) であった。

自律的に観察される自発性神経活動に対し、刺激電流を印加した際に発生する神経電気活動を誘発応答という。本研究では、60 秒ごとに特定の刺激電極に電流刺激を印加した際の誘発応答を確認した (図 5.8-b)。誘発応答の計測には E18DIV31 - 64 の神経回路網を用いた。刺激電流を印加した際、特に刺激電極付近で高頻度の神経電気活動が観察される。全 64 電極から計測された合計誘発応答の 1 秒間における誘発応答神経活動頻度は 386.84 ± 90.46 (平均値 \pm 標準誤差, $N = 6$) であった。

計測された自発性神経活動から作成した空間領域を制限した TOSP テンプレートと、各電極の神経電気活動から作成した 5 ミリ秒ごとの特徴ベクトルとの差分値平均の時間変動 ${}_mDT_t$ を算出した (図 5.9)。自発性神経活動から算出した局所的 TOSP テンプレートとの ${}_mDT_t$ は全計測時間においてほぼ一定の値で推移したことから、自発性神経活動は全計測時間において安定して背景的に存在している神経電気活動であることが示唆された。

(a)



(b)

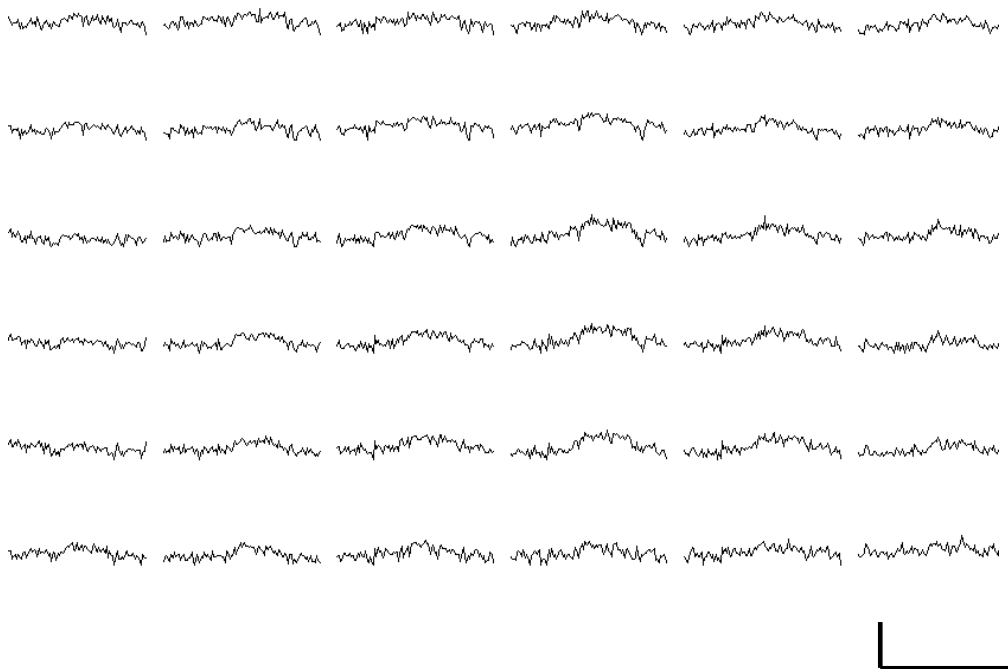


図 5.9 局所的 TOSP テンプレートと、各電極周辺の自発性神経活動から算出された局所 mDT_t 。(a) 計測された自発性神経活動の一例 (E18DIV44)。(b) 計測された自発性神経活動から算出した mDT_t 。赤棒は刺激電極を示す。スケールバーは 3 スパイク \times 500 ms。

続いて、誘発応答と自発性神経活動から算出した局所的 TOSP テンプレートとの mDT_t を算出した (図 5.10)。刺激電極を中心に mDT_t が刺激電流印加直後に増加した。興味深いことに、刺激による活動電位が伝播することにより発生すると考えられる 2 次的な活動は、刺激電極より遠位で顕著であり、これは誘発された活動が刺激点より遠位になるほど拡散し、分岐した信号が作用し合っていることを示す。

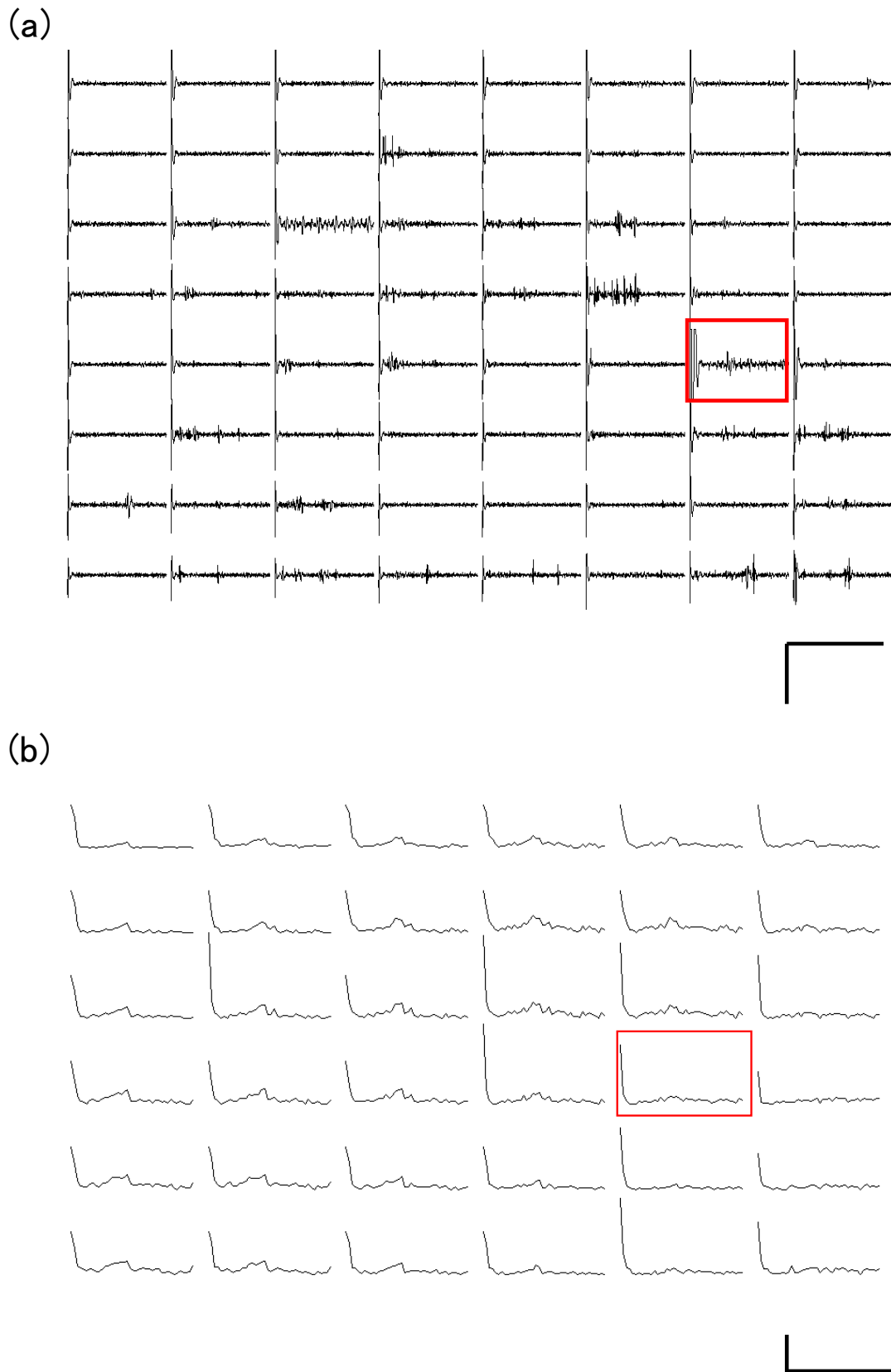


図 5.10 局所的 TOSP テンプレートと、各電極周辺の誘発応答から算出された局所 mDT_t .
 (a) 計測された誘発応答の一例 (E18DIV44). (b) 計測されて誘発応答から算出した mDT_t .
 赤枠は刺激電極を示す. スケールバーは 3 スパイク \times 500 ms.

刺激電流印加の影響，及び誘発応答の伝播をより詳細に解析するため，刺激電極，刺激電極に隣接した 3×3 領域の 8 電極（中心の刺激電極を除く），および刺激電極から 2 電極離れた周辺の 5×5 領域内の 16 電極の 3 つの領域について局所的な mDT_t を平均して比較した（図 5.11, 5.12, 5.13）.

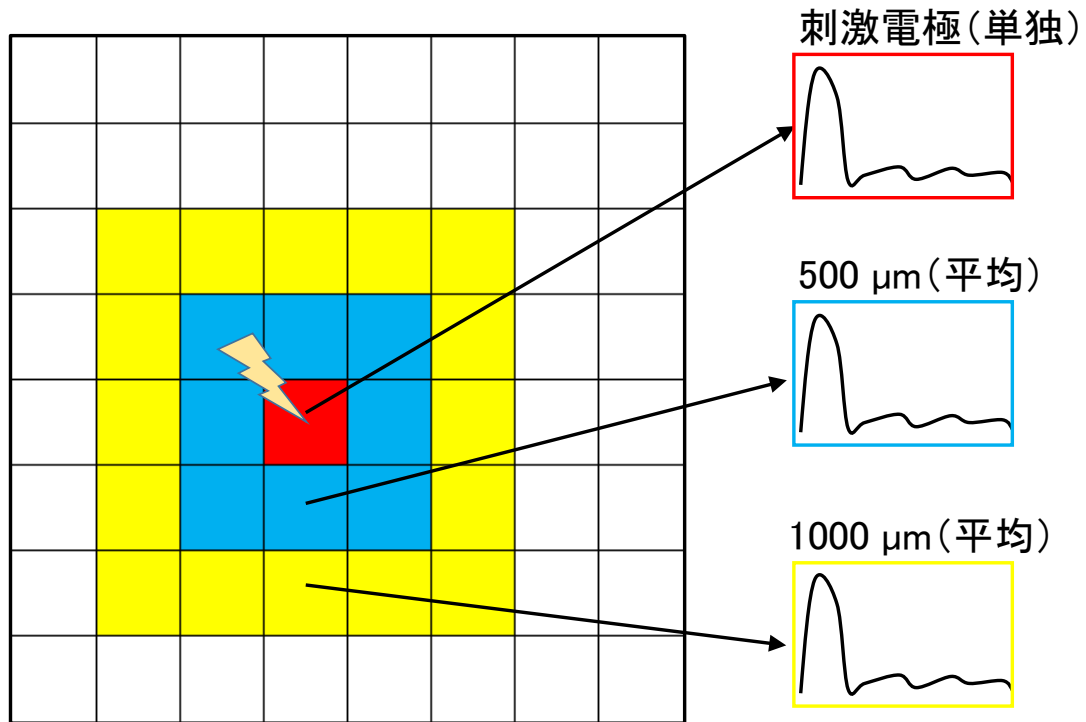


図 5.11 刺激電極，刺激電極に隣接した領域，刺激電極から 2 電極離れた領域の概念図.

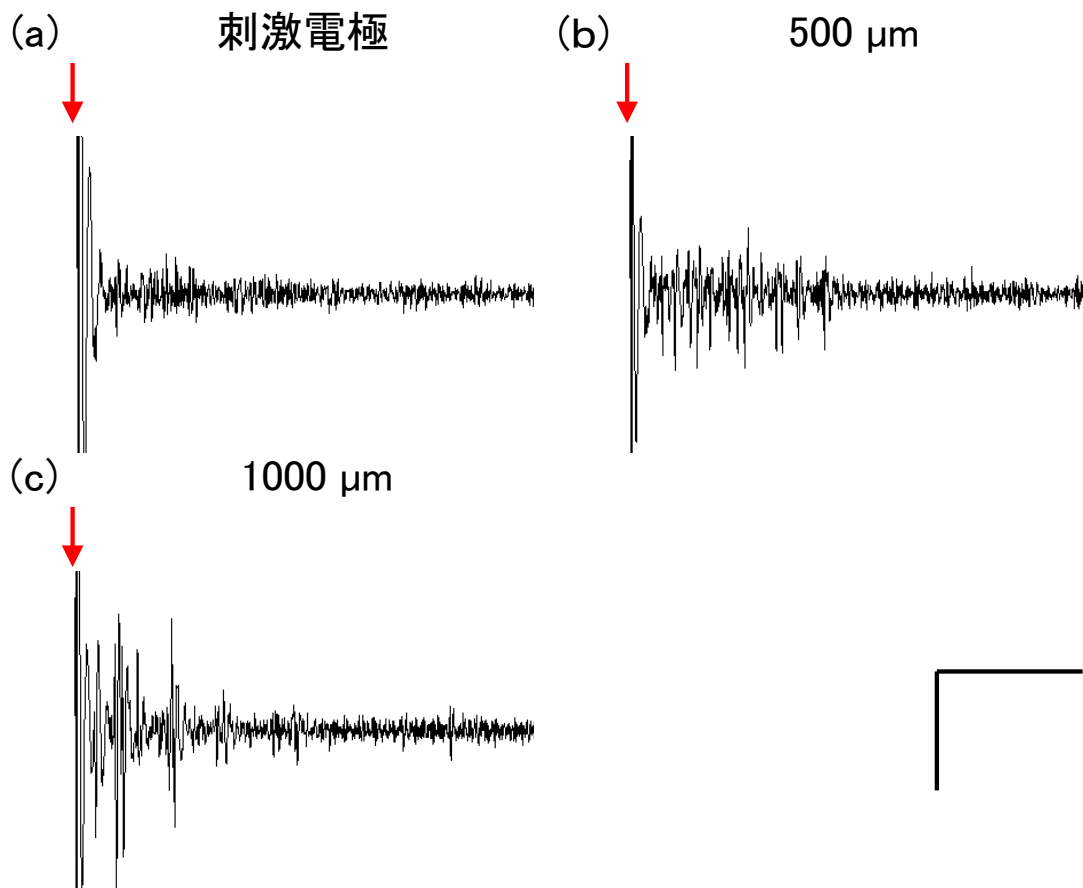


図 5.12 刺激電極周辺の誘発応答波形の一例 (E18DIV44). (a) 刺激電極, (b)500 μm 遠位, (c)1000 μm 遠位. それぞれ, 赤矢印の時点で電流刺激を印加した. スケールバーは $50 \mu\text{V} \times 50 \text{ms}$.

