

学位論文内容の要旨

論文提出者氏名	論文審査担当者
佐久間航	主査 教授 大道 正英 副査 教授 窪田 隆裕 副査 教授 大槻 勝紀 副査 教授 勝岡 洋治 副査 教授 吉田 龍太郎
主論文題名 モルモット卵管采における卵管上皮線毛運動周波数の測定 (Measurement of ciliary beat frequency in Fallopian tube epithelium of guinea pig)	
学位論文内容の要旨	
<p>《要旨》</p> <p>モルモット卵管采スライス標本を用い、直接卵管上皮線毛運動周波数を測定するための方法を開発した。卵管上皮を倒立型光学顕微鏡のステージ上に置いた微小灌流チャンバーにセットし線毛運動を直接観察し、顕微鏡に接続した高速度カメラ(500Hz)によりビデオ画像として線毛運動を記録した。線毛運動によるビデオ画像上の輝度変化を画像処理することにより経時的に測定し、卵管上皮の細胞レベルにおける線毛運動周波数(ciliary beat frequency, CBF)を計算した。卵管におけるCBFは5-30 Hzの範囲にあった。この手法を用いて、モルモットの性周期と卵管采上皮のCBFの関係について検討した。その結果、CBFは一定ではなく、性周期前半と後半で二峰性に上昇することが明らかとなった。このCBFの性周期に伴う変化はエストロゲンとプロゲステロンと密接に関係していることが示唆された。</p> <p>《材料及び方法》</p> <p>試料作成とCBFの測定:モルモット(雌、6週齢)をSLC(静岡)より購入し、実験動物センター(大阪医大)で試料はモルモット標準食、水を与え、12-16週齢まで飼育した。性周期を同期させるために、1ケージに10匹を入れ少なくとも1週間以上飼育した後実験を開始した。実験は1-2日間隔で連続してモルモットを屠殺し、卵管采及び血液(10 ml)を採取した。実験は3ケージについて行った。モルモットは50-70 mg/kgのpentobarbital-Naを腹腔内投与して麻酔した後、頸椎脱臼により屠殺した。屠殺後直ちに開腹、開胸し心臓を穿刺し採血した後、両側卵管と卵巣を一塊に取り出し、灌流溶液(後述)で洗浄した後、4°Cの灌流溶液中で保存した。実験は卵管採取後4時間以内に行った。採取した血液は直ちに遠心し、血球と血漿を分離した後、血漿は卵巣ホルモン測定まで凍結保存(-20°C)した。</p> <p>得られた卵管采を実体顕微鏡下に1-2 mmのブロックに細切し、微小灌流チャンバーにセットした。灌流チャンバーは倒立型顕微鏡のステージ上にセットし線毛運動を直接観察した。CBF測定のために高速度カメラ(FASTCAM-512CI, Photoron Ltd., Tokyo)を接続し、500 Hzで2秒間記録し(1000画像)、コンピューター上に画像として記録した。記録は両側卵管采から30-40画像を測定した。測定画像は画像処理software(Dipp-Motion 2D, Ditect Ltd., Tokyo)を用い輝度変化からCBFを計算した。</p>	

輝度変化の測定部位は、1 画像につき 8-10 点で行った。線毛運動の測定には、カバースリップ直上の線毛部分を用いた。また、線毛運動における線毛の振幅を定量化するために、線毛の振れの角度 (ciliary beat angle, CBA) を測定した。

ホルモン測定：血漿中の estradiol, progesterone はそれぞれ EIA Kit (Cat. No. 182678, No.582601, Cayman Ann Arbor, MI 48108, USA) を用い測定した。Estradiol は血漿を直接、progesterone は血漿を 50 倍希釈した後測定に用いた。

溶液：実験に用いた溶液の組成は NaCl 121 mM, KCl 4.5 mM, NaHCO₃ 25 mM, MgCl₂ 1 mM, CaCl₂ 1.5 mM, HHepes 5 mM, NaHepes 5 mM, glucose 5 mM, pH 7.4 であった。溶液は 37°C に加温し、95% O₂ & 5% CO₂ で飽和した。実験はすべて 37°C で行った。

《成績》

各生殖周期日は estradiol と progesterone の測定結果から決定した。すなわち、estradiol の上昇の 7 日前を性周期の第 1 日とした。モルモットの性周期は 14-21 日と言われているが、今回の実験例では 16 日となった。CBF は day 1-2 では約 10 Hz であったものが estradiol と progesterone の上昇に伴い増加し、day 6 には 14 Hz まで増加した。しかし day 7 ではさらに estradiol が増加しているにも関わらず、CBF は 11 Hz まで低下した。day 8 では estradiol と progesterone は低下し、それに伴い CBF は約 10 Hz とさらに低下した。day 9 では progesterone は一過性に上昇した。その後 estradiol は緩やかに低下し、progesterone は低いレベルに維持された。Estradiol と progesterone の減少に伴い、CBF は再度上昇し、day 12-13 で 14-15 Hz となり、その後低下し day 15 では約 10 Hz となった。Ciliary beat angle (CBA) は CBF と同じ様な変化を示した。すなわち、CBF が増加しているときには、CBA も増加していた。

《結語》

今回の研究により、*in vitro* の実験系として、直視下に線毛運動を観察できる方法が確立された。今後、ホルモンや薬物の CBF に及ぼす影響を定量的に研究することが可能となった。

審査結果の要旨および担当者

報告番号	甲 第 号	氏 名	佐久間 航
論文審査担当者		主 査 教 授	大 道 正 英
		副 査 教 授	窪 田 隆 裕
		副 査 教 授	大 槻 勝 紀
		副 査 教 授	勝 岡 洋 治
		副 査 教 授	吉 田 龍 太 郎
主論文題名 モルモット卵管采における卵管上皮線毛運動周波数の測定 (Measurement of ciliary beat frequency in Fallopian tube epithelium of guinea pig)			
論文審査結果の要旨			
<p> モルモット卵管采スライス標本を用い、直接卵管上皮線毛運動周波数を測定するための方法を開発した。卵管上皮を倒立型光学顕微鏡のステージ上に置いた微小灌流チャンバーにセットし線毛運動を直接観察し、顕微鏡に接続した高速度カメラ(500Hz)によりビデオ画像として線毛運動を記録した。線毛運動によるビデオ画像上の輝度変化を画像処理することにより経時的に測定し、卵管上皮の細胞レベルにおける線毛運動周波数(ciliary beat frequency, CBF)を計算した。卵管におけるCBFは5-30 Hz の範囲にあった。この手法を用いて、モルモットの性周期と卵管采上皮の CBF の関係について検討した。その結果、CBF は一定ではなく、性周期前半と後半で二峰性に上昇することが明らかとなった。この CBF の性周期に伴う変化はエストロゲンとプロゲステロンと密接に関係していることが示唆された。 </p> <p> 本研究は、<i>in vitro</i> の実験系として、直視下に線毛運動を観察できることを確立したものであり、今後、ホルモンや薬物の CBF に及ぼす影響を定量的に研究することが可能となる。その臨床的意義は非常に大きいものであると考えられる。 </p> <p> 以上より、本論文は本学大学院学則第 11 条の定めるところの博士(医学)の学位を授与するに値するものと認める。 </p> <p> (主論文公表誌) 大阪医科大学雑誌 67(2): 63-68, 2008 </p>			