



Title	Ultraweak biochemiluminescence detected from rat hippocampal slice
Author(s)	磯島, 康史
Citation	大阪大学, 1995, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/39039
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、大阪大学の博士論文についてをご参照ください。

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

The University of Osaka

氏名	いそ 儀 島 康 史
博士の専攻分野の名称	博士(医学)
学位記番号	第 11769 号
学位授与年月日	平成7年3月23日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当 医学研究科生理系専攻
学位論文名	Ultraweak biochemiluminescence detected from rat hippocampal slice (神経切片培養組織からの極微弱生体発光の検出)
論文審査委員	(主査) 教授 中川 八郎
	(副査) 教授 津本 忠治 教授 福田 淳

論文内容の要旨

【目的】

生体に見出される発光現象として、生物発光（ホタルの luciferin-luciferase 反応等）の他、極微弱生体発光もしくは生物フォトン現象と呼ばれる非常に微弱な発光現象が存在することが知られている。この極微弱生体発光は、臓器・血液・細胞などから広く検出される光励起によらない発光現象で、発光強度は $10^{-17} \text{W}/\text{mm}^2$ 以下である。近年、この極微弱生体発光と生体活動の関連性が活発に調べられ、呼吸活性や細胞分裂周期に相関した発光強度の変化が報告されている。我々は、極微弱生体発光が神経活動の無侵襲測定法として応用できるのではないかと考え、理化学研究所の磯島研究員、東京大学工学部の菊池助教授らと共同で、高感度の単一光子計数装置を用いた脳切片培養系からの極微弱生体発光検出システムを作製し、海馬及び視交叉上核切片培養系における発光の検出及び発光現象と神経活動の相関について解析した。

【方法・結果】

I. 極微弱生体発光検出システムの開発

光検出器としては、光電子増倍管 (PM) ではなく、シリコン雪崩光ダイオード (Si-APD) を用いた。S/N 比を大きくする為に、フロントエンド回路は trans-impedance 型を用い、Si-APD およびヘッドアンプを液体窒素中で冷却することにより、暗電流及び回路からの熱雑音を最小限に抑えた。この光子計数システムは、400nm から 900nm の波長範囲に於いて、5 分間の計測による noise equivalent power (NEP) が 10^{-19}W 台の感度を達成した。

II. 海馬切片培養系からの極微弱発光の検出

生後 4-5 週齢の雄 Wistar 系ラットから海馬を摘出し、 $500 \mu\text{m}$ の切片を作製した。培養は、遮光した計測 chamber 中で、95%O₂ / 5%CO₂ 混合ガスで飽和させた Krebs-Ringer 液で還流しながら行った。切片からの発光は、切片上約 1 mm のところに設置した光ファイバー（入力端径 150 mm）で集光し、Si-APD の受光面に誘導した。光ファイバーは CA 1 領域上に設置した。切片及び計測 chamber が室内灯などにより励起されて起こる光反応の影響を防ぐ為、遮光した状態での preincubation を 1 時間以上行ってから測定を開始した。

1 時間の測定を 5 切片について行い、その結果を集計した。切片を設置した時の count 数平均は、 $8.2 \times 10^{-2} \text{counts}/\text{sec}$ (cps) であった。これに対し、切片を設置しない状態での計測値は $7.3 \times 10^{-2} \text{cps}$ であったので、海馬切片の発光は $9 \times 10^{-3} \text{cps}$ であり、これは $10^{-18} \text{W}/\text{mm}^2$ order と推定された。海馬切片からの発光は 4 時間継続的に測定しても

有意な変化は認めなかった。

III. 脱分極刺激に応じた海馬切片からの極微弱発光強度の変化

II. と同様の方法で海馬切片を培養し, control 条件として 1 時間測定を行った後, 還流培地に KC 1 (最終濃度 40 mM), もしくは tetrodotoxin (TTX, 2 mM) を添加して 1 時間測定を行った。更に, 還流培地を通常の Krebs-Ringer 液に戻した状態で 1 時間測定した。

高カリウム培地で脱分極刺激した場合, 発光強度は control 条件下のそれに対し約 90% の増加を認めた。また, カリウム濃度を元に戻した場合はほぼ control 条件下のレベルに戻った。これに対し, TTX 添加により活動電位発生を抑制した場合, 発光強度は約 40% 減少した。TTX を培地から除去すると control 条件下に近い発光強度まで回復した。

IV. 視交叉上核切片における極微弱生体発光強度の概日リズムの検出

明暗周期が 12 時間 : 12 時間 (明期 : 7 ~ 19 時) の条件下で 2 週間以上飼育した雄 Wistar ラットから視交叉上核切片を海馬の時と同様に作製し, グルコース濃度を 6.5 mg/ml に増加させた Krebs-Ringer 液に 10 mg/ml gentamycin および 10 μM cytosine arabinoside を添加し, 還流培地として用いた。海馬の時と同様 1 時間以上 preincubation を行ってから, 連続 24 時間以上の測定 (最大 72 時間) をおこなった。

視交叉上核切片からの発光強度は, 24 時間周期の概日変動を示し, 主観的明期と主観的暗期の両方に極大をもつ二相性の変動を示した。特に, 主観的明期の始め (7 時 ~ 12 時) に発光強度の著明な減少を認めた。

【総括】

中枢神経系切片培養組織における極微弱生体発光を初めて検出し, この発光強度が脱分極刺激やその抑制に応答することを確認した。このことは, 極微弱生体発光が中枢神経組織におけるエネルギー代謝活動を反映している可能性を示唆している。ただし, 視交叉上核における概日変動のパターンから, エネルギー代謝活動とは別の発光メカニズムも存在していることが示唆された。視交叉上核切片培養系では, 連続 72 時間の測定に成功しており, 極微弱生体発光の検出が細胞活動の長時間連続の無侵襲計測法として利用可能であることが示唆された。

論文審査の結果の要旨

本論文は, 生体試料から広く見い出されてきた極微弱生体発光を励起光, 蛍光試薬等を使用することなく, これまで測定不可能であった中枢神経のスライス培養系について測定可能とし, その発光強度の測定を神経代謝活動測定に応用しうることを初めて報告したものである。また, 本研究のために開発した極微弱生体発光検出装置は, アヴァランシェフォトダイオードを用いたものとしては, これまでに報告のないほど高い光検出感度を達成している。更に, 海馬スライスからの発光を検出することにより, 極微弱生体発光現象が神経代謝活動と相関性を有することを初めて明らかにしたばかりでなく, 概日時計の存在する視交叉上核スライスからの発光強度に特徴ある概日変動が存在することを検出することにも初めて成功している。

本研究の結果は, 極微弱生体発光現象を神経組織について測定することを可能にし, 新しい無侵襲神経代謝活動測定法に適用しうることを初めて明らかにした極めて独創性のあるものであり, 博士の学位に値する研究内容であると考える。