8I-15 脳内蛍光グルコースの時空間動態の解析

Spatiotemporal analysis of fluorescence glucose in brain.

非 ○朝賀龍太郎(電通大), 非 吉原光一(電通大), 非 坂本良太(電通大), 非 大川晋平(電通大),
正 正本和人(電通大, 放医研), 非 菅野巖(放医研), 正 山田幸生(電通大)

Ryutaro ASAGA¹, Kouichi YOSHIHARA¹, Ryota SAKAMOTO¹
Shinpei OKAWA¹, Kazuto MASAMOTO^{1,2}, Iwao KANNO², Yukio YAMADA¹
The University of Electro-Communications, Chofugaoka 1-5-1, Chofu, Tokyo
National Institute of Radiological Sciences, Anagawa 4-9-1, Inage, Chiba

Key words : 2-NBDG, glucose, two-photon microscopy, brain

1. 緒言

ヒトの脳の主要なエネルギーはグルコースの酸化的代謝によって得られるアデノシン三リン酸 (Adenosine triphosphate, ATP) である. ATP 合成のために脳は全身のグルコース消費量の約 25 % を占めている. 脳内におけるグルコースはグリコーゲンの形でアストログリア細胞に貯蓄されているが約 3 分間の消費を賄う量しかなく, 実質的に貯蓄はないに等しい. したがって, 脳におけるグルコースの供給は血流に依存している. 血液中のグルコースは血管内皮細胞のグルコース・トランスポーター (Glucose transporter 1, GLUT1) によってアストログリア細胞へと輸送される. そこでピルビン酸, 乳酸へと代謝される^[1]. このグルコース代謝が細胞のどこでどのくらいの時間で行われているのか調べるために, 本研究では, マウス大脳皮質における蛍光グルコースの時空間動態を, 二光子顕微鏡を用いて調べた.

2. 方法

2.1 実験動物の準備

実験には 7-17 週齢のマウス (C57BL/6J, オス, 18-26 g, N = 7) を用いた. イソフルラン麻酔下で大脳皮質の体性感覚野に相当する頭蓋骨部位を除去し, 硬膜を露出した. 露出部の硬膜は円形のカバーガラスで覆い, デンタルセメントでカバーガラスと周囲の頭蓋骨とを接着した^[2]. さらに, カバーガラス周囲の頭蓋骨に顕微鏡ステージ固定用のアルミプレートに接着した. 実験はイソフルラン麻酔 (1.0 %) 下で行った.

観察する 3-4 時間ほど前に蛍光色素 Sulforhodamine 101 (SR-101, 蛍光波長: 610 nm) を腹腔に投与し血しょう及びアストログリア細胞を蛍光標識した. 観察時には蛍光グルコース 2-[N-(7-nitrobenz-2-oxa-1,3-diazol-4-yl)amino]-2-deoxy-D-glucose (2-NBDG, 蛍光波長: 530 nm) を腹腔に投与した.

投与直前(これを 0 分とした)と投与後 1 分, 5 分, 15 分, 30 分, 50 分の計 6 回撮像した.

2.2 二光子顕微鏡観察

蛍光グルコース及び細胞の観察には二光子顕微鏡を用いた. 光源はチタンサファイアパルスレーザー (Mai-Tai HP, 励起波長: 900 nm, 平均出力 2W) で, 20 倍の対物レンズ (NA = 1.0, 水浸) 及び 2 種類のバンドパスフィルター (Ch 1: 573-648 nm, Ch 2: 500-550 nm) を用いて 2 チャンネル同時計測した. 1 平面 XY 画像は 1024 pixel × 1024 pixel (250 µm × 250 µm) で脳表から深さ 400 µm までを 4 µm の間隔で体積画像を取得した.

2.3 蛍光グルコースの時空間動態の解析

得られた 3 次元タイムコース画像のうち, 深さの等しい 1 枚を測定時間ごとに抜き出し, 血管, アストログリア細胞, 神経細胞, 細胞外組織に直径 5 µm の関心領域 (Region Of Interest, ROI) を置き, 領域内の平均輝度を取得した. 血管内は 4 つの ROI の平均輝度を, 血管外はアストログリア細胞, 神経細胞, 細胞外組織の平均輝度を求めた.

