関西学院大学リポジトリ
Kwansei Gakuin University Repository

A study of live neural cell in cultured neural network by using Raman spectroscopy

著者	橋本 剛佑
URL	http://hdl.handle.net/10236/00029102

氏　　　　名	**橋　本　剛　佑**
学位の専攻分野の名称	博　士（理　学）
学 位 記 番 号	甲理第191号（文部科学省への報告番号甲第701号）
学位授与の要件	学位規則第４条第１項該当
学位授与年月日	2019年６月19日
学 位 論 文 題 目	**A study of live neural cell in cultured neural network by using Raman spectroscopy** **（ラマン分光法による培養神経回路網内の神経細胞の研究）**
論 文 審 査 委 員	（主査）教 授　今　岡　　進
	（副査）教 授　平　井　洋　平
	教 授　工　藤　　卓
	教 授　佐　藤　英　俊

論 文 内 容 の 要 旨

神経細胞の成長と機能の関係を生きたまま無侵襲的に研究することが，著者の最終目標である。従来の遺伝子解析や各種染色法は，細胞の破壊や固定を伴うため，生きたままの測定は非常に困難である。蛍光タンパク質を用いた研究は生きたままの計測はできるが，遺伝子改変が動物の障害・致死性になることが多く，ターゲットとした特定のタンパク質しか分析できない問題がある。著者は無侵襲的な生体測定が可能なラマン分光法を神経細胞の観測に用いた。同様の研究は世界的にも少なく独創性の高い研究となっている。神経細胞は一般の体細胞とは異なり，いったん分化が終了すると増殖を止めて成長する。体細胞が細胞サイクルの過程で元に戻るような分子組成変化を持つのに対し，神経細胞は戻ること無く一方的にかつ長期に渡って成長を続けるため，神経細胞を従来の細胞分析と同様に取り扱うことはできない。著者は培養神経細胞を用い，実験法を開発しながら研究を進めた。

本研究は，電気生理学的な結果と比較しうる培養条件下で，ラマン分光分析法を用いて神経細胞からどのような情報が得られるかを明らかにすること，また，化学薬品が神経細胞の成長に及ぼす影響を検出することが目的である。神経細胞は培養条件下では，約10日で各細胞のランダム発火，約60日で培養皿中にある細胞の同期発火を起こすことが，電気生理学的な研究で知られている。生きた神経細胞に対し細胞の分子組成と機能の両者を比較して関連づける結果を与えた。神経細胞の成長と化学物質の影響に関しては動物を用いた行動学的研究や子供の精神的な疾患などを通して研究が進められている。しかし，化学物質の神経細胞に対する毒性スクリーニング技術として，ヒトはもちろん動物実験を用いることも，コストの面で問題があった。本研究は，化学物質の毒性スクリーニングを低コストで安全に行う方法として，培養神経細胞の分子組成変化のモニタリング技術を提案している。

本論文は序章と結論を含めて５つの章からなり，２－４章に研究成果が述べられている。２章では，神経細胞の成長に伴うラマンスペクトルの変化を培養下 120日まで観測し，正常な成長に伴う分子組成変化を培養日数の関係を示す，主成分分析モデルを開発した。分子組成変化は連続的で無く，約８日目，30日目，120日目に大きな変化を示し，細胞が段階的に成長していることを示した。また，８，30日目の変化は細胞のランダム発火現象と同期現象が観測される日に近く，分子組成と機能の相関が示唆された。神経細胞の培

養にはフィーダー細胞が必要なため神経細胞の密度が高いと神経細胞を見つけることが困難になるが，密度が低過ぎると細胞の発火現象が観測されなくなる。電気生理学的な機能を保ちながら無標識の顕微鏡観察下で神経細胞を見つけて測定ができる培養条件を確立した。第３章では，興奮性・抑制性神経細胞の判別分析モデルを開発した。実験では，無標識の神経細胞をラマン測定し，その位置を記録した後，固定染色を行って興奮性・抑制性を判別する方法を用いた。３回の独立した実験で得られた109細胞のデータを用いた結果，動物個体の個性に影響されにくい判別モデルの構築に成功した。４回目の実験で得られた独立したデータセットを用いて検証した結果，判別モデルの信頼性が確認できた。第４章では，外因性内分泌攪乱物質の一種であるビスフェノール A（BPA）が培養神経細胞に与える影響を解析した。解析の結果，BPA は神経細胞の成長を加速または減速するのでは無く正常な成長とは全く異なる細胞の分子組成変化を引き起こしていることが示唆された。

論 文 審 査 結 果 の 要 旨

著者はラマン分光分析技術を用い，これまであまり例の無かった神経細胞の分析を行った。前例が少ないために，神経の電気生理学分野の専門家と共同研究することで，神経の機能を反映している実験条件の設定やスペクトル解析技術を独自の論理的アイディアに基づき開発を進めている。120日間におよぶ培養と無標識ラマン測定を行った後，固定染色を行って判別を行う実験法を開発、実行し、高い技術に基づいた方法論開発に成功しており，独創性の高い研究となっている。本論文の内容はすでに，筆頭著者として国際学術誌である Analyst に２報，国内学術誌３報（和文）に発表している。また，国際学会で本論文の内容を，主著者として口頭１件（Pacifichem2015，2015年12月，ホノルル），ポスター６件を発表している。その他，関連する研究で，国際学術誌に共著２報を発表している。審査委員は本論文の内容を中心に面接審査と公開の論文発表会を行い，著者が論文内容と用いた技法について充分に理解するとともに，関連する分野についても学識を有し，また将来の研究遂行に対しても十分な能力を持つことを確認した。英語能力に関しては，著者自ら英語で論文執筆を行い，国際会議で発表しており，充分であると認識した。以上より，審査委員会は本論文の著者が博士（理学）甲号の学位を授与されるに足る充分な資格を有するものと判定した。