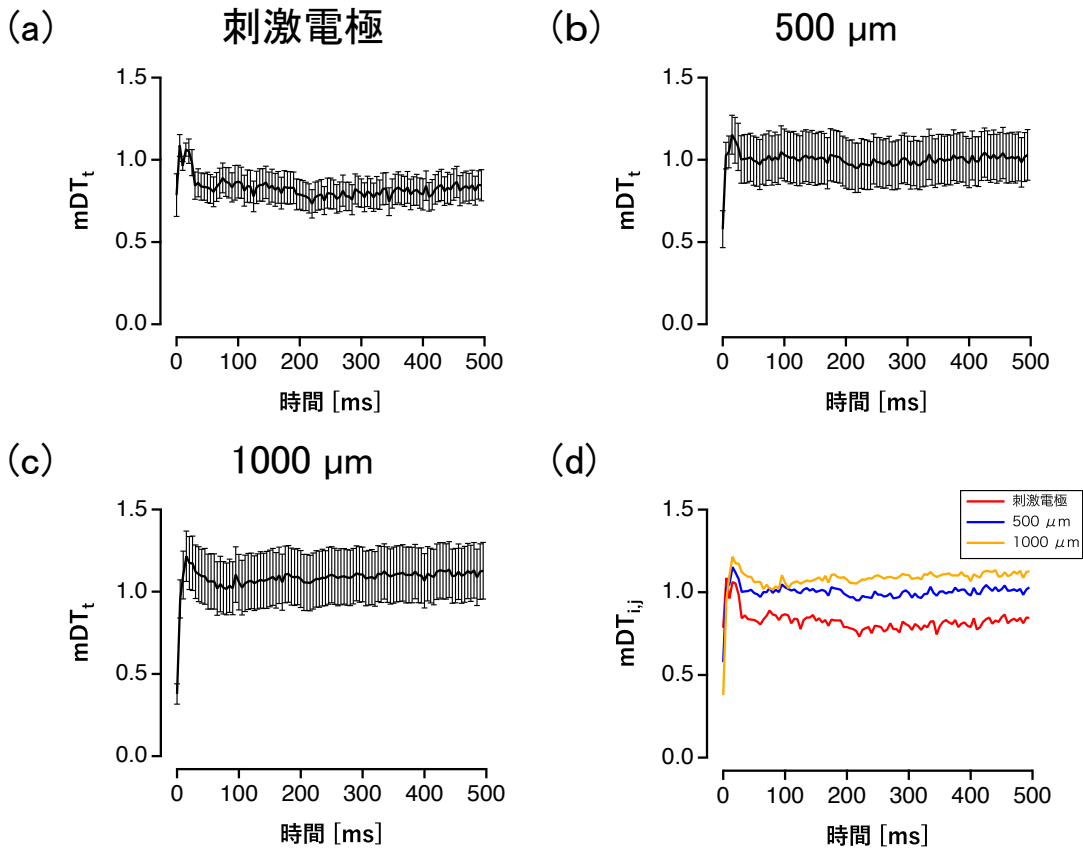


図 5.13 刺激電極，刺激電極に隣接した 500 μm 以内，刺激電極から 1000 μm 以内の平均 mDT_t . (a) 刺激電極，(b)500 μm 遠位，(c)1000 μm 遠位. エラーバーは標準誤差を示す (E18DIV28-56, (a) N =6, (b) N = 48, (c) N = 96). (d) (a)-(c) の平均値.

電流刺激電極を中心として作成した局所 TOSP から算出した差分値 mDT_t は，刺激電流印直後に上昇し，刺激電流印加後 40 ミリ秒以降は一定値で推移した. このことから，刺激電極では電流刺激印加直後に誘発応答が発生し，40 ミリ秒前後で収束することが示唆された. 続いて，刺激電極に隣接した 500 μm 以内の電極 (8 電極) の局所 mDT_t の平均値は刺激電流印加から 20 ミリ秒後に増加し，約 40 ミリ秒後から低い値で安定した. また，刺激電極における mDT_t と比して高い値で推移した. このことから，刺激電極付近で発生した誘発応答が約 40 ミリ秒で刺激電極を中心とした 500 μm の範囲に少し遅れて伝播したことが示唆された. 続いて，刺激電極から 1000 μm の位置にある電極 (16 電極) における局所 mDT_t を解析した. 局所 mDT_t は刺激電流印加から 20 ミリ秒後に増加した後，減衰に転じ約 80 ミリ秒後から安定した. また，刺激電極から 500 μm の位置にある隣接電極から算出した局所 mDT_t の平均と比して高い値で推移した. このことから，刺激電極付近で発生した誘発応答が約 80 ミリ秒で刺激電極を中心とした 1000 μm 遠位の領域に遅れて伝播し，しかもその電位変動は遠位になる程，ばらつきが大きいことが示唆された.

5.3.2 細胞外ブドウ糖濃度と誘発応答の関係性

刺激の伝播過程に対する細胞外ブドウ糖濃度の影響を明らかにするために、電気生理学実験で一般的に使用されている 10 mM のブドウ糖濃度を含有した細胞外記録溶液と、30 mM のブドウ糖を含有した細胞が記録溶液を用いて同様の実験を行った (図 5.14, 5.15)。誘発応答の計測には E18DIV26-34 の神経回路網を用いた。10 mM, 30 mM ブドウ糖を含有した細胞外記録溶液の場合、培養液下と比して概ね低い値となる傾向があった。特に、刺激後 250 ミリ秒程度に発生する 2 次的なピークがほぼ観察されず、信号伝達効率が低下したことが考えられる。

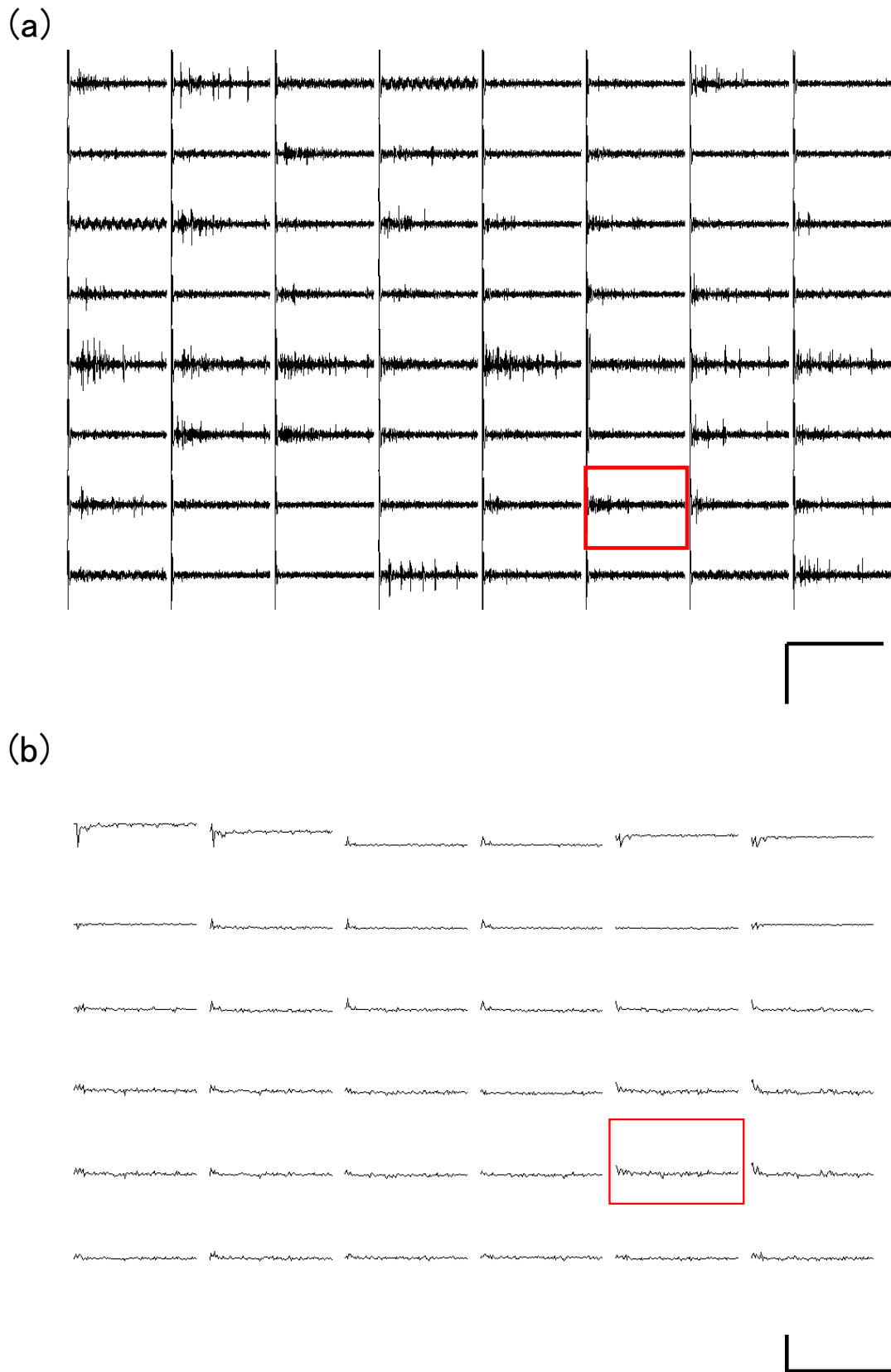


図 5.14 10 mM ブドウ糖濃度下で局所的 TOSP テンプレートと、各電極周辺の自発性神経活動から算出された局所 mDT_t . (a) 計測された誘発応答の一例 (E18DIV29). (b) 計測された誘発応答から算出した mDT_t . 赤枠は刺激電極を示す. スケールバーは 3 スパイク \times 500 ms.

