



IN vivo visualization of hippocampal cells and dynamics of Ca²⁺ concentration during anoxia : feasibility of a fiber-optic plate microscope system for in vivo experiments

メタデータ	言語: Japanese 出版者: 浜松医科大学 公開日: 2014-11-05 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: 平野, 雅彦 メールアドレス: 所属:
URL	http://hdl.handle.net/10271/1527

学位論文の内容の要旨及び論文審査の結果の要旨

学位記番号	医博論第 250号	学位授与年月日	平成 9年 3月24日
氏名	平野雅彦		
論文題目	<p>IN vivo visualization of hippocampal cells and dynamics of Ca²⁺ concentration during anoxia: feasibility of a fiber-optic plate microscope system for in vivo experiments (無酸素負荷時に生じる海馬組織の細胞内 Ca²⁺濃度分布の in vivo 測定:ファイバースプレート顕微鏡の in vivo 実験への応用性の検討)</p>		

博士(医学) 平野雅彦

論文題目

In vivo visualization of hippocampal cells and dynamics of Ca^{2+} concentration during anoxia : feasibility of a fiber-optic plate microscope system for in vivo experiments

(無酸素負荷時に生じる海馬組織の細胞内 Ca^{2+} 濃度分布の in vivo 測定：ファイバプレート顕微鏡の in vivo 実験への応用性の検討)

論文の内容の要旨

[はじめに]

低酸素負荷を与えた海馬では細胞内 Ca^{2+} 濃度が異常に増加することが知られている。しかしこれまでの研究は海馬が脳の深部に存在することから、摘出された海馬の切片試料で行われていた。もし動物が個体として生きている状態でこの計測が行えれば、その際の細胞の反応をより正確に知ることができる。そこで体表面からは観察できない臓器内部の組織の直接観察を行うファイバプレート顕微鏡を製作し、ラット海馬の細胞内 Ca^{2+} 濃度の測定を試みた。

[方法]

1. 顕微鏡画像解析装置

ファイバプレートは長さ50mm、径0.45-0.90mmの針型に加工したものを使用した。このファイバプレートは径3 μm の光ファイバーが多数束ねられた形となっている。このファイバプレート的一端を臓器に挿入した場合、各光ファイバーがその端面の光を転送させるため、臓器内部の様子を二次元的な像として外部に取り出すことができる。今回の実験ではこれを蛍光観察に使用した。ファイバプレートによって取得された像を対物レンズで拡大した後、ビデオカメラで記録し、画像処理装置により、画質の改善、画像間演算、光量の定量的解析を行った。

2. ラット海馬細胞の観察 (in vitro 試料)

まず本装置の感度や解像度を確認するため、ラット海馬切片組織の蛍光飼料を観察した。スライスをDNAに選択的に結合する4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI)で染色し、ファイバプレートの端面を試料に接触させて観察した。

3. ラット海馬の Ca^{2+} 濃度測定 (in vivo 実験)

ラット海馬組織での無酸素負荷時の Ca^{2+} 濃度変化の測定を行った。麻酔したラットの海馬に Ca^{2+} 濃度測定用の蛍光色素である fluo-3/AM を注入し、その後その付近にファイバプレートを挿入した。ラットには酸素または窒素を気管を通して吸入させ、その過程での蛍光強度の分布の変化を測定した。

[結果]

1. ラット海馬細胞の観察 (in vitro 試料)

DAPIで染色した海馬切片では細胞の核が蛍光の輝点として多数観察され、通常の蛍光顕微鏡観察の場合と同様の画像が得られた。

2. ラット海馬の Ca^{2+} 濃度測定 (in vivo 実験)

ファイバプレートを染色部位に挿入すると一様に明るい蛍光像が得られた。窒素吸入を開始後、

蛍光強度の増加が視野内の各部で起こり、これは窒素吸入の間続いた。数分後に酸素吸入に切り換えると直ちに蛍光の急速な減少が観察された。fluo-3/AM の注入を行わなかったラットでの実験では、窒素の吸入により蛍光強度の減少がみられた。

[考 察]

海馬切片で個々の細胞核が観察された結果から、本装置が単一細胞を識別できる解像度を持つこと、また一般的な蛍光色素で染色された細胞像を検出できる感度を有しているといえる。

ラット個体を使用した実験で窒素吸入時にみられた fluo-3 の蛍光強度の増加は、fluo-3 を与えなかった場合ではむしろ蛍光強度が減少したことから、海馬細胞内の Ca^{2+} 濃度の増加を反映するものであるといえる。この Ca^{2+} の増加は無酸素負荷によって引き起こされたエネルギーの枯渇に依存したものと考えられた。 Ca^{2+} 濃度の増加の程度は視野内で異なり、このことは海馬内の各領域での反応の差を示している。

[結 論]

