

# 論文審査の結果の要旨

氏名 廣田 晋也

本論文は 5 章からなり、第 1 章では研究背景並びに関連分野の動向に関する考察に基づき、目的と具体的な課題が提示されている。視覚情報処理系構成要素の 1 つである網膜-上丘系に注目して、発達期における神経回路形成過程とそのメカニズムを細胞レベルで調べる手法を確立することが目的であること、マイクロ加工技術を積極的に利用する立場が本研究の特徴であることを述べている。具体的な検討課題として、(1) 細胞レベルの現象を可視化し経時的に観測する手法の開発、(2) 発生・発達過程における自発神経活動観測と神経回路形成におけるその役割に関する知見を得ることを設定している。

第 2 章では、電極アレイ基板 (Microelectrode Array; MEA) 上での網膜組織の培養条件に関する検討、並びに発達段階で経時的に変化する自発活動の追跡結果について記述している。網膜組織は新生 Wistar rat から採取したものをを用いた。培養液組成と培養液量について様々な条件を適用し、組織試料の形状、神経突起成長、細胞死等を指標に評価し、1 ヶ月間安定して試料を維持する条件を確立した。自発電気活動は、様々な発達段階において *in vivo* 試料で報告されているパターンと同様であるとの結果が得られ、本研究で用いている *in vitro* 系を視覚発達・情報処理のモデル系として用いる妥当性が示された。

第 3 章では、上丘組織について網膜と同様の検討を行った結果を記述している。上丘は新生 Wistar rat から切片試料として採取し、これを MEA 基板上で培養した。網膜と同様の指標で培養条件に依存した試料の状態を評価し、1 ヶ月間の安定培養条件を確立した。上丘については、培養初期に散発的なスパイク発火が出現し、培養日数の経過に従って発生スパイク数が増加、その後スライス全域に伝搬する同期バーストへと活動パターンが移行する現象が認められた。同期バーストの発生に伴って特徴的な電場電位が観測され、これに電流源密度解析を適用した結果、上丘組織の層構造に依存した自発活動の発生・伝搬パターンが見られることが明らかになった。薬理実験により、自発電気活動に関わる神経伝達物質についても知見が得られた。

第4章では、前記2章の結果を受けて網膜・上丘組織の共培養条件の検討ならびに共培養系における自発電気活動の経時観測を行った結果を記述している。共培養系に対しては、前述の網膜及び上丘単独培養における最適条件を考慮し、上丘切片試料に合わせて培養条件を設定した。結果として両組織の自発電気活動を1ヶ月間追跡することができた。また、網膜－上丘間において神経連絡の形成が形態的に観察され、電気刺激に対する応答の記録により組織間での信号伝達も確認した。以上の結果から、網膜－上丘視覚情報処理系の形成過程を追跡する *in vitro* モデルの構築手法が確立された。

確立した *in vitro* モデルを利用して、上丘試料を単独で培養した際に観測される自発電気活動と、網膜－上丘共培養系で見られる活動とを比較した。その結果、共培養系の方が培養日数の経過に従って散発的なスパイク発火からスライス全域にわたる同期バーストへとパターンの遷移が起こる確率が高いことが明らかになった。上丘の発達に対して網膜が何らかの作用を及ぼすことが示唆され、その要因として“信号入力”と“液性因子”の2つの可能性を想定し、さらに実験を行った。Polydimethylsiloxane (PDMS) の微細加工を利用して、網膜－上丘両組織間の神経連絡の形成を防ぎ、かつ培養液を介しての液性因子のみ交換可能な培養チャンバーを作製し、その中での共培養を試みた。その結果、上丘単独培養試料と類似の活動パターンが観測されたことから、液性因子の化学的作用ではなく、両組織間のシナプス結合を介する相互作用：(1) 網膜神経節細胞の自発電気活動、(2) 網膜－上丘組織間シナプス結合を介する信号入力、(3) 上丘の自発活動開始の変調、が上丘の適切な神経回路形成に一定の役割を果たしている可能性が高いとの結論を得た。

以上、設定した2つの課題に対して得られた研究結果に基づき、第5章で結論と今後の展望について総括している。なお、本論文第2章、第3章、第4章は、神保泰彦、森口裕之、高山祐三、井上康輔との共同研究であるが、論文提出者が主体となって実験及び解析を行ったものであり、論文提出者の寄与が十分であると判断する。

従って、博士(科学)の学位を授与できると認める。