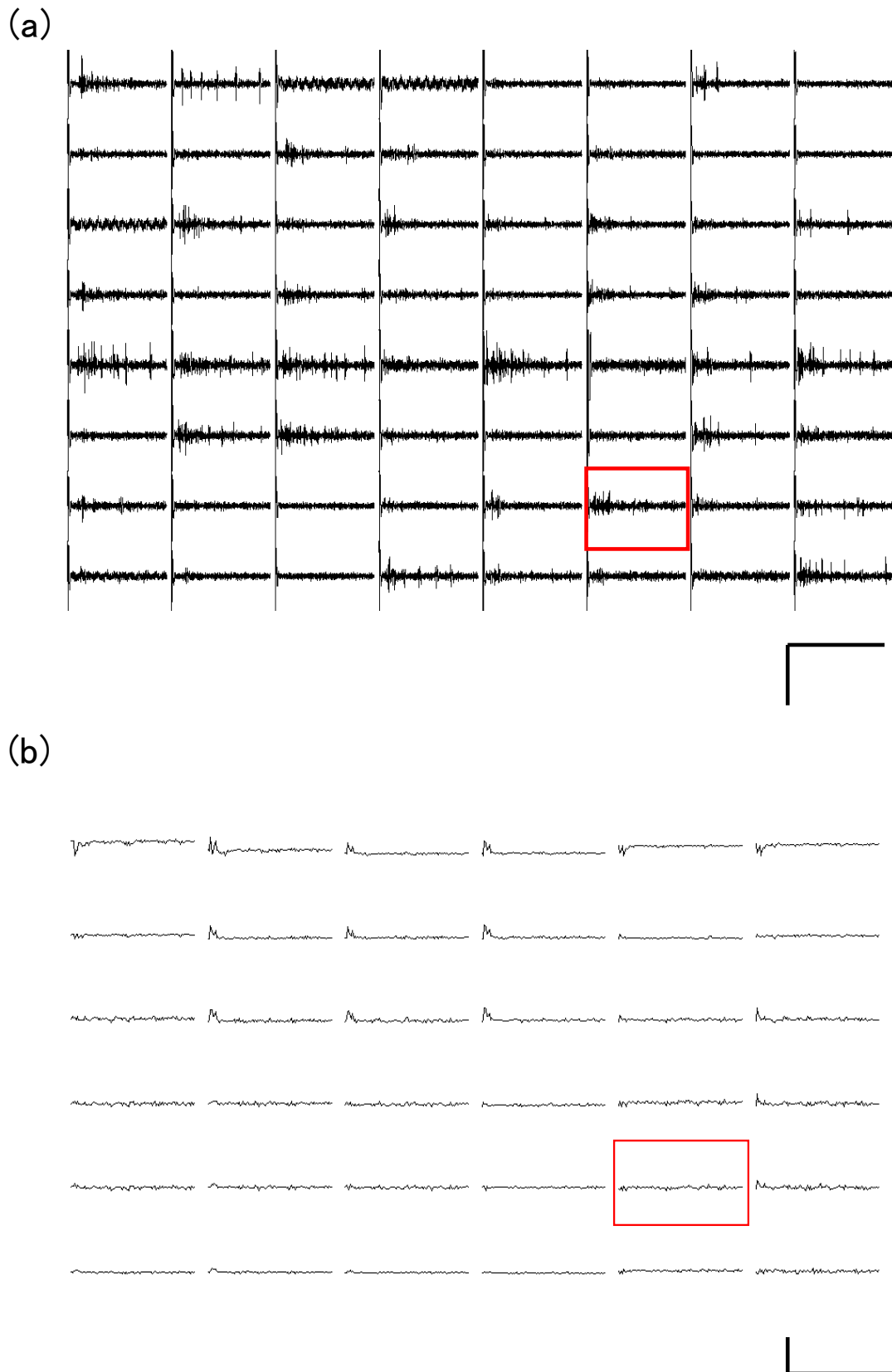


図 5.15 30 mM ブドウ糖濃度下で局所的 TOSP テンプレートと、各電極周辺の自発性神経活動から算出された局所 mDT_t . (a) 計測された誘発応答の一例 (E18DIV29). (b) 計測された誘発応答から算出した mDT_t . 赤枠は刺激電極を示す. スケールバーは 3 スパイク \times 500 ms.

10 mM ブドウ糖条件下で刺激電極における局所的 mDT_t は、刺激電流印加直後は高値を示したが、急速に減衰し、ほぼ一定値で推移した (図 5.16, 5.17). このことから、刺激の影響はごく短時間で収束し、その後自発性神経活動が優位な平均的な電気活動と類似した神経電気活動が発生したことが示唆された.

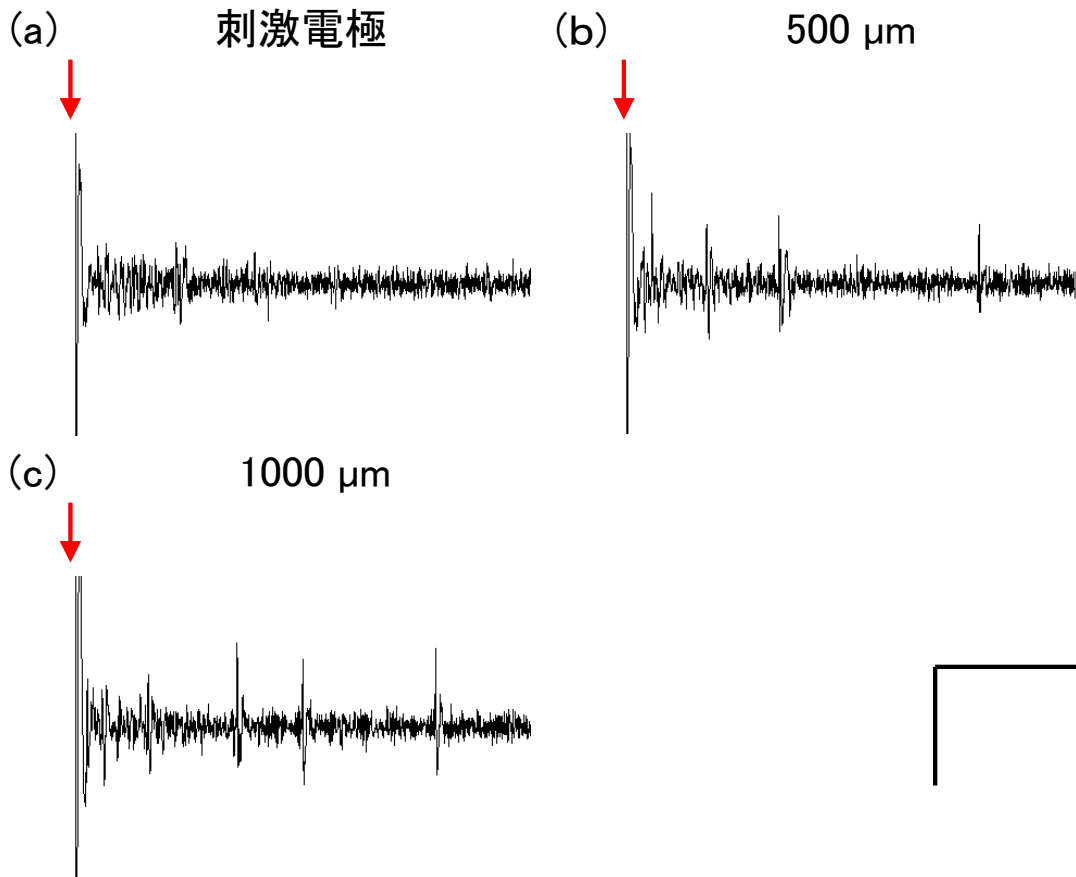


図 5.16 10 mM ブドウ糖濃度条件下における刺激電極周辺の誘発応答波形の一例 (E18DIV29). (a) 刺激電極, (b)500 μm 遠位, (c)1000 μm 遠位. それぞれ赤矢印の時点で電流刺激が印加された. スケールバーは $50 \mu\text{V} \times 50 \text{ms}$.

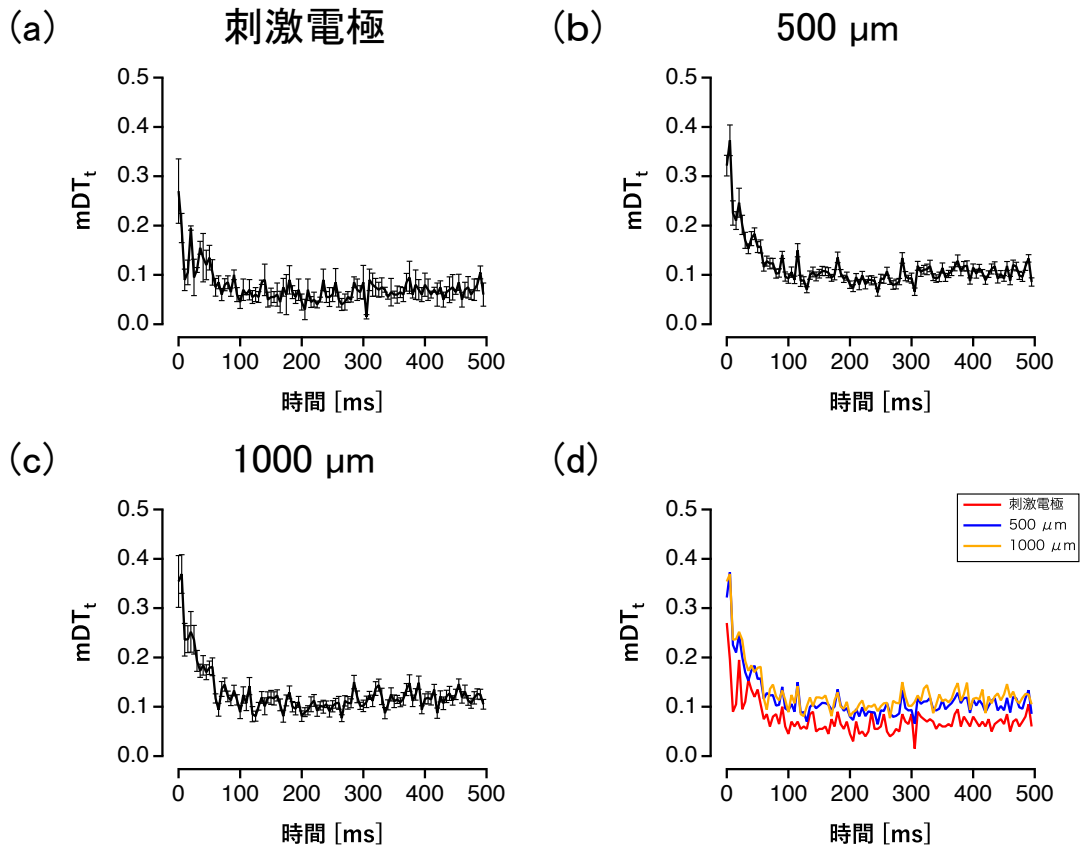


図 5.17 10 mM ブドウ糖濃度条件下における刺激電極，刺激電極に隣接した 500 μm 以内，刺激電極から 1000 μm 以内の平均 mDT_t . (a) 刺激電極，(b) 500 μm 遠位，(c) 1000 μm 遠位. エラーバーは標準誤差を示す (E18DIV26-34, (a) N = 4, (b) N = 32, (c) N = 64). (d) (a)-(c) の平均値.

続いて，刺激電極に隣接した 500 μm 以内の領域における平均 mDT_t は，刺激電流印加時に高い値を示した後，急速に減衰して約 100 ミリ秒後から低値で安定した。また，1000 μm の位置にある領域の平均 mDT_t は刺激電流印加直後から急激に増加した後，減衰に転じ約 100 ミリ秒後から安定し，その値は隣接 500 μm における平均 mDT_t とほぼ同等の値で推移した。

30 mM ブドウ糖条件下で刺激電極における局所 mDT_t は，刺激電流印加直後はやや高値を示したが，すぐに減衰しほぼ一定値で推移した (図 5.18, 5.19)。

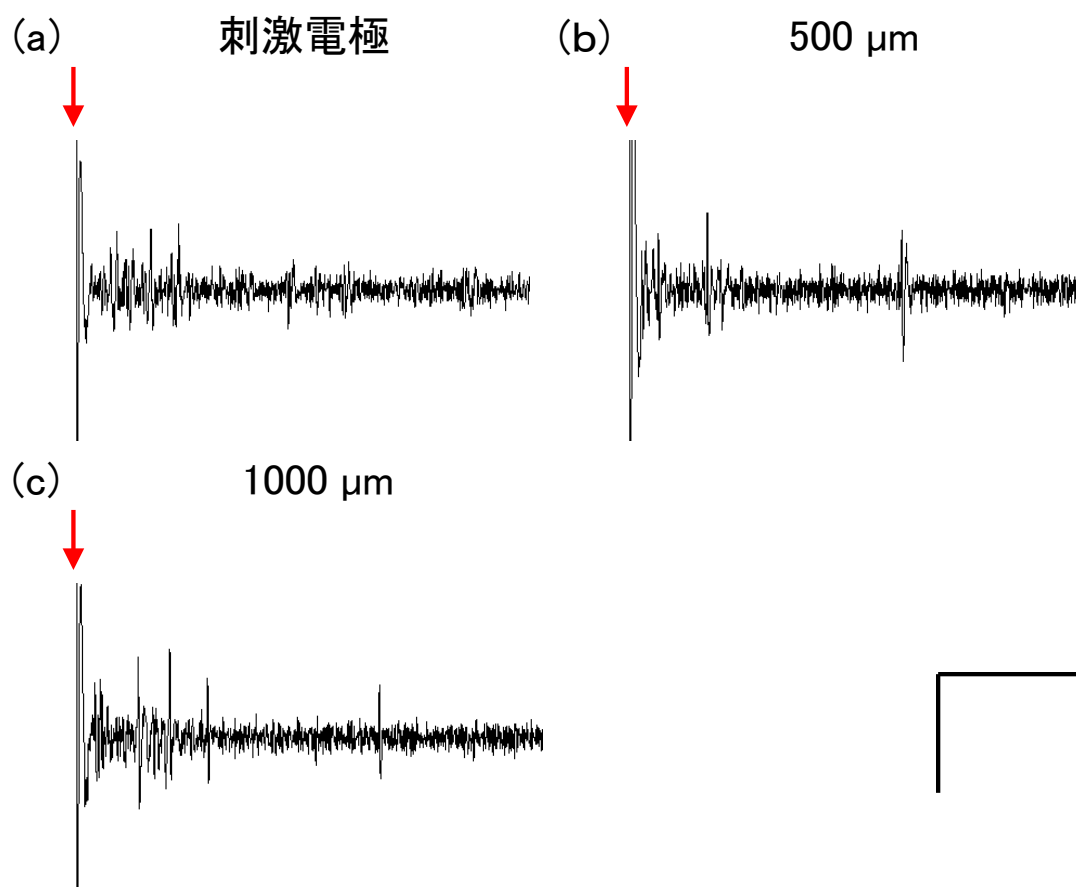


図 5.18 30 mM ブドウ糖濃度下における刺激電極周辺の誘発応答波形の一例 (E18DIV29). (a) 刺激電極, (b) 500 μm 遠位, (c) 1000 μm 遠位. それぞれ赤矢印の時点で電流刺激が印加された. スケールバーは 50 μV × 50 ms.