次に, アストログリア細胞, 神経細胞, 細胞外組織の平均輝度の割合を求めた. さらに, 変化量の差分として (アストログリア細胞の輝度) - (神経細胞の輝度) 及び (アストログリア細胞の輝度) - (細胞外組織の輝度) を求めた.

3. 結果及び考察

3.1 蛍光グルコースの時空間動態の観察

蛍光グルコースの時空間動態の観察結果を Fig.1 及び Fig.2 に示す. Fig.1 より, 投与から 15 分ほどで蛍光グルコースが血管内を満たしているのがわかった. 投与から 50 分では血管以外の組織においても蛍光グルコースが確認された. これらの結果は, 腹腔に投与した蛍光グルコースは血管内に入り, その後血管外の組織へと移行したことを示唆する.

Fig.1 Time lapse images of fluorescent signals

Fig.2 より、深さ 400 μm ではチャンネル 2 で光が検出されなことがみられた。この結果は、2-NBDG の限界深度が 300–400 μm のあたりにあることを示唆している。

Fig.2 XYZ images of fluorescent signals 15min after admin.

3.2 蛍光グルコースの時空間動態の解析

蛍光グルコースの時空間動態の解析結果を Fig.3 , Fig.4 及び Fig.5 に示す。血管内の輝度は投与後急激に高くなり、15 分ほどでピークを迎え、そして低くなっていく傾向がみられた (Fig.3)。血管外は投与後、時間が経過するにしたがって徐々に高くなっていく傾向がみられた。これらの結果から、血管では 15 分ほどまでは蛍光グルコースの取り込みが血管外への排出よりも大きく、その後は排出が取り込みよりも大きくなったことを示唆する。また、血管外を構成する組織の中でアストログリア細胞が時間によらず神経細胞と細胞外組織よりも蛍光グルコースの輝度が高いという傾向がみられた (Fig.4)。この結果は、アストログリア細胞に蛍光グルコースが多く移行した可能性が示唆される。そして、投与後 5 分ほどまではアストログリア細胞の中の蛍光グルコースの輝度の上昇が神経細胞と細胞外組織より高くなり、その後は神経細胞と細胞外組織の上昇が高くなっていく傾向がみられた (Fig.5)。この結果より、投与後 5 分までは選択的にアストログリア細胞に蛍光グルコースが移行し、その後神経細胞や細胞外組織へと移行していった可能性が示唆される。

胞や細胞外組織へと移行していった可能性が示唆される。

Fig.3 Time-intensity curve measured at a depth of 224 μm

Fig.4 Time-relative intensity curve of 3 components outside vessels measured at a depth of 224 μm

Fig.5 Comparison between Astro-Neuron and Astro-Extracell
Ast: Astroglia, Neu: Neuron, EC: Extracellular space

4. 結言

蛍光グルコースの時空間動態は、血管内は投与後 15 分ほどでピークに達し、血管外は投与後から時間が経過するにつれて上昇していくことがわかった。特に血管外では投与後 5 分ほどではアストログリア細胞に選択的に蛍光グルコースが集まり、その後神経細胞や細胞外組織にも輸送されていくのがわかった。蛍光グルコースが血管に入り、アストログリア細胞を通して、そして神経細胞や細胞外組織に移行するという経路を通る可能性が示唆された。

参考文献

- [1] 高橋慎一, 鈴木則宏: 脳虚血病態と糖代謝障害, Diabetes Frontier, 20-5, 572/576, (2009)
- [2] Tomita Y, Kubis N, Calando Y, Tran Dinh A, Méric P, Seylaz J, Pinard E.: Long-term in vivo investigation of mouse cerebral microcirculation by fluorescence confocal microscopy in the area of focal ischemia., J Cereb Blood Flow Metab, 858/867 (2005)