

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 3 月 26 日現在

機関番号：13904

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2011

課題番号：21590231

研究課題名（和文）

生体内視顕微鏡法による膵β細胞インスリン放出と血糖値制御機構の解明

研究課題名（英文）

Insulin secretion in pancreatic β cells and control of blood glucose level studied by fiber-coupled microendoscopy

研究代表者

櫻井 孝司（SAKURAI TAKASHI）

豊橋技術科学大学・エレクトロニクス先端融合研究所・特任准教授

研究者番号：50283362

研究成果の概要（和文）：

生体深部に存在する細胞の生理機能をマルチサイトで観察するために分岐型ファイバー式共焦点顕微鏡法（FCM）を構築した。FCM は蛍光標識した分泌顆粒の強度変化を多数の膵β細胞において同時計測するのに十分な時空間性能を有していた。FCM 法により血管へ向けてのインスリン放出を反映するグルコース依存性の蛍光強度変化を計測することができた。本法は血糖値の制御および異常発生機序解明に有用な技術と考えられた。

研究成果の概要（英文）：

To elucidate physiological functions of multiple cells or organs existing deep inside body, we developed a branch-type fiber-coupled confocal microscope (FCM). The spatio-temporal performance of FCM was enough to resolve the fluorescently-labelled granules in the pancreatic β cells. By using FCM, we could measure glucose-dependent fluorescent intensity changes in the β-granules reflecting secretion of insulin to the blood stream. The FCM may be useful technique for the understanding of mechanisms or disorders controlling of the blood glucose level.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	1,400,000	420,000	1,820,000
2010 年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2011 年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・生理学一般

キーワード：生理学、細胞・組織、生体・分子、糖尿病、バイオ関連機器

1. 研究開始当初の背景

(1) 単一開口放出反応の可視化と光学的観察法の改良

分泌過程の研究において光学顕微鏡法による開口放出の可視化が適用されている。微分干渉法、共焦点法、全反射法などが有効の手法とされている。我々は開口数値 1.65 の対物レンズを開発し、これを全反射照明法に適用した。ガラスと水など屈折率が異なる媒質間の界面近傍においては、光顕による理論的検出限界（約 200 nm）を超えるサイズの対象物を解像することが可能となっている。初代培養したインスリン分泌細胞や神経細胞の細胞膜近傍における単一開口放出反応の解析へ応用した。インスリンなど放出される分子を蛍光タンパク質で標識すると、分泌小胞（直径約 300 nm）は高輝度スポットとして観察でき、脱分極刺激等で開口放出反応が惹起されて顆粒内容物が放出されると、スポット輝度値の急激な変化として検出できた。観察領域が細胞膜近傍だけに限定されている全反射法を改良するために薄層斜光照明法へ技術展開し、細胞膜から数ミクロンほど離れた細胞質領域における超微細構造を捉えることができた。以上のように光学顕微鏡法によって、単一開口放出の詳細な解析が可能となっているが、生体における膵ランゲルハンス島β細胞の分泌顆粒を低侵襲で捉えるまでには至っていない。

(2) 生体における膵β細胞の微細形態を解析するファイバ式共焦点法の開発

生体膵ランゲルハンス島において開口放出反応を直接見る手法の開発に着手してきている。生体内視顕微鏡法として確立している代表的手法には多光子励起法があり、原理的には組織表面から約 1 ミリ深部までの領域が観察できる。蛍光分子の多光子励起には通常の対物

レンズが用いられるため、膵のような実質臓器深部へ低侵襲で挿入することは困難であり、問題を解決には組織内へ挿入部を極小化する必要がある。そこで我々は素線 3 ミクロンの光ファイバーを束ね、先端直径 1 ミリ以下としたイメージングファイバ（IF）を独自製作し、内部への挿入による侵襲性を低くしながら、明瞭な画像を取得する基本技術とした。IF の挿入時に発生する出血等を最小限としながら組織深部に存在する細胞の微細形態像を直接得ることが現実的となった。IF 面とピント面を光学的共役関係とすることで共焦点効果を得ることができ、Ca²⁺や PKC など細胞シグナルの検出まで成功したが、単一分泌顆粒の解像には時空間分解能が不足して開口放出反応の検出まで至れていない。

2. 研究の目的

本研究課題では生体深部に存在する細胞の超微細形態を低侵襲観察する生体内視顕微鏡法を開発し、膵β細胞におけるインスリン放出のリアルタイム観察を可能とすることで、糖尿病研究モデルの確立ならびに血糖制御機構を解明する。

これまでに開発に成功した IF の時空間分解能を大幅に向上し、β顆粒を検出できる IF を製作し、先端を多分岐させたマルチサイト測定による多臓器解析も可能としたい。

3. 研究の方法

侵襲性、空間解像度、時間分解能を向上させたイメージングファイバ（IF）を製作して生体内における開口放出反応検出法を新たに開発・改良する。光ファイバ素線の有効径は 1 ミクロン、開口数は 0.7 を目標値として、専用のミニチュア対物レンズと結合させる。生体内部に挿入した IF 端面と近接した領域における蛍光分子を共焦点法で励起して、膵

ランゲルハンス島の単一分泌顆粒の追跡を確認する。IF 端面を多分岐させて、同時に複数箇所、多臓器における蛍光信号取得を行う。蛍光 S/N 比と光走査速度を向上させて、開口放出反応を生体内の複数箇所でのビデオレート検出を実現する。膵ランゲルハンス島の β 細胞だけでなく周辺の内分泌細胞、肝細胞の同時観察も可能にする。多臓器観察において生体への負担を下げるために蛍光観察法を改良する。