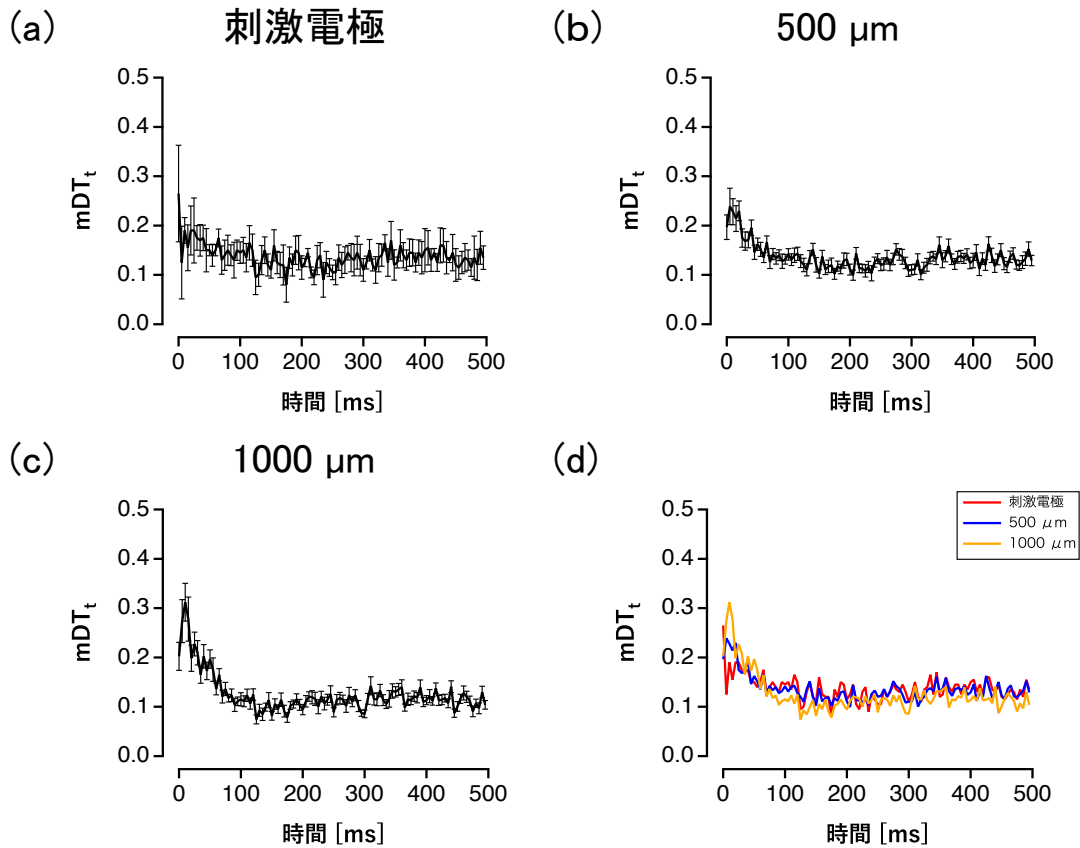


図 5.19 30 mM ブドウ糖濃度条件下における刺激電極，刺激電極に隣接した 500 μm 以内，刺激電極から 1000 μm 以内の平均 mDT_t . (a) 刺激電極，(b) 500 μm 遠位，(c) 1000 μm 遠位. エラーバーは標準誤差を示す (E18DIV26-34, (a) $N=4$, (b) $N=32$, (c) $N=64$). (d) (a)-(c) の平均値.

このことから，刺激の直接的な影響は弱く，かつごく短時間で収束し，その後自発性神経活動が優位な平均的な電気活動と類似した神経電気活動が発生したことが示唆された．続いて，刺激電極に隣接した 500 μm 以内の領域における平均 mDT_t は，刺激電流印加時に高い値を示した後，急速に減衰して約 100 ミリ秒後から低値で安定した．また，1000 μm の位置にある領域の平均 mDT_t は刺激電流印加直後から急激に増加した後，減衰に転じ約 100 ミリ秒後から安定し，その値は隣接 500 μm における平均 mDT_t とほぼ同等の値で推移した．

30 mM ブドウ糖濃度下では自発性神経活動による揺らぎが少なく，局所 mDT_t ，平均 mDT_t は，10 mM ブドウ糖濃度下での場合と比して概ね低い値で推移した．特に刺激電極，刺激電極に隣接した 500 μm 以内の領域での mDT_t は刺激直後のピークが小さく，刺激電流による影響が伝播しにくい状態であったことが観察された．

5.4 考察

5.4.1 刺激入力位置における誘発応答

本研究において、5 ミリ秒ごとの自発性神経活動から作成した特徴ベクトルと、自発性神経活動から作成した局所的 TOSP テンプレートとの空間領域を限定した差分値である mDT_t を算出した結果、 mDT_t は一定の数値範囲内で推移した (図 5.9)。TOSP テンプレートは自発性神経活動が持つ神経電気活動パターンを平均化しているため、この結果は蓋然性のある結果であると言える。自発性神経活動は安定して発生し、背景活動を形成していると言える。

刺激電極における神経電気活動から算出した mDT_t は、刺激電流印加直後から急激に減少し、刺激電流印加後 100 ミリ秒以降は小さな値で推移した (図 5.10)。空間領域を制限した TOSP テンプレートは、局所的な自発性神経活動に近い平均的な神経電気活動パターンを示している可能性が高い。このことから、刺激電極では刺激電流印加直後 100 ミリ秒以内に mDT_t のピークがあり、自発性神経活動と大きく異なる神経電気活動パターンが出現したことを示唆する。この時間領域では、刺激電流の印加によって直接誘発された活動電位と、刺激電流の印加により活動電位が発生したシナプス後細胞からシナプス伝達によって誘起された活動電位が含まれていると考えられる。

5.4.2 領域限定 TOSP

mDT_t はある電極周辺での自発性神経活動に類似した神経電気テンプレートとの差分であるので、大きな値は刺激電流の印加による影響、すなわち刺激による誘発応答の特徴的な活動パターンを示している。刺激電極周辺では、 mDT_t は刺激電流の印加後 40 ミリ秒で最大に達し、その後減少した (図 5.13-a)。つまり、刺激電極周辺では誘発応答の特徴的な神経電気活動が発生した後、自発性神経活動に近い神経電気活動に復帰した。培養系においても反響的な回路が形成されていることが知られており、その回路により刺激電極周辺では、刺激電流による直接誘発された活動が発生した後に、これらの活動電位が伝播して反響的な活動が戻ってくると考えられる [22]。

また、刺激電極の隣接 500 μm の領域から算出した mDT_t は刺激電極における mDT_t と同様に 20 ミリ秒で最大値となり、その後は約 40 ミリ秒から刺激電極における mDT_t より高い値で推移した (図 5.13-b)。これは、刺激入力により直接的に誘発された活動電位の伝播は 20 ミリ秒以内に完了し、その後この活動により反響的に生じた応答が拡散しながら緩やかに伝播することによると考えられる。刺激電極周辺 1000 μm の領域から算出した mDT_t においては、刺激電流印加直後 20 ミリ秒で最大となり、約 80 ミリ秒後からほぼ一定の値で推移した (図 5.13-c)。また、刺激電極の隣接 500 μm の領域の神経電気活動から算出した mDT_t と比して安定して高かったことから、神経回路網の誘発応答は刺激電極から 1000 μm 以上の範囲まで伝播し、さらにこの活動はばらつきが大きいと考えられる。複数の経路に分散して伝播

した信号が時間がずれて再び集約される過程がある可能性がある。

刺激電極からの物理的距離が遠い電極周辺での神経電気活動は、伝播してきた誘発応答と自発性神経活動、反響回路によって2次的に誘発された活動などが融合された神経電気活動パターンを形成していると考えられる。それ以上に遠い領域では、自発性神経活動が支配的になっていると考えられる。

以下は未だ限定的な結果に基づく考察に過ぎないが、自発性神経活動と誘発応答とで共通の活動パターンが観察されることを考えると、刺激入力による直接的な誘発応答パターンは自発性神経活動の平均値とは異なったパターンであるが、個別の自発性神経活動パターンとは類似したパターンを含んでいる可能性がある。直接的な刺激の影響とは、単一シナプスを介して連続的に接続している神経細胞に伝播する活動である。さらに、信号伝達の分岐、反響回路によって戻ってきた信号のさらなる伝播、または背景的な自発性神経活動を含む複数のソースからの入力複合されることで、刺激入力時刻から遅れて2次的に発生する活動の伝播が存在する。この2次的な活動が非同期的に伝播するため、刺激入力から遠位の領域では、 mDT_t のピークは裾野が広くなり、かつこの広がり方は刺激位置より遠い領域で顕著になることが考えられる。すなわち、直接的な誘発応答ではないが、刺激によって引き起こされる半誘導的な自発性神経活動のようなばらつきのある活動が、刺激電極より遠位の領域で生成されている可能性がある。

電流刺激による誘発応答は、テンプレートとして用いた平均的な自発性神経活動とは異なる活動パターンを有しているが、電流刺激から遠い領域では自発性神経活動に近くなり、自発性神経活動と類似した活動パターンが発生することが示唆された。

5.4.3 細胞外ブドウ糖濃度変化による誘発応答の伝播特性

本実験では、細胞外ブドウ糖濃度を変化させた状態で誘発応答を計測し、TOSP テンプレートとの差分値である mDT_t を算出した (図 5.14, 5.15)。10 mM, 30 mM ブドウ糖濃度条件下では、 mDT_t の推移は培養液下 (17.5 mM ブドウ糖濃度条件) の場合とほぼ同等であったが、刺激電極近傍で mDT_t 上昇が顕著ではなかった (図 5.17, 5.19)。

30 mM ブドウ糖濃度条件下では、10 mM ブドウ糖濃度条件下と比して mDT_t が小さく推移し、特に刺激点付近においては電流刺激印加直後の mDT_t のピークが小さかった (図 5.19-a, b)。このことから、30 mM ブドウ糖濃度条件下では、電流刺激による直接的な応答が小さく、刺激点より遠位で半誘発的な自発性神経活動が発生しやすい状況があることが推測される。

培養液下 (17.5 mM ブドウ糖濃度条件) と比して、10 mM, 30 mM ブドウ糖濃度条件下では、各細胞間の刺激入力、及び伝播に対するロバスト性が低下し、相互作用で発生する自発性神経活動頻度も低下すると考えられる。本実験において細胞外ブドウ糖が至適濃度でない場合は、電流刺激による直接的な影響が減弱し、これにより誘起された2次的な信号の伝搬が優勢となるのではないかと考えられる。

5.5 結論

平均的な神経電気活動パターンテンプレートを作成し、その差分から電流刺激印加の影響が及ぶ空間領域を解析した。結果として、刺激点からの距離に応じて電流刺激印加の直接的な影響の成分による神経電気活動パターンと、背景的な自発性神経活動などが複合した二次的な活動パターンが発生していることを明らかにした。また、細胞外ブドウ糖濃度が至適ブドウ糖濃度と異なる場合、神経回路網内の信号伝達が減弱し、結果として自発性神経活動の活性が落ちる可能性を示した。これは、高ブドウ糖濃度条件下で自発性神経活動と誘発応答との類似性が上昇したという結果と一致する。

第 6 章

考察・結論

6.1 培養神経回路網の細胞外ブドウ糖要求性

培養神経回路網は培養日数に依存して自発性神経活動頻度が増加し、神経活動パターンが複雑化した。神経細胞の静止膜電位の維持と活動電位の発生には多くのエネルギーが要求されると予想される(2章, 図 2.12, 2.13)。培養された神経回路網においても、培養日数が経過するに伴い、自発性神経活動頻度が増加するが、これに伴って神経回路網のエネルギー要求量が増加する可能性が高い。

本研究で用いた培養系の場合、0 mM ブドウ糖条件下で 15 時間後には、自発性神経活動頻度が 3 割程度維持されていた(2章, 図 2.14, 2.15, 表 2.1)。これは、神経回路網を構成する細胞群が、培養液中のブドウ糖を取り込み、代謝することにより、細胞外のブドウ糖が欠乏した状態で 3 割程度の自発性神経活動を生成しうるエネルギーを蓄積していたことを示唆する。

栄養サポートの少ない培養系の神経回路網の場合、一般的な条件では哺乳動物の生理的な血中ブドウ糖濃度(5.5 mM-10 mM, [49])より高濃度の 20 mM 前後のブドウ糖濃度条件下で培養が行われている[50-52]。また、本研究では、細胞播種時の神経細胞の初期密度が 7800 cells / mm² と、関連する他の研究よりも高密度で播種・培養した神経回路網を用いた。これは、神経細胞の密度を多くし、シナプスの形成確率を上昇させることで自発性神経活動の長期の活性化を意図したものである。細胞数の多さと神経電気活動の活性化はより多くのエネルギーを要求すると考えられ、本研究で用いた神経回路網を活性状態で維持するためには生理的条件よりも多くのブドウ糖濃度が必要であることが考えられる。

