

Title	A novel, Golgi-Cox-based fluorescent staining method for visualizing full-length processes in primary rat neurons
Author(s)	小山, 佳久
Citation	大阪大学, 2016, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/59578
rights	
Note	やむを得ない事由があると学位審査研究科が承認したため、全文に代えてその内容の要約を公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、 ＜a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed">https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed >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

論文内容の要旨

Synopsis of Thesis

氏 名 Name	小山 佳久
論文題名 Title	A novel, Golgi-Cox-based fluorescent staining method for visualizing full-length processes in primary rat neurons (蛍光ゴルジ染色法の確立)

論文内容の要旨

〔目 的 (Purpose)〕

脳内神経回路は非常に複雑であるがゆえ、生体外に取り出して神経細胞単体を観察することができる初代培養法は大変有用である。初代培養神経細胞はその生体内での機能をよく保持しており、分化過程の特徴的な形態変化も明確に捉える事が容易である。形態を解析する上で、染色による可視化は非常に効果的な手段である。

一方で、*in vivo*研究における有用な染色法にゴルジ染色がある。神経細胞の隅から隅まで黒色に染め、明瞭な背景によって、コントラストのよい全体像を得ることができる。樹状突起にある棘突起のような微細構造もシャープに可視化できる。その最大の特徴である選択染色性によって、神経細胞単体の染色像を捉えることが可能である。

〔方法ならびに成績 (Methods/Results)〕

本実験には胎生17.5日目のラット海馬由来の初代培養神経細胞を用いた。様々なゴルジ染色法があるが、明瞭な背景が特徴のGolgi-Cox法を基に染色法開発を試みることにした。Golgi-Cox染色とは、胞体内に取り込まれたクロム酸水銀結晶によって神経細胞を黒色に染める手法である。初代培養細胞において、通常のGolgi-Cox染色を行っても全く染色されなかった。細胞内に取り込まれる結晶の量が少ないことが原因であると考え、以下の改善策を試した。

- ・ 現行の4%パラフォルムアルデヒド (PFA) より強い固定を行い、取り込まれた結晶の拡散を防止する。
- ・ 様々な透過処理 (アルコール処理、界面活性剤処理など) を行い、取り込まれる結晶の量を増加させる。
- ・ 結晶取り込みにおける反応条件を活性化することによって取り込まれる結晶の量を増加させる。

その結果、4%PFAに12.5%グルタルアルデヒドを加えた混合液で固定し、急速凍結処理を施した後、クロム酸水銀結晶取り込み反応を室温終夜で行うと、シグナルがより増強されることが分かった。しかしながら、これらの方法では棘突起などの細部を染めるまでには至らなかったため、次にシグナルそのものの感度を上げることを試みた。*in vivo*ゴルジ染色標本に蛍光抗体を加えた場合、ゴルジ染色陽性細胞のみ蛍光染色された、という知見を我々はすでに得ている。機序は不明だが、蛍光抗体はクロム酸水銀結晶を認識していると思われる。それゆえ、初代培養細胞にクロム酸水銀結晶を取りこませた後に蛍光抗体を加えたところ、シグナル感度は増し、棘突起などの微細構造を含む初代培養神経細胞の鮮明な全体像を得ることに成功した。最後に、突起伸展に影響する各種薬剤を添加した培養一日目の細胞について、蛍光ゴルジ染色を行った。その結果、わずかな形態の変化も正確に捉えることができ、本研究で得られた蛍光ゴルジ染色法は実践的であることも証明された。

〔総 括 (Conclusion)〕

我々の蛍光ゴルジ染色法によって、棘突起や成長根などの微細構造を含む初代培養神経細胞の明瞭な全体像を得ることに成功した。蛍光ゴルジ染色法は簡単かつ有用な染色法であり、以下に列挙した利点によって初代培養細胞における強力な形態学的解析ツールになると考える。

- ・ 従来法 (GFP発現法など) に匹敵する、感度のよい染色性をもつ
- ・ 様々な微細構造 (棘突起、成長円錐など) も鮮明に捉える事ができる
- ・ 短期間 (2日間) かつ簡単な染色手順である
- ・ しっかりとした固定は、どのような状態 (刺激脆弱性、未熟) の細胞も染めることができる

論文審査の結果の要旨及び担当者

(申請者氏名) 小山 佳久													
論文審査担当者	<table border="0"> <tr> <td></td> <td>(職)</td> <td>氏 名</td> </tr> <tr> <td>主 査</td> <td>大阪大学教授</td> <td>原田 彰宏</td> </tr> <tr> <td>副 査</td> <td>大阪大学教授</td> <td>島田 昌一</td> </tr> <tr> <td>副 査</td> <td>大阪大学教授</td> <td>山下 俊英</td> </tr> </table>		(職)	氏 名	主 査	大阪大学教授	原田 彰宏	副 査	大阪大学教授	島田 昌一	副 査	大阪大学教授	山下 俊英
		(職)	氏 名										
	主 査	大阪大学教授	原田 彰宏										
副 査	大阪大学教授	島田 昌一											
副 査	大阪大学教授	山下 俊英											
論文審査の結果の要旨 初代培養神経細胞はその生体内での機能をよく保持しており、分化過程の特徴的な形態変化も明確に捉える事が容易である。形態を解析する上で、染色による可視化は非常に効果的な手段である。ゴルジ染色ではコントラストのよい全体像を得ることができ、棘突起のような微細構造もシャープに可視化できる。選択染色性によって、神経細胞単体の染色像を捉えることが可能である。しかし初代培養細胞の染色に応用した報告はこれまでなかった。 我々の蛍光ゴルジ染色法は、以下に列挙した利点によって初代培養細胞における強力な形態学的解析ツールになると考える。 ・ GFP発現法などに匹敵する、感度のよい染色性をもつ ・ 様々な微細構造も鮮明に捉える事ができる ・ 短期間かつ簡単な染色手順である ・ どのような状態 (刺激脆弱性、未熟) の細胞も染めることができる 以上より、この蛍光ゴルジ染色法の開発は非常に有用であり、学位に値すると考える。													