

本論文は、1細胞単位での神経細胞集団ネットワークを構成的に構築する新しいオンチップ細胞培養計測手法と神経1細胞単位での電位計測を可能とする多電極システムを用い、1細胞からの神経細胞ネットワークの再構成によって、孤立神経細胞の特性の評価、2細胞系での伝達特性の評価、テタヌス刺激による細胞ネットワークの応答の履歴現象の観察、薬剤に対する応答の違いから、「組織モデル」となるオンチップ細胞ネットワークの構築を目指した一連の研究を報告したものである。

第1章では、本研究の背景と目的、本論文の構成を述べている。まず、本研究の背景として、脳の機能の理解のためには、要素（細胞）と全体（神経回路）との関係を、従来の分析的アプローチに加えて、構成的アプローチによって要素の必要性、ネットワークの最小構成の意義を理解することの必要性について述べている。

第2章では、神経細胞ネットワークを構成的に構築するために開発したアガロース微細加工技術を用いた1細胞単位での神経ネットワーク回路構成技術を述べている。ここでは、アガロース加工技術を利用した一連の1細胞単位での細胞数、結合関係、異種細胞の組み合わせ技術についての方法論の紹介と、これらの手法を用いた研究成果をまとめているが、特に、軸索と樹状突起の成長特性の違いを利用して、初めて神経突起の結合方向制御を可能としたことが報告されている。また、パッチクランプ法を用いて、2細胞の結合の方向性が制御されていることが確認されている。

第3章では、第2章で開発した細胞配置制御技術を64チャンネル多電極計測システムと組み合わせて、神経細胞1細胞単位での長期培養計測技術の開発について述べている。実際に、多電極チップの各電極上に細胞が配置されるようにアガロース層が加工されたチップを利用して、ここで神経細胞の1次元配置細胞ネットワークの電氣的計測が確認されている。ここで直線的に構築した神経細胞8細胞ネットワークについて、テタヌス刺激を与えたところ、30分後に神経細胞間の結合の活性化と再現性の確認ができ、24時間後にこの情報の消失を確認することができたことが報告されている。

第4章では、第3章で問題となった、電極が不透明電極であることを改善して、透明電極を用いて計測する技術の開発について述べている。ここでは、実際に走査型電子顕微鏡を用いて1細胞サイズの電極の表面の状態を確認し、電極のパターン、表面修飾などを改善する方法などについて実験をして、その結果を議論している。また、神経細胞1細胞から伸長した神経突起中を伝搬する電気信号を多点で実時間計測する技術の開発についても成功したことが報告されている。

第5章では、第4章までで開発した1細胞レベルでの神経細胞の電氣的特性を計測できるシステムを用いて、孤立神経細胞1細胞の発火特性の計測技術について述べている。孤

立神経細胞 1 細胞で長期計測したところ、発火パターンベースで 3 つの種類が存在を確認することができ、また、2 細胞ネットワークを構築した時の、2 細胞の発火特性の変化についても計測し、集団化によって 2 つの細胞の特性が平均化されるのではなく、各細胞が持っている機能のうち、より影響力が強い特性が支配をすること、さらに、2 細胞となることで、その特性がより安定して顕著に見えることが確認されたことが報告されている。さらに薬剤を加えたことによる、神経応答の変化を、孤立 1 細胞レベル、2 細胞ネットワークレベルで比較計測することにも成功しており、これは従来の複雑な機能解析をより要素レベルで理解することを可能とすることが報告されている。

第 6 章では、本研究の成果を総括し、本研究のまとめと結論、今後の展望を述べている。本研究の主題である、神経細胞 1 細胞からの構成的神経ネットワークの構築について、達成事項のまとめと、これらの現状での課題、そしてその解決法についての議論が述べられている。

これら本論文で述べられている研究成果は、従来困難であり、いまだに国内のみならず世界的に見ても実現されていない「神経細胞の神経突起レベルでの方向性制御、1 細胞レベルでの空間配置技術を用いた神経ネットワークの構成的構築と、その機能の長期培養計測」という課題を、全くのゼロから 5 年間で実現したものであり、特に、神経細胞を単独で 1 細胞だけ孤立化し電極上で長期培養計測した、電氣的発火特性ベースでの細胞の違いの発見や、わずか 8 細胞のネットワークで最小記憶モデルの構築に成功したことなど、すべてが世界的に前例が無く、特記に値するものと考えられる。また、このような基礎研究の成果を薬物効果の検証に用いる応用研究も独創的であり、将来の動物実験に代わるモデル臓器、組織の構築の可能性を示唆するものであり、大きな意義があるものと理解される。

いずれの研究内容も従来の細胞培養技術では実現できないソフトマテリアルを用いた段階的リアルタイム微細加工技術と、その応用に関して世界で初めて成功したものであり、オリジナルである。また、この空間配置の制御技術を用いて行った細胞の空間パターンと細胞集団との関係に関する研究は、新たな生物学の研究手法を提案するものであり、このこと自体が、その研究水準の高さを示すものと考えられる。

したがって本審査委員会は博士(学術)の学位を授与するにふさわしいものと認定する。