神経回路網の細胞外ブドウ糖濃度が必要量より下回った場合、神経回路網の自発性神経活動頻度は低下することが考えられる。細胞外ブドウ糖が長時間にわたって欠乏した場合に自発性神経活動頻度が低下する理由として、エネルギー消費量を抑えるために神経回路網が敢えて自発性神経活動頻度を低下させ、生理的に要求ブドウ糖量を減少させている可能性がある。一方で、細胞外ブドウ糖が欠乏した場合は、細胞の生存に必要なエネルギーが不足して細胞が死滅し、神経回路網を構成する細胞数が減少している可能性も考えられる。細胞外ブドウ糖が欠乏した場合、神経回路網全体で平均的に神経細胞が死滅することが考えられる。しかしながら、本研究で得られた結果においては、細胞外ブドウ糖が欠乏した状態で 15 時間経過した後の自発性神経活動は特定の電極からのみ観察された(図 2.14)。

細胞外ブドウ糖の欠乏により平均的に神経細胞が死滅しているのであれば、自発性神経活動が観察される電極数は減少せずにそれぞれの電極において自発性神経活動頻度が低下することが考えられる。また、神経回路網はその電気活動を維持するために回路網内の機能的構造を調整している可能性がある。細胞外ブドウ糖濃度が欠乏した状態で自発性神経活動頻度が低下するのは、外部のエネルギー量が減少することで通常より早いペースで細胞死が起こることが原因ではなく、自発性神経活動頻度を積極的に低下させ、エネルギー要求量を下げても神経回路網の同期的な活動を維持しようとしているのではないかと考える。

6.2 自発性神経活動と細胞外ブドウ糖濃度との関係性

培養神経回路網の自発性神経活動は、細胞外ブドウ糖濃度変化に依存して変化することが明らかとなった(3章, 図 3.9 - 3.10)。細胞外ブドウ糖は神経細胞を含む細胞にとっての主要なエネルギー源であり、生体と比して栄養的サポートの少ない培養系では、外部のブドウ糖濃度はその生存や活性の維持に大変重要な要素である。従って、低ブドウ糖濃度における自発性神経活動頻度の低下は充分起こりうる現象である。

自発性神経活動頻度は至適ブドウ糖濃度までは細胞外ブドウ糖濃度の上昇に伴って増加したが、30 mM ブドウ糖濃度条件下では翻って活動頻度が低下した。神経細胞は 30 mM ブドウ糖濃度に 2 日以上暴露されることでブドウ糖毒性が発現し細胞死を引き起こすことが報告されているが [61]、本実験で 30 mM ブドウ糖に暴露する時間は精々 1 時間であり、ブドウ糖毒性が発現する程長時間ではない。また、30 mM ブドウ糖濃度下に 1 時間程度暴露された神経回路網では、10 mM ブドウ糖濃度下に 1 時間程度暴露された神経回路網と比して有意な細胞死の増加は確認出来なかった(3章, 図 3.13)。これらの結果から、少なくとも本実験条件においてブドウ糖毒性による神経細胞死が発現していないことが明らかとなった。

また、神経回路網の至適ブドウ糖濃度は培養条件によって調整される可能性が示された(3章, 図 3.15, 3.16)。ブドウ糖濃度 30 mM 条件下で培養した神経回路網は、通常条件下で培養された神経回路網と同様に培養日数経過に伴って自発性神経活動頻度、自発性バースト活動頻度、自発性同期バースト活動頻度が増加した(3章, 図 3.21-3.22)。高ブドウ糖濃度条件下で培養した神経回路網は、自発性神経活動を指標とした場合、通常条件下で培養した神経回路網と同様であった。一方、低ブドウ糖濃度下で培養した神経回路網は通常条件下で培養した神経回路網より自発性神経活動頻度と自発性同期バースト活動頻度が有意に低下したが(3章, 図 3.21-3.22)、自発性同期バースト活動頻度については有為な低下はなかった。低ブドウ糖濃度条件下で外部エネルギー量が少ない神経回路網は、その環境に適応し同期的な神経電気活動を維持するよう発展する可能性がある(図 6.1)。

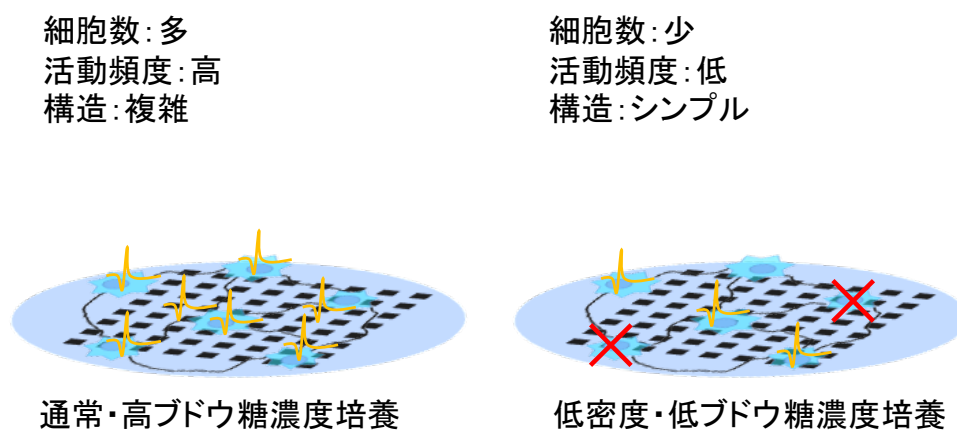


図 6.1 通常条件, 高ブドウ糖濃度条件, 低ブドウ糖条件下で培養した神経回路網の模式図。

6.3 誘発応答パターンと細胞外ブドウ糖濃度との関係性

従来の知見では自発性神経活動は、刺激入力によって発生した誘発応答の正確な伝播を妨げる雑音として扱われる傾向があった。しかしながら、自発性神経活動と有効な情報を含んだ誘発応答との境界は曖昧であり、明確な識別がされてこなかった。そこで本研究では、自己組織化マップを用いて自発性神経活動と誘発応答の活動パターン識別を試みた。

結果として、自発性神経活動と個々の刺激入力に対応した誘発応答は類似した神経活動パターンを共有していることが明らかとなった（4章、図 4.8, 4.10）。また、異なる電極を刺激した場合の誘発応答同士が類似した神経活動パターンを持つと識別される場合があった。さらに、自発性神経活動は誘発応答と比して、多くの活動パターンを持っていることが示唆された（4章、図 4.9, 4.11）。これらのことから、自発性神経活動は神経回路網の多様な状態に相当する豊富な活動パターンを内包し、誘発応答は電流刺激によってその一部の活動パターンが確率良く引き出されている可能性がある（4章、図 4.21）。

また、10 mM ブドウ糖濃度条件下と比して 30 mM ブドウ糖濃度条件下において、F-SOM では自発性神経活動と識別される確率が増加した（4章、（図 4.13-4.16））。30 mM ブドウ糖濃度条件下では自発性神経活動頻度が減少することが明らかとなっている（3章、図 3.10）。このことから、30 mM ブドウ糖濃度条件下では神経電気活動自体が起こりにくい状態となり、電流刺激の影響が弱く、自発性神経活動と誘発応答の差異が小さくなっている可能性が考えられる。自発性神経活動の基礎は神経細胞間の自発性神経活動の伝播であり、高ブドウ糖濃度条件下では電気信号の伝搬が弱くなっている可能性が考えられる。

神経電気活動パターンは活動電位の伝播の結果発生する。そこで、本研究では平均的な自発性神経活動パターンテンプレートを作成し、電流刺激を印加した時の特徴的な神経電気活動パターンを解析した。結果として、刺激電流印加による直接的な神経電気活動は刺激印加直後 20-40 ミリ秒で刺激電極の周辺に拡散し、その後は背景的な自発性神経活動等からの入力と、電流刺激による影響が複合した 2 次的に発生する誘導的神経活動パターンが発生することが明らかとなった。また、この誘導的神経活動パターンは自発性神経活動パターンに含まれてはいるが、平均的ではない活動が発生することが示唆された（5章、図 5.12, 5.13）。

また、30 mM ブドウ糖濃度条件下では、10 mM ブドウ糖濃度条件下と比して電流刺激印加の直接的な影響が弱く、半誘発的な自発性神経活動の影響が強くと発現している可能性がある（5章、図 5.16-5.19）。細胞外ブドウ糖濃度が至適濃度より低い（10 mM）、もしくは高い（30 mM）場合、電流刺激により発生した活動電位が、少ない数のシナプス結合で次の神経細胞へと伝播する 20 ミリ秒前後の速い電気信号強度が低下し、これにより細胞間の相互作用によって発生する自発性神経活動頻度も低下することが考えられる（第3章、図 3.10）。刺激の伝播領域の減少（5章、図 5.17, 5.19）と自発性神経活動頻度の減少により、局所的かつ直接的な誘発応答の伝播が減少し、2 次的に発生する誘導的神経活動が優位となり、その結果自発性神経活動と類似したパターンの神経電気活動が増大すると考えられる（4章、図 4.16）。30 mM

ブドウ糖濃度条件下で自発性神経活動と誘発応答の類似活動パターンが増大するのであれば、刺激電極から 1000 μm 遠位の領域における平均 mDT_t の刺激電流印加直後のピーク増大は、自発性神経活動に含まれる一定の活動パターンが引き出されていることを示している可能性がある (5章, 図 5.19).

従って、高ブドウ糖濃度条件下では誘発応答と自発性神経活動が複合した神経電気活動が減弱し、自発性神経活動のパターンが優位に呼び出されるというという傾向があるのではないかと考えられる。本研究では、高ブドウ糖濃度条件下での自発性神経活動頻度低下の状況しか観察していないが、細胞外ブドウ糖濃度が 15 – 20 mM の最も自発性神経活動が活性化された状態で誘発応答を解析する必要がある。これは今後の課題としたい。

6.4 生体報酬系学習と血中ブドウ糖濃度

細胞外ブドウ糖は細胞の生死に直結するパラメータであるとともに、神経細胞の活性化は動物の行動活性化に繋がるため、生体にとってブドウ糖の最適濃度は個体の生存と細胞の生存を同時に保障する基礎的な条件であると言える。また、記憶の形成や、認知・学習にも関与すると考えられている海馬領域の神経細胞においても、細胞外ブドウ糖濃度が活動に影響しているとすると、ブドウ糖の代謝は生物の認知や記憶にも影響を与える可能性がある。

脳において、欲求が満たされた際に活性化し、個体に快の感覚を与える神経系を報酬系と呼ぶ。一般的に、報酬系はドーパミン作動性の神経細胞による働きだと言われている。ドーパミン作動性神経細胞の殆どは中脳部位に存在することが知られており [88]、それらの神経細胞が投射対象に信号を送信することで動物は生物学的な快を感じるとされる。脳における報酬系は、行動の結果に意味や価値を記号接地するために重要なシステムであるが、ドーパミンという神経伝達物質の機能は、一部の領域の神経細胞間の伝達効率を上昇させるだけに過ぎない。すなわち、ドーパミン作動性神経細胞が活動すれば動物は「快」を感じるが、では何故ドーパミンでなくてはならないのか、ドーパミンが「快」と何故結び付くのかに関しては不明である。

生物の進化が環境に適応した個体の自然選択によって駆動されていることを考えると、ドーパミン作動性神経細胞の活動と個体の生存とが進化の過程で結び付いた可能性が考えられる。こうして初めて生存と「快」とが結び付き、生物内部の記号である「快」が「生存しやすい状態」という実環境に存在する状態に結び付けられる (記号接地する) と言える。

そもそも記号接地という概念は人工知能開発研究や、認知科学の領域で活発に議論されている概念であり [89]、記号システムにおけるシンボル (記号) が実世界の意味と結び付いた状態を指す。この場合は、「ドーパミンの分泌量」(すなわち快) という記号が「生存に適した状況」という意味に結び付いているということを記号接地と呼んでいることになる。すなわち生物らしい行動の意味や価値を自律的に記号接地させるには、神経回路網のある状態を「生存」と結び付けることが必要であるではないか、と仮定している。

機械の情報処理とは違い、生物は生存を目的とした情報処理を行う必要がある。生存に最

重要なのは外部からのエネルギー獲得であり，細胞外ブドウ糖は生体にとって生存か死を決定する重要なパラメータである．特に，生体の脳においては，神経細胞は外からブドウ糖を取り込み代謝する以外のエネルギー獲得経路を殆ど持たない．細胞外のブドウ糖から得たエネルギーと神経電気活動との間に何らかの相関性があれば，細胞の生存や生物の活動性と，ドーパミン作動性神経細胞の活性化とが関連付けられ，「細胞外ブドウ糖が十分に満たされている」すなわち「生存しやすい状態」にドーパミンの分泌量が意味的に結合する可能性があるのではないかと考えられる．この仮説において，神経細胞の「一般的な性質」として，エネルギーすなわち細胞外ブドウ糖の量と神経電気活動との関係性を解析することは重要である．

実際に，血中ブドウ糖のホメオスタシスに関係なく，記憶形成に関与すると言われる海馬領域において，神経回路網が細胞外ブドウ糖濃度の上昇に伴って活性化することは，エネルギー量の増大と個体の行動の活発化とを結び付け，これにより生存に適した状態とブドウ糖濃度の上昇が結び付けられることになる．さらに，ドーパミンの分泌が受容体を介し，同様に神経電気活動の活性化に結び付くならば，ドーパミンと細胞外ブドウ糖が同じ意味「生存」に結び付くことになると仮定出来る（図 6.2）．

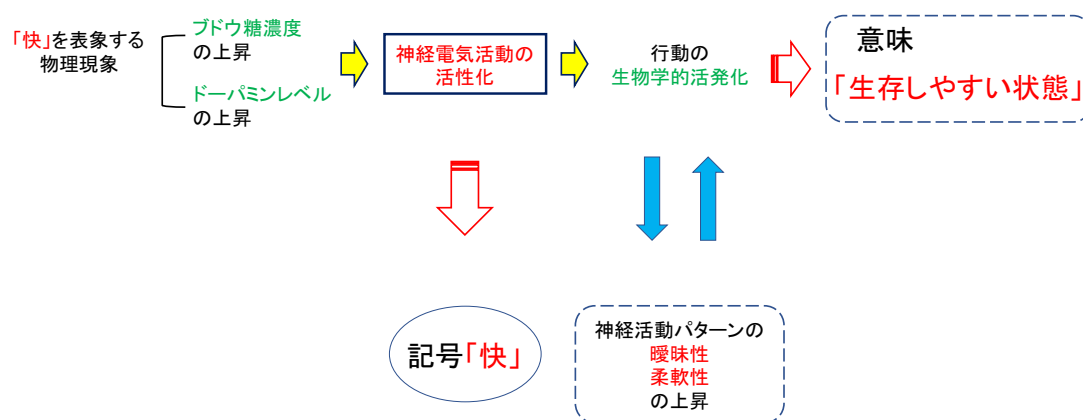


図 6.2 生体の報酬系と記号接地問題の概念図.