4. 研究成果

(1) 高解像度レンズ付イメージングファイバ(IF)の製作

IF の素線は純化石英製を束ねたものに専用のミニチュア対物レンズを結合させて先端部を直径 1.5mm とした。各ファイバ素線は 1.5 ミクロン、縦横各 128 (約 1.6 万本バンドル構成)、視野を直径 150-300 ミクロンとした。IF 先端に設置する専用のミニレンズは、倍率 2 倍、作動距離 0.5 ミリ、波長 470~640 nm の色補正した。IF 組み立て時の接着剤を無蛍光性とすることで自家蛍光を軽減できた。IF の保持および先端位置決め用の専用ホルダを設計・製作することで、生体への挿入角度が易調整でき、先端の位置も安定化できた。

(2) ファイバ結合式共焦点顕微鏡 (FCM) の構築および基本性能の検証

FCM は IF、レーザー光源、レーザースキャナ (ニポードディスク)、ビーム径調整レンズ、カップルレンズ、ピエゾ素子、高感度冷却 CCD カメラで構成した。光源、カップルレンズ前側焦点面、ファイバ端面が光学的共役関係となるよう微調節することで光学結合率および共焦点蛍光画像の S/N 比を向上でき、蛍光画像は毎秒 30 枚以上取得できた。蛍光画像の空間解像力は蛍光ビーズを用いて評価した。カバーガラスに貼りつけた直径 1 ミクロンの蛍

光ビーズの画像を取得して、ピント位置を変位させたときの明るさプロファイル変化量から XY 平面の空間分解能は 1 ミクロン、Z 軸方向は 5 ミクロンと判定した。

(3) 分岐式イメージングファイバ (B-IF) の製作

同時に複数の対象・臓器を観察するために B-IF を製作した。IF を 4 本束ね、直径 500 ミクロン内に格納できた。各 IF へ入射する光は収差補正対物レンズ (UPlanSApo 20x) を用いることで光結合効率の低下は少なく、4 箇所同時の観察が可能だった (例: 脳 1 箇所、膵を含む消化管組織 3 箇所) 4 本の IF 先端部を生内に長期間滞留しておくための留置カテーテルを製作し、ホルダに装着・保持して生体内視鏡とした。

(4) 膵 β 細胞における分泌顆粒の画像化と追跡

構築した FCM を用いて、培養膵 β 細胞株 (insulin-GFP で蛍光標識した INS1 細胞) の観察を行ったところ、細胞および細胞内構造の識別が可能だった。次に麻酔下ラットにおいて B-IF を腹腔内へ挿入、先端を腺尾部領域へ近接させて行った。腺 β 細胞は 2 種類の蛍光色素で標識し、一方の蛍光色素は焦点調整用、他方は分泌測定用とすることで β 顆粒に対する光毒性を軽減した。 β 顆粒は高輝度スポットの集団として画像化できた。グルコース刺激に対する蛍光強度変化を計測したところ、数本のファイバ素線にわたる範囲において、グルコース刺激してから 30 秒後から数分間にわたって強度の急激な低下が検出された。強度の変化率は観察部位によって異なっていた。以上の結果から、複数の β 顆粒における開口放出反応を計測したと推察された。

(5) 長期多臓器モニタリング

1 時間以上の長時間にわたる連続モニタリングも試みたが、同一部位では最長で 20 分だっ

た。出血等による励起光率の低下は防げたが、同一視野の確保が困難だった。瞼β細胞だけでなく、関連臓器の形態機能の同時観察も試みた。肝細胞のCa応答、腎糸球体や小腸絨毛の微細構造を観察することができ、多臓器同時モニタリングへの有用性も確認できた。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計2件)

- ① 櫻井孝司、金田雅充、寺川進、ファイバ顕微鏡の世界、OPTRONICS 7, 116-120、2011
- ② 寺川進、櫻井孝司、井上卓、針の孔から深部を覗く、日本レーザー医学会誌 31, 404-408、2011

[学会発表] (計7件)

- ① 櫻井孝司、夏目三男、秋山喬、金田雅充、福司康子、寺川進、ファイバ顕微鏡によるリアルタイム生体細胞観察、第20回日本バイオイメーキング学会、2011.9.1千歳
- ② 櫻井孝司、夏目三男、秋山喬、金田雅充、福司康子、寺川進、生体内細胞観察用のファイバ顕微鏡の開発、第6回日本分子イメーキング学会、2011.5.26、神戸国際会議場
- ③ 櫻井孝司、生き物を見る技術、京都工業繊維大学イメーキング講習会、2010.9.14、京都
- ④ 櫻井孝司、須々木礼美、呉 鴻、最上秀夫、寺川 進、破骨細胞におけるアクチンリング形成の時空間解析、第87回日本生理学会、2010.5.19、盛岡
- ⑤ 櫻井孝司、寺川進、ファイバ式共焦点内視顕微鏡法による細胞レベルの光学診断と治療、第30回日本レーザー医学学会、2009.12.3、東京
- ⑥ 櫻井孝司、オワンクラゲ GFP も見える顕微鏡とは？、第18回日本バイオイメーキング学会公開講座、2009.9.5、岡山

- ⑦ 櫻井孝司、呉鴻、須々木礼美、最上秀夫、寺川進、アクチンリング形成のダイナミクス解析、第18回日本バイオイメーキング学会、2009.9.4、岡山

[図書] (計0件)

[産業財産権]

○出願状況 (計0件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

出願年月日:

国内外の別:

○取得状況 (計0件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

出願年月日:

国内外の別:

[その他]

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

櫻井孝司 (SAKURAI TAKASHI)

豊橋技術科学大学・エレクトロニクス先端

融合研究所・特任准教授

研究者番号: 50283362

(2) 研究分担者

()

研究者番号:

(3) 連携研究者

()

研究者番号: