

別紙 1-1

論文審査の結果の要旨および担当者

報告番号	※	甲	第	号
------	---	---	---	---

氏 名 川添 亮太郎

論 文 題 目

Two-photon microscopic observation of cell-production dynamics
in the developing mammalian neocortex *in utero*

(二光子顕微鏡による哺乳類大脳原基における
細胞産生ダイナミクスの子宮内観察)

論文審査担当者


名古屋大学教授

主 査 委員

木山博資 


名古屋大学教授

委員

吉川史隆 

名古屋大学教授

委員

永田浩一 

名古屋大学教授

指導教授

宮田卓樹 

論文審査の結果の要旨

論文審査の結果の要旨

二光子顕微鏡を用い、マウス胎仔脳原基の新規子宮内観察法を構築した。さらに新規観察法により、脳室面近傍での細胞産生現象や細胞産生を担う神経幹細胞の細胞周期動態のライブ観察を達成した。観察法の構築に際しては、母体及び胎仔生存のための体温管理や母体からの振動の抑制といった課題に対し、40回の条件検討を経て、実験装置の製作を含めた対策を講じ解決を図った。新規観察法による脳室面近傍のライブ観察結果を従来の組織培養下の観察と比較したところ、時間・面積あたりの分裂頻度や誕生した娘細胞が脳膜側へ核移動し、脳室面を離れるまでの時間に有意な差はなかった。また、神経幹細胞の細胞周期依存的な核移動（S・G2期）についても子宮内観察を達成した。これにより、胎生中期のマウスで脳室面までを含む大脳原基の全ての細胞を子宮内ライブ観察することが可能であることが示された。





本研究に対し、以下の点を議論した。

- 1.現状での最長観察時間は90分程度である。観察中に胎仔の拍動が停止し、神経幹細胞の染色体の異常凝集や細胞周期の停止が起こる原因は特定されていない。母体とのつながりを維持しながらの子宮内観察という手法の性質上、原因は一つではなく、複数の原因が重なることによると考えられる。その上で、観察に供した胎仔の拍動が停止していても、そのすぐ隣の胎仔は生きていたといったことが見られることから、卵巣動脈を介した母体からの血流の阻害ではなく、胎仔個体内のより局所での問題が原因と推測される。そこでさらなる改善の方向性として、胎仔個体内の循環の改善や胎仔・胎盤への物理的ダメージの軽減が挙げられる。
- 2.胎仔の生存の観点から、羊水が重要であることは検討の中で認識されている。その一方で脳室面までを見通すため、散乱の原因となる子宮壁および羊膜に穴を開けている。穴は可能な限り小さくし、穴が不必要に広がらないよう、切り口の端を接着剤で止める等の対策を講じている。これにより羊膜に胎仔の頭部を覗けるだけの穴は開いているが、羊膜と胎仔の間に羊水が残るような状態は確保されている。
- 3.母体とのつながりを維持しつつ、薬剤投与や母体炎症時に大脳形成が受ける影響を評価することが挙げられる。また、人為的に胎仔を可逆的な虚血・低酸素状態におき、低酸素状態に対する胎仔の耐性を評価する等の検討が臨床的な観点から期待される。さらに組織培養下で誕生するニューロンの分化度が組織切片による解析時と異なる等の組織培養下でのアーチファクトを排除した観察も期待できる。

本研究は、哺乳類の大脳形成を母体との関連を含めた真の *in vivo* 環境で理解する上で、重要な知見を提供した。

以上の理由により、本研究は博士（医学）の学位を授与するに相応しい価値を有するものと評価した。

試験の結果の要旨および担当者

報告番号	※ 甲 第	号	氏 名	川添 亮太郎
試験担当者	主査	木山博資 	副査 ₁	吉川史隆 
	副査 ₂	永田浩一 	指導教授	宮田卓穂 
(試験の結果の要旨)				
<p>主論文についてその内容を詳細に検討し、次の問題について試験を実施した。</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. 観察時間の延長のため、どのような改善の余地があるかについて。 2. 羊膜に観察用に穴を開けることの是非について。 3. 新規観察法で観察可能な現象と今後の応用について。 <p>以上の試験の結果、本人は深い学識と判断力ならびに考察力を有するとともに、細胞生物学一般における知識も十分具備していることを認め、学位審査委員合議の上、合格と判断した。</p>				