6.5 結論

MED プローブ上で培養したラット胎児大脑海馬領域由来の初代分散培養神経細胞において発現する神経電気活動と，細胞外ブドウ糖濃度との関係性について解析した．

培養日数が経過し，自発性神経活動が充分活性化した神経回路網は，細胞外部のブドウ糖が欠乏した状態で，活動頻度を減弱させつつも 15 時間以上自発性神経活動を維持した．一般的な神経細胞の初代培養に用いられる高ブドウ糖濃度条件は，神経回路網の栄養的なサポートが不足した場合においても，その機能を維持するために必要であることを確認した．

培養神経回路網の自発性神経活動頻度は，細胞外ブドウ糖濃度の上昇に伴って増加するが，至適ブドウ糖濃度を超えると低下した．また，神経回路網における至適ブドウ糖濃度は，培養条件に依存して変化している可能性を示した．さらに，神経回路網は培養中の外部ブドウ

糖濃度や神経細胞数に適応し、同期的な神経電気活動を維持できるよう神経回路網を形成することを明らかにした。

培養神経回路網において、自発性神経活動と誘発応答は類似した活動パターンを共有することが明らかとなった。このことから、誘発応答は自発性神経活動が持つ豊富な活動パターンが、特定の入力により確率的に引き出されたものである可能性を示した。また、高ブドウ糖濃度条件下では自発性神経活動と誘発応答との類似性が上昇することを明らかにした。

神経電気活動パターンは、刺激入力の影響が神経回路網内を伝播した結果発生する。そこで、平均的な神経電気活動パターンテンプレートを用いて電流刺激印加の影響が及ぶ空間領域を解析した。その結果、電流刺激の直接的な影響による神経活動パターンと、自発性神経活動などの背景的な神経活動が複合した2次誘導的な活動パターンが発生していることを確認した。また、高ブドウ糖濃度条件下では神経回路網内の信号伝達が減弱し、結果として自発性神経活動の活性が落ちる可能性を示した。これらの結果から、細胞外ブドウ糖濃度に依存して神経細胞間の信号伝達効率が定まり、ひいては神経電気活動パターンが変化することが明らかとなった。

神経回路網内の電気活動パターンが細胞外からのエネルギー供給に影響を受けているとすれば、神経回路網における情報処理に「生存」という生物にとって最大の目的が組み込まれていることを示唆すると考えられる。

参考文献

- [1] E. R. Kandel, J. H. Schwartz, T. M. Jessell, S. A. Siegelbaum, and A. Hudspeth, *Principles of neural science*. McGraw-hill New York, 2012, vol. 4.
- [2] T. C. Sudhof, “The synaptic vesicle cycle,” *Annual Review of Neuroscience*, vol. 27, p. 509, 2004.
- [3] T. V. Bliss and T. Lømo, “Long-lasting potentiation of synaptic transmission in the dentate area of the anaesthetized rabbit following stimulation of the perforant path,” *Journal of Physiology*, vol. 232, no. 2, pp. 331–356, 1973.
- [4] R. Malinow, D. V. Madison, and R. W. Tsien, “Persistent protein kinase activity underlying long-term potentiation,” 1988.
- [5] E. W. Harris, A. H. Ganong, and C. W. Cotman, “Long-term potentiation in the hippocampus involves activation of n-methyl-d-aspartate receptors,” *Brain Research*, vol. 323, no. 1, pp. 132–137, 1984.
- [6] M. Chiappalone, M. Bove, A. Vato, M. Tedesco, and S. Martinoia, “Dissociated cortical networks show spontaneously correlated activity patterns during in vitro development,” *Brain Research*, vol. 1093, no. 1, pp. 41–53, 2006.
- [7] Y. Jimbo, H. P. Robinson, and A. Kawana, “Simultaneous measurement of intracellular calcium and electrical activity from patterned neural networks in culture,” *IEEE transactions on Biomedical Engineering*, vol. 40, no. 8, pp. 804–810, 1993.
- [8] B.-Q. Mao, F. Hamzei-Sichani, D. Aronov, R. C. Froemke, and R. Yuste, “Dynamics of spontaneous activity in neocortical slices,” *Neuron*, vol. 32, no. 5, pp. 883–898, 2001.
- [9] Y. Ikegaya, G. Aaron, R. Cossart, D. Aronov, I. Lampl, D. Ferster, and R. Yuste, “Synfire chains and cortical songs: temporal modules of cortical activity,” *Science*, vol. 304, no. 5670, pp. 559–564, 2004.
- [10] N. Takahashi, T. Sasaki, A. Usami, N. Matsuki, and Y. Ikegaya, “Watching neuronal circuit dynamics through functional multineuron calcium imaging (fmci),” *Neuroscience Research*, vol. 58, no. 3, pp. 219–225, 2007.
- [11] G. Gross, E. Rieske, G. Kreutzberg, and A. Meyer, “A new fixed-array multi-microelectrode system designed for long-term monitoring of extracellular single unit neuronal activity in vitro,” *Neuroscience Letters*, vol. 6, no. 2, pp. 101–105, 1977.

- [12] J. Pine, “Recording action potentials from cultured neurons with extracellular microcircuit electrodes,” *Journal of Neuroscience Methods*, vol. 2, no. 1, pp. 19–31, 1980.
- [13] W. G. Regehr, J. Pine, C. S. Cohan, M. D. Mischke, and D. W. Tank, “Sealing cultured invertebrate neurons to embedded dish electrodes facilitates long-term stimulation and recording,” *Journal of Neuroscience Methods*, vol. 30, no. 2, pp. 91–106, 1989.
- [14] R. Segev, I. Baruchi, E. Hulata, and E. Ben-Jacob, “Hidden neuronal correlations in cultured networks,” *Physical Review Letters*, vol. 92, no. 11, p. 118102, 2004.
- [15] J. van Pelt, P. S. Wolters, M. A. Corner, W. L. Rutten, and G. J. Ramakers, “Long-term characterization of firing dynamics of spontaneous bursts in cultured neural networks,” *IEEE Transactions on Biomedical Engineering*, vol. 51, no. 11, pp. 2051–2062, 2004.
- [16] D. Eytan and S. Marom, “Dynamics and effective topology underlying synchronization in networks of cortical neurons,” *Journal of Neuroscience*, vol. 26, no. 33, pp. 8465–8476, 2006.
- [17] R. Madhavan, Z. C. Chao, and S. M. Potter, “Plasticity of recurring spatiotemporal activity patterns in cortical networks,” *Physical Biology*, vol. 4, no. 3, p. 181, 2007.
- [18] J. M. Beggs and D. Plenz, “Neuronal avalanches in neocortical circuits,” *Journal of Neuroscience*, vol. 23, no. 35, pp. 11 167–11 177, 2003.
- [19] D. Ito, H. Tamate, M. Nagayama, T. Uchida, S. Kudoh, and K. Gohara, “Minimum neuron density for synchronized bursts in a rat cortical culture on multi-electrode arrays,” *Neuroscience*, vol. 171, no. 1, pp. 50–61, 2010.
- [20] Y. Jimbo, T. Tateno, and H. Robinson, “Simultaneous induction of pathway-specific potentiation and depression in networks of cortical neurons,” *Biophysical Journal*, vol. 76, no. 2, pp. 670–678, 1999.
- [21] H. A. Johnson, A. Goel, and D. V. Buonomano, “Neural dynamics of in vitro cortical networks reflects experienced temporal patterns,” *Nature Neuroscience*, vol. 13, no. 8, pp. 917–919, 2010.
- [22] G. Shahaf and S. Marom, “Learning in networks of cortical neurons,” *Journal of Neuroscience*, vol. 21, no. 22, pp. 8782–8788, 2001.
- [23] 箕嶋渉, 伊東嗣功, and 工藤卓, “培養神経回路網の形成過程における自発性神経活動と培養時のブドウ糖濃度の関係性,” 電気学会論文誌 C (電子・情報・システム部門誌), vol. 136, no. 9, pp. 1335–1342, 2016.
- [24] M. Murata, H. Ito, T. Taenaka, and S. N. Kudoh, “Modification of activity pattern induced by synaptic enhancements in a semi-artificial network of living neurons,” in *Micro-NanoMechatronics and human science (MHS), 2011 international symposium on.* IEEE, 2011, pp. 250–254.
- [25] 清原藍, 田口隆久, and 工藤卓, “分散培養系における自発性活動電位と誘導活動電位との関係性,” 電気学会論文誌 C (電子・情報・システム部門誌), vol. 129, no. 10, pp.

1815–1821, 2009.

- [26] J. M. Beggs and D. Plenz, “Neuronal avalanches are diverse and precise activity patterns that are stable for many hours in cortical slice cultures,” *Journal of Neuroscience*, vol. 24, no. 22, pp. 5216–5229, 2004.
- [27] J. D. Rolston, D. A. Wagenaar, and S. M. Potter, “Precisely timed spatiotemporal patterns of neural activity in dissociated cortical cultures,” *Neuroscience*, vol. 148, no. 1, pp. 294–303, 2007.
- [28] M. S. Schroeter, P. Charlesworth, M. G. Kitzbichler, O. Paulsen, and E. T. Bullmore, “Emergence of rich-club topology and coordinated dynamics in development of hippocampal functional networks in vitro,” *Journal of Neuroscience*, vol. 35, no. 14, pp. 5459–5470, 2015.
- [29] M. E. J. Obien, K. Deligkaris, T. Bullmann, D. J. Bakkum, and U. Frey, “Revealing neuronal function through microelectrode array recordings,” *Frontiers in Neuroscience*, vol. 8, p. 423, 2015.
- [30] J. Müller, M. Ballini, P. Livi, Y. Chen, M. Radivojevic, A. Shadmani, V. Viswam, I. L. Jones, M. Fiscella, R. Diggelmann *et al.*, “High-resolution cmos mea platform to study neurons at subcellular, cellular, and network levels,” *Lab on a chip*, vol. 15, no. 13, pp. 2767–2780, 2015.
- [31] Y. Yada, R. Kanzaki, and H. Takahashi, “State-dependent propagation of neuronal subpopulation in spontaneous synchronized bursts,” *Frontiers in Systems Neuroscience*, vol. 10, 2016.
- [32] T. Isomura, K. Shimba, Y. Takayama, A. Takeuchi, K. Kotani, and Y. Jimbo, “Signal transfer within a cultured asymmetric cortical neuron circuit,” *Journal of Neural Engineering*, vol. 12, no. 6, p. 066023, 2015.
- [33] A. Napoli and I. Obeid, “Comparative analysis of human and rodent brain primary neuronal culture spontaneous activity using micro-electrode array technology,” *Journal of Cellular Biochemistry*, vol. 117, no. 3, pp. 559–65, 2016.
- [34] A. Odawara, H. Katoh, N. Matsuda, and I. Suzuki, “Physiological maturation and drug responses of human induced pluripotent stem cell-derived cortical neuronal networks in long-term culture,” *Scientific Reports*, vol. 6, 2016.
- [35] D. D. Clarke and L. Sokoloff, *Circulation and energy metabolism of the brain*. Basic Neurochemistry, 1989.
- [36] P. V. Cardon, L. Sokoloff, T. S. Vates, and S. S. Kety, “The physiological and psychological effects of intravenously administered epinephrine and its metabolism in normal and schizophrenic men?i.: Effects on heart rate, blood pressure, blood glucose concentration and the electroencephalogram,” *Journal of Psychiatric Research*, vol. 1, no. 1, pp. 37–49, 1961.