生きている動物で海馬組織の Ca^{2+} 濃度を二次元的に測定するために、深部組織を観察できるファイバースプレート顕微鏡を開発した。本装置は単一細胞を識別できる解像度と蛍光像を検出できる感度を有していた。本装置を用いて麻酔したラットの海馬の細胞内 Ca^{2+} 濃度分布の変化を蛍光法を利用して測定し、無酸素負荷時に Ca^{2+} 濃度が増加することが示された。

論 文 審 査 の 結 果 の 要 旨

これまで、消化管や気道の様に中空の構造を持つ臓器の内表面は、内視鏡による観察が可能であったが、生体内の実質組織の深部は、直接的に観察することができなかった。そこで申請者は、極細の光ファイバースプレートの一端を組織内に刺入し、他端に伝送されて来た光の強度分布を通常の光学顕微鏡の対物レンズによってビデオカメラに結像し、それを画像処理装置を通して観察することにより、組織深部の光学的イメージを得ることを考察した。そして、直径 $3\ \mu\text{m}$ のファイバーが多数配列した、直径 $5\ \text{mm}$ 、長さ $5\ \text{cm}$ のファイバースプレートを作った。その先端については直角平面型と斜面型とを用意し、観察対象によって使い分けた。

申請者は、まず、ファイバースプレート顕微鏡の性能を、蛍光性ラテックスビーズと脳スライス標本を用いて検定した。ラテックスビーズの直径は $3\sim 10\ \mu\text{m}$ で、画素単位となるファイバーの直径に等しいものもあったが、画像処理を組み合わせることによって、それぞれの大きさに対応するものとして画像化できた。ラット脳より切り出した海馬のスライス標本を核親和性をもつ蛍光色素である DAPI で染色後、その表面にファイバースプレートを密着させて観察したところ、直径 $5\ \mu\text{m}$ の大きさの核が散在する鮮明な像が得られた。

この観察法を麻酔下のラットの脳に応用し、DAPI 染色した海馬組織内の形態学的イメージを高倍率、高分解能で撮ることができた。さらに、Ca イオン濃度依存性の蛍光色素である fluo-3/AM を脳実質内に局所的に投与して神経細胞を染色することにより、海馬神経細胞内の Ca 反応を 2 次元的に記録することに成功した。低酸素状態では海馬神経細胞の細胞内 Ca イオン濃度の急激な上昇が起こることを、脳実質組織を切り出すことなしに証明し、微細な領域においては反応性が異なることを見出した。

審査委員会は、ファイバースプレート顕微鏡法がこれまでにない新しいものであることを認め、性能、

実用性、問題点が明らかになっているものと判定した。さらに、海馬の神経細胞より血中酸素濃度に依存した蛍光色素の信号を得たことを、基礎医学的に意義のあることと認め、この信号が細胞内 Ca イオン濃度を反映するものであろうという、申請者の結論を概ね支持した。これまで、切り出した標本でしかわからなかったことが、ラットの脳内で実際に起こっていることが証明された点は、特に評価した。記憶、学習、神経細胞死との関連で多くの研究者の興味を引いている海馬の光学的研究の進展に対し、申請者の開発した方法が将来的な貢献をするものであろうことを評価した。

上記のような申請者の論文の示説に対し、審査委員会は次のような質問を行った。

- 1) ファイバープレートのプレートとはどのような意味か
- 2) ファイバープレートはどのくらいまで細くできるのか
- 3) ファイバープレートの外側の被覆はどのようなものか
- 4) 得られるイメージの分解能はどのように決まるのか
- 5) ファイバープレート先端の形状によってイメージはどのように変わるか
- 6) 焦点はどのように決まるのか
- 7) 通常の内視鏡との違いは
- 8) 微少レンズとの違いは
- 9) どのようなカメラで最終的なイメージを撮るのか
- 10) 組織の深さ方向のイメージの重なりをどのように評価するか
- 11) 蛍光観察のための励起光の照射むらについて
- 12) ファイバーの波長特性と減衰特性はどのようなものか
- 13) DAPI 染色特性、細胞膜透過性、染色法はどのようなものか
- 14) Fluo-3の蛍光が時間とともに急速に減衰するのはなぜか
- 15) 他の蛍光色素で染色したときの蛍光消退時間は調べたか
- 16) 酸素を持続的に投与したときの蛍光消退の経過はどのようなものか
- 17) 低酸素負荷によって細胞内 Ca イオン濃度が上昇する機構はどのようなものか
- 18) 観察している脳の領域の PO_2 は、低酸素負荷のときにどのくらいの値となっているか
- 19) 蛍光染色していない海馬において、ファイバープレートを通して得られる光学的信号は、神経組織のどのような変化に由来するものか

これらの質問に対し申請者の解答は適切であり、問題点も十分理解しており、博士（医学）の学位論文にふさわしいと審査員全員一致で評価した。

論文審査担当者 主査 教授 寺 川 進

副査 教授 森 田 之 大 副査 助教授 林 秀 晴