- [37] H. Yuan, K. Yamada, and N. Inagaki, “Multiminute oscillations in mouse substantia nigra pars reticulata neurons in vitro,” *Neuroscience Letters*, vol. 355, no. 1, pp. 136–140, 2004.
- [38] A. Munoz, M. Hu, K. Hussain, J. Bryan, L. Aguilar-Bryan, and A. S. Rajan, “Regulation of glucagon secretion at low glucose concentrations: evidence for adenosine triphosphate-sensitive potassium channel involvement,” *Endocrinology*, vol. 146, no. 12, pp. 5514–5521, 2005.
- [39] C. Matias, P. Saggau, and M. Quinta-Ferreira, “Blockade of presynaptic k atp channels reduces the zinc-mediated posttetanic depression at hippocampal mossy fiber synapses,” *Brain Research*, vol. 1320, pp. 22–27, 2010.
- [40] B.-S. Chen and S.-N. Wu, “Functional role of the activity of atp-sensitive potassium channels in electrical behavior of hippocampal neurons: experimental and theoretical studies,” *Journal of Theoretical Biology*, vol. 272, no. 1, pp. 16–25, 2011.
- [41] W. Minoshima, Y. Fukui, H. Ito, and S. Kudoh, “Relationship between evoked electrical responses and robotic behavior analyzed by self-organization map,” in *Robot and Human Interactive Communication (RO-MAN), 2015 24th IEEE International Symposium on*. IEEE, 2015, pp. 117–120.
- [42] M. Weliky and L. C. Katz, “Correlational structure of spontaneous neuronal activity in the developing lateral geniculate nucleus in vivo,” *Science*, vol. 285, no. 5427, pp. 599–604, 1999.
- [43] J. S. Anderson, I. Lampl, D. C. Gillespie, and D. Ferster, “The contribution of noise to contrast invariance of orientation tuning in cat visual cortex,” *Science*, vol. 290, no. 5498, pp. 1968–1972, 2000.
- [44] S. Fujisawa, N. Matsuki, and Y. Ikegaya, “Single neurons can induce phase transitions of cortical recurrent networks with multiple internal states,” *Cerebral Cortex*, vol. 16, no. 5, pp. 639–654, 2006.
- [45] H. Oka, K. Shimono, R. Ogawa, H. Sugihara, and M. Taketani, “A new planar multielectrode array for extracellular recording: application to hippocampal acute slice,” *Journal of Neuroscience Methods*, vol. 93, no. 1, pp. 61–67, 1999.
- [46] E. Habermann, “Palytoxin acts through na⁺, k⁺-atpase,” *Toxicon*, vol. 27, no. 11, pp. 1171–1187, 1989.
- [47] M. T. Tosteson, “Mechanism of action, pharmacology, and toxicology,” in *Seafood and Freshwater Toxins: Pharmacology, Physiology, and Detection, Second Edition*. CRC Press, 2000.
- [48] L. Sokoloff, “Circulation and energy metabolism of the brain,” *Basic Neurochemistry*, vol. 2, pp. 338–413, 1989.
- [49] R. M. Anson, Z. Guo, R. de Cabo, T. Iyun, M. Rios, A. Hagepanos, D. K. Ingram, M. A. Lane, and M. P. Mattson, “Intermittent fasting dissociates beneficial effects of dietary

- restriction on glucose metabolism and neuronal resistance to injury from calorie intake,” *Proceedings of The National Academy of Sciences*, vol. 100, no. 10, pp. 6216–6220, 2003.
- [50] G. Brewer, J. Torricelli, E. Ege, and P. Price, “Optimized survival of hippocampal neurons in b27-supplemented neurobasal?, a new serum-free medium combination,” *Journal of Neuroscience Research*, vol. 35, no. 5, pp. 567–576, 1993.
- [51] C. Hosokawa, S. N. Kudoh, A. Kiyohara, and T. Taguchi, “Resynchronization in neuronal network divided by femtosecond laser processing,” *Neuro Report*, vol. 19, no. 7, pp. 771–775, 2008.
- [52] K. Shimba, K. Sakai, T. Isomura, K. Kotani, and Y. Jimbo, “Axonal conduction slowing induced by spontaneous bursting activity in cortical neurons cultured in a microtunnel device,” *Integrative Biology*, vol. 7, no. 1, pp. 64–72, 2015.
- [53] 伊東嗣功 and 工藤卓, “培養神経回路網における誘発応答パターンの履歴現象,” *電気学会論文誌 C (電子・情報・システム部門誌)*, vol. 133, no. 10, pp. 1905–1911, 2013.
- [54] W. Minoshima, H. Ito, and S. N. Kudoh, “The glucose concentration-dependency of spontaneous activity in a cultured neuronal network,” *Electronics and Communications in Japan*, vol. 97, no. 9, pp. 35–41, 2014.
- [55] 箕嶋渉, 妙中徹平, 伊東嗣功, and 工藤卓, “変動的な神経活動パターン抽出のためのオンラインスパイク検出システム,” *知能と情報 (日本知能情報ファジィ学会誌)*, vol. 28, no. 3, pp. 655–665, 2016.
- [56] “ピーク検出 (VI) - LabVIEW 2012 ヘルプ -,” http://zone.ni.com/reference/ja-XX/help/371361J-0112/lvanls/peak_detector/.
- [57] S. N. Kudoh, A. Kiyohara, C. Hosokawa, T. Taguchi, and I. Hayashi, “Interaction between living neuronal network and outer world by programmable multisite stimulation system,” in *Micro-NanoMechatronics and Human Science, 2007. MHS'07. International Symposium on*. IEEE, 2007, pp. 44–49.
- [58] Q. V. Le, “Building high-level features using large scale unsupervised learning,” in *2013 IEEE international conference on acoustics, speech and signal processing*. IEEE, 2013, pp. 8595–8598.
- [59] A. Potter, T. B. DeMarse, D. J. Bakkum, M. C. Booth, J. R. Brumfield, Z. Chao, R. Madhavan, P. A. Passaro, K. Rambani, A. C. Shkolnik *et al.*, “Hybrot: hybrids of living neurons and robots for studying neural computation,” *Proceedings of Brain Inspired Cognitive Systems*, pp. 1–5, 2004.
- [60] M. B. JacopoTessadori, S. Martinoia, and M. Chiappalone, “Modular neuronal assemblies embodied in a closed-loop environment: toward future integration of brains and machines,” *Closing the Loop Around Neural Systems*, p. 86, 2014.
- [61] D. R. Tomlinson and N. J. Gardiner, “Glucose neurotoxicity,” *Nature Reviews Neuroscience*, vol. 9, no. 1, pp. 36–45, 2008.

- [62] P. J. Magistretti, L. Pellerin, D. L. Rothman, and R. G. Shulman, "Energy on demand," *Science*, vol. 283, no. 5401, pp. 496–7, 1999.
- [63] R. Dringen and B. Hamprecht, "Glutathione restoration as indicator for cellular metabolism of astroglial cells," *Developmental Neuroscience*, vol. 20, no. 4-5, pp. 401–7, 1998.
- [64] A. Suzuki, S. A. Stern, O. Bozdagi, G. W. Huntley, R. H. Walker, P. J. Magistretti, and C. M. Alberini, "Astrocyte-neuron lactate transport is required for long-term memory formation," *Cell*, vol. 144, no. 5, pp. 810–23, 2011.
- [65] L. Pellerin and P. J. Magistretti, "Glutamate uptake stimulates Na^+ , K^+ -atpase activity in astrocytes via activation of a distinct subunit highly sensitive to ouabain," *Journal of Neurochemistry*, vol. 69, no. 5, pp. 2132–7, 1997.
- [66] N. R. Sibson, A. Dhankhar, G. F. Mason, D. L. Rothman, K. L. Behar, and R. G. Shulman, "Stoichiometric coupling of brain glucose metabolism and glutamatergic neuronal activity," *Proceedings of the National Academy of Sciences*, vol. 95, no. 1, pp. 316–21, 1998.
- [67] S. Koizumi, K. Fujishita, M. Tsuda, Y. Shigemoto-Mogami, and K. Inoue, "Dynamic inhibition of excitatory synaptic transmission by astrocyte-derived atp in hippocampal cultures," *Proc Natl Acad Sci U S A*, vol. 100, no. 19, pp. 11 023–8, 2003.
- [68] A. K. Chen and M. S. Hedrick, "Role of glutamate and substance p in the amphibian respiratory network during development," *Respiratory Physiology & Neurobiology*, vol. 162, no. 1, pp. 24–31, 2008.
- [69] R. A. Swanson, "Physiologic coupling of glial glycogen metabolism to neuronal activity in brain," *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology*, vol. 70 Suppl, pp. S138–44, 1992.
- [70] D. O. Hebb, "The organization of behavior," 1949.
- [71] C. G. Gross, "Genealogy of the "grandmother cell"," *Neuroscientist*, vol. 8, no. 5, pp. 512–8, 2002.
- [72] C. M. Gray, P. König, A. K. Engel, W. Singer *et al.*, "Oscillatory responses in cat visual cortex exhibit inter-columnar synchronization which reflects global stimulus properties," *Nature*, vol. 338, no. 6213, pp. 334–337, 1989.
- [73] L. Mazzucato, A. Fontanini, and G. La Camera, "Dynamics of multistable states during ongoing and evoked cortical activity," *Journal of Neuroscience*, vol. 35, no. 21, pp. 8214–8231, 2015.
- [74] S. A. Romano, T. Pietri, V. Perez-Schuster, A. Jouary, M. Haudrechy, and G. Sumbre, "Spontaneous neuronal network dynamics reveal circuit's functional adaptations for behavior," *Neuron*, vol. 85, no. 5, pp. 1070–85, 2015.
- [75] H. Kamioka, E. Maeda, Y. Jimbo, H. P. Robinson, and A. Kawana, "Spontaneous periodic synchronized bursting during formation of mature patterns of connections in cortical cultures," *Neuroscience letters*, vol. 206, no. 2-3, pp. 109–12, 1996.

- [76] D. A. Wagenaar, J. Pine, and S. M. Potter, “An extremely rich repertoire of bursting patterns during the development of cortical cultures,” *BMC Neurosci*, vol. 7, p. 11, 2006.
- [77] T. Yamanobe, “Global dynamics of a stochastic neuronal oscillator,” *Physical Review E*, vol. 88, no. 5, p. 052709, 2013.
- [78] Z. C. Chao, D. J. Bakkum, D. A. Wagenaar, and S. M. Potter, “Effects of random external background stimulation on network synaptic stability after tetanization,” *Neuroinformatics*, vol. 3, no. 3, pp. 263–280, 2005.
- [79] A. Maccione, M. Gandolfo, M. Tedesco, T. Nieuw, K. Imfeld, S. Martinoia, and B. Luca, “Experimental investigation on spontaneously active hippocampal cultures recorded by means of high-density meas: analysis of the spatial resolution effects,” *Frontiers in Neuroengineering*, vol. 3, p. 4, 2010.
- [80] C. M. Hales, R. Zeller-Townson, J. P. Newman, J. T. Shoemaker, N. J. Killian, and S. M. Potter, “Stimulus-evoked high frequency oscillations are present in neuronal networks on microelectrode arrays,” *Frontiers in Neural Circuits*, vol. 6, p. 29, 2012.
- [81] O. Levy, N. E. Ziv, and S. Marom, “Enhancement of neural representation capacity by modular architecture in networks of cortical neurons,” *European Journal of Neuroscience*, vol. 35, no. 11, pp. 1753–1760, 2012.
- [82] M. B. JacopoTessadori, S. Martinoia, and M. Chiappalone, “Modular neuronal assemblies embodied in a closed-loop environment: toward future integration of brains and machines,” *Closing the Loop Around Neural Systems*, p. 86, 2014.
- [83] D. Eytan, N. Brenner, and S. Marom, “Selective adaptation in networks of cortical neurons,” *Journal of Neuroscience*, vol. 23, no. 28, pp. 9349–9356, 2003.
- [84] D. M. Kullmann, “Silent synapses: what are they telling us about long-term potentiation?” *Philosophical Transactions of the Royal Society of London B: Biological Sciences*, vol. 358, no. 1432, pp. 727–733, 2003.
- [85] M. Fauth, F. Wörgötter, and C. Tetzlaff, “The formation of multi-synaptic connections by the interaction of synaptic and structural plasticity and their functional consequences,” *PLoS Computational Biology*, vol. 11, no. 1, p. e1004031, 2015.
- [86] Y. Matsui, H. Ito, W. Minoshima, and S. N. Kudoh, “Stability of neuronal electrical activity pattern evoked by two inputs stimulation,” in *Soft Computing and Intelligent Systems (SCIS), 2014 Joint 7th International Conference on and Advanced Intelligent Systems (ISIS), 15th International Symposium on*. IEEE, 2014, pp. 788–792.
- [87] S. Panzeri, R. Senatore, M. A. Montemurro, and R. S. Petersen, “Correcting for the sampling bias problem in spike train information measures,” *Journal of Neurophysiology*, vol. 98, no. 3, pp. 1064–1072, 2007.
- [88] W. Schultz, “Predictive reward signal of dopamine neurons,” *Journal of Neurophysiology*, vol. 80, no. 1, pp. 1–27, 1998.

- [89] S. Harnad, “The symbol grounding problem,” *Physica D: Nonlinear Phenomena*, vol. 42, no. 1-3, pp. 335–346, 1990.
- [90] G.-q. Bi and M.-m. Poo, “Synaptic modifications in cultured hippocampal neurons: dependence on spike timing, synaptic strength, and postsynaptic cell type,” *Journal of Neuroscience*, vol. 18, no. 24, pp. 10 464–10 472, 1998.
- [91] D. A. Butts, P. O. Kanold, and C. J. Shatz, “A burst-based “hebbian” learning rule at retinogeniculate synapses links retinal waves to activity-dependent refinement,” *PLoS Biology*, vol. 5, no. 3, p. e61, 2007.
- [92] H. Markram, J. Lübke, M. Frotscher, and B. Sakmann, “Regulation of synaptic efficacy by coincidence of postsynaptic eps and epsps,” *Science*, vol. 275, no. 5297, pp. 213–215, 1997.
- [93] R. A. Brooks, “A robot that walks; emergent behaviors from a carefully evolved network,” *Neural Computation*, vol. 1, no. 2, pp. 253–262, 1989.
- [94] B. F. Skinner, “A case history in scientific method.” *American Psychologist*, vol. 11, no. 5, p. 221, 1956.
- [95] J. Olds and P. Milner, “Positive reinforcement produced by electrical stimulation of septal area and other regions of rat brain.” *Journal of Comparative and Physiological Psychology*, vol. 47, no. 6, p. 419, 1954.
- [96] W. F. Borschel, J. M. Myers, E. M. Kasperek, T. P. Smith, N. M. Graziane, L. M. Nowak, and G. K. Popescu, “Gating reaction mechanism of neuronal nmda receptors,” *Journal of Neurophysiology*, vol. 108, no. 11, pp. 3105–3115, 2012.
- [97] 伊東嗣功 and 工藤卓, “培養神経回路網における誘発応答パターンの履歴現象,” *電気学会論文誌 C (電子・情報・システム部門誌)*, vol. 133, no. 10, pp. 1905–1911, 2013.
- [98] T. Kohonen, “Self-organized formation of topologically correct feature maps,” *Biological Cybernetics*, vol. 43, no. 1, pp. 59–69, 1982.
- [99] F. A. Massucci, M. DiNuzzo, F. Giove, B. Maraviglia, I. P. Castillo, E. Marinari, and A. De Martino, “Energy metabolism and glutamate-glutamine cycle in the brain: a stoichiometric modeling perspective,” *BMC System Biology*, vol. 7, p. 103, 2013.
- [100] E. Somersalo, Y. Cheng, and D. Calvetti, “The metabolism of neurons and astrocytes through mathematical models,” *Ann Biomed Eng*, vol. 40, no. 11, pp. 2328–44, 2012.
- [101] R. G. Shulman, D. L. Rothman, K. L. Behar, and F. Hyder, “Energetic basis of brain activity: implications for neuroimaging,” *Trends Neurosci*, vol. 27, no. 8, pp. 489–95, 2004.
- [102] J. R. Clay, “Excitability of the squid giant axon revisited,” *Journal of Neurophysiol*, vol. 80, no. 2, pp. 903–13, 1998.
- [103] S. M. Potter and T. B. DeMarse, “A new approach to neural cell culture for long-term studies,” *Journal of Neuroscience Methods*, vol. 110, no. 1-2, pp. 17–24, 2001.

- [104] A. Gal, D. Eytan, A. Wallach, M. Sandler, J. Schiller, and S. Marom, “Dynamics of excitability over extended timescales in cultured cortical neurons,” *Journal of Neuroscience*, vol. 30, no. 48, pp. 16 332–42, 2010.
- [105] J. le Feber, W. Postma, E. de Weerd, M. Weusthof, and W. L. Rutten, “Barbed channels enhance unidirectional connectivity between neuronal networks cultured on multi electrode arrays,” *Frontiers in Neuroscience*, vol. 9, 2015.
- [106] A. Pimashkin, A. Gladkov, I. Mukhina, and V. Kazantsev, “Adaptive enhancement of learning protocol in hippocampal cultured networks grown on multielectrode arrays,” *Frontiers in neural circuits*, vol. 7, p. 87, 2013.

研究業績

投稿論文及び、論文に類するプロシーディング

(査読有り)

1. 箕嶋 涉, 伊東 嗣功, and 工藤 卓, “培養神経回路網における自発性神経活動と細胞外グルコース濃度の関係性,” 電気学会論文誌 C (電子・情報・システム部門誌) 特集:分散エネルギーマネジメント, Vol.133, No.10, pp.1912-1917, 2013.
2. Wataru Minoshima, Hidekatsu Ito, Suguru N. Kudoh, “The Glucose Concentration-Dependency of Spontaneous Activity in a Cultured Neuronal Network,” *Electronics and Communications in Japan*, Vol.97, No.9, pp.35-41, 2014. (業績 1 の英語翻訳版)
3. Wataru Minoshima, Yaushiro Fukui, Hidekatsu Ito, and Suguru N. Kudoh, “Relationship between Evoked Responses and Robotic Behavior Analyzed by Self-Organization Map,” *Proceedings of The 24th IEEE International Symposium on Robot and Human Interaction Communication (RO-MAN2015)*, pp.117-120, 2015.
4. 箕嶋 涉, 妙中 徹平, 伊東 嗣功, and 工藤 卓, “変動的な神経活動に有効なオンラインスパイク検出システム,” 知能と情報 (日本ファジイ学会誌) 特集:ブレイン・コンピューティング・システム, Vol.28, No.3, pp.655-665, 2016.
5. 箕嶋 涉, 伊東 嗣功, and 工藤 卓, “培養神経回路網の形成過程における自発性神経活動と培養時のブドウ糖濃度の関係性,” 電気学会論文誌 C (電子・情報・システム部門誌) 特集:神経工学・サイバネティクス・生体工学, Vol.136, No.9, pp.1335-1342, 2016.

国際会議における発表

(ポスター発表・査読有り)

1. Wataru Minoshima, Hidekatsu Ito, and Suguru N. Kudoh, “Electrical activity is modulated by extracellular glucose concentration in a cultured neuronal network,” Society for Neuroscience annual meeting 2012, 903.18, New Orleans, USA, October 2012.
2. Wataru Minoshima, Hidekatsu Ito, and Suguru, N. Kudoh, “The Glucose concentration-dependent spontaneous activity in a cultured neuronal network,” 35th Annual International Conference of the IEEE Engineering in Medicine and Biology Society, SaD10.13, Osaka,

Japan, July 2013.

3. Wataru Minoshima, Hidekatsu Ito, and Suguru N. Kudoh, "External Glucose Concentration regulated the Spontaneous Electrical Activity in Dissociated Neuronal Network," Society for Neuroscience annual meeting 2013, 519.02, San Diego, USA, November 2013.
4. Wataru Minoshima, Hidekatsu Ito, and Suguru N. Kudoh, "Spontaneous Electrical Activity in Rat Hippocampal Neuronal Network Depends on Extracellular Glucose Concentration," 9th FENS Forum of Neuroscience Society, E025, Milan, Italy, July 2014.
5. Wataru Minoshima, Hidekatsu Ito, and Suguru N. Kudoh, "Discriminating Patterns of Neuronal Activity by Self-Organization Map with Fuzzy Sets," 37th Annual International Conference of the IEEE Engineering in Medicine and Biology Society (EMBC2015), SaBPoT1.36o, Milan, Italy, August 2015.
6. Wataru Minoshima, Hidekatsu Ito, and Suguru N. Kudoh, "Relationship Between Patterns of Autonomous Activity and External Glucose Concentration," 10th International Meeting on Substrate-Integrated Microelectrode Arrays (MEA Meeting 2016), 2.05, Reutlingen, Germany, June 2016.

国内学会・シンポジウム等における発表

(ポスター発表・査読有り)

1. 箕嶋 渉, 伊東 嗣功, and 工藤 卓, "培養神経回路網における神経電気活動のブドウ糖濃度依存性," 第 35 回日本神経科学大会, P4-n04, 名古屋国際会議場, 2012 年 9 月.
2. 箕嶋 渉, 伊東 嗣功, and 工藤 卓, "海馬領域分散神経回路網におけるブドウ糖濃度に依存した神経電気活動," 第 36 回日本神経科学大会, P1-2-144, 京都国際会議場, 2013 年 6 月.
3. 箕嶋 渉, 伊東 嗣功, and 工藤 卓, "海馬分散培養神経回路網における自発性神経活動頻度の細胞外ブドウ糖濃度による変化," 第 37 回日本神経科学大会, P3-005, パシフィコ横浜, 2014 年 9 月.
4. 箕嶋 渉, 伊東 嗣功, and 工藤 卓, "神経回路網活動と培養時グルコース濃度の関連性について," 第 38 回日本神経科学大会, 2P316, 神戸国際展示場, 2015 年 7 月.
(口頭発表・査読有り)
5. 箕嶋 渉, 伊東 嗣功, and 工藤 卓, "培養神経回路網における神経電気活動のブドウ糖濃度依存性," 平成 24 年 電気学会 電子・情報・システム部門, TC3-7, 弘前大学, 2012 年 9 月.
6. 箕嶋 渉, 伊東 嗣功, and 工藤 卓, "培養神経回路網における細胞外ブドウ糖濃度と自発性神経活動パターンの関係性," 平成 25 年 電気学会 電子・情報・システム部門, TC1-2, 北見工業大学, 2013 年 9 月.
7. 箕嶋 渉, 伊東 嗣功, 周田 ありす, and 工藤 卓, "神経回路網の自発的な活動は細胞外ブドウ糖濃度変化により変調する," 平成 26 年 電気学会 電子・情報・シス

テム部門, TC4-5, 島根大学, 2014 年 9 月.

8. 箕嶋 渉, 伊東 嗣功, 福井 康弘, 周田 ありす, and 工藤 卓, “ファジィ論理と自己組織化マップを用いた生体神経回路網における状態推移の分類,” 第 30 回ファジィシステムシンポジウム, MF2-4, 高知城ホール, 2014 年 9 月.
9. 箕嶋 渉, 伊東 嗣功, 周田 ありす, and 工藤 卓, “神経活動と細胞外エネルギー源の関連性,” 計測自動制御学会ライフエンジニアリング部門シンポジウム 2014, 2A1, 金沢大学, 2014 年 9 月.
10. 箕嶋 渉, 伊東 嗣功, 工藤 卓, “培養神経回路網における培養時の細胞外ブドウ糖濃度と自発性神経活動パターンの関係性解析,” 第 39 回日本神経科学大会, O2-J-2-1, パシフィコ横浜, 2016 年 7 月.
11. 箕嶋 渉, 伊東 嗣功, and 工藤 卓, “細胞外グルコースと神経電気活動の関係性,” 計測自動制御学会ライフエンジニアリング部門シンポジウム 2016, 2B1-1, 大阪国際交流センター, 2016 年 11 月.

その他

(受賞歴)

1. 関西学院大学 理工学研究科 平成 27 年度 仁田記念賞 (研究テーマ「海馬分散培養神経回路網における自発性神経活動の細胞外グルコース濃度依存性解析」に対して)

謝辞

本研究を進めるにあたり、指導教員である関西学院大学大学院理工学研究科人間システム工学専攻の工藤卓教授には研究に関して多大な適切な御助言・、御指導を頂き、また、論文執筆やプレゼンテーションにおける御指導を始め、研究者としての心構えや、研究活動における考え方等様々なことをご教示頂きました。ここに厚く御礼申し上げます。

本学位論文作成にあたり、主査として御指導を賜りました本学大学院理工学研究科人間システム工学専攻 嵯峨 宣彦教授、副査として御指導賜りました本学理工学研究科人間システム工学専攻 岡留剛教授、国立研究開発法人産業技術総合研究所バイオメディカル研究部門細胞マイクロシステム研究グループ主任研究員 細川千絵関西学院大学客員准教授に心より厚く御礼を申し上げます。

工藤研究室秘書である岡村真理子様には日々の研生活を送るにあたり、様々なご援助を賜りました。ここに厚く御礼を申し上げます。

神経能工学研究室の先輩である、現秋田県立大学システム科学技術学部電子情報システム学科知能ソフトウェア基盤研究室助教の伊東嗣功氏には多くの知識的及び技術的な御助言を下さり、実験に用いる培養細胞の提供など、様々な形で御協力、御援助を賜りました。ここに深く感謝致します。

神経細胞を扱う実験において実験手法を基礎的な部分から丁寧に御教示下さった上、実験に用いる培養細胞を提供して下さった村田真章氏に深く感謝申し上げます。

本研究における主要な実験システムの基礎を構築して下さいました妙中徹平先輩、泉谷佳祐君、福井康弘君に厚く御礼申し上げます。

本研究に於いて主要な実験系である細胞培養の準備やそれに伴う実験器具の準備、及び試薬の調整等を手伝って下さった周田ありすさん、大機悠斗君、松井嘉徳君、岡田卓己君、平田菜々美さん、田浦優磨君、久内晴加さんに心より感謝を申し上げます。

研究室配属から博士課程後期課程修了までの6年間の研究活動を通し、様々な御協力を頂きました神経能工学研究室の皆様へ感謝致します。

最後になりましたが、博士課程後期課程まで進学させて頂き、いつも暖かく見守って頂きました家族に感謝します。

2017年3月

箕嶋 涉