

—グラビアー—

網膜再生医学とパッチクランプ法

石井 俊行¹ 世古 裕子² 金田 誠^{1,3}¹日本医科大学生理学 (システム生理学)²国立障害者リハビリテーションセンター研究所感覚機能系障害研究部視覚機能障害研究室³日本医科大学大学院医学研究科感覚情報科学分野

Patch Clamp Study for Regenerative Medicine of the Retina

Toshiyuki Ishii¹, Yuko Seko² and Makoto Kaneda^{1,3}¹Department of Physiology, Nippon Medical School²Department of Rehabilitation for Sensory Functions, Research Institute, National Rehabilitation Center for Persons and Disabilities³Department of Physiology, Graduate School of Medicine, Nippon Medical School

図 1

網膜領域の再生医学の進歩は著しく、現在臨床応用を視野に入れた臨床試験の段階にまで研究が進んでいる。再生視細胞の分化程度の評価は、1) 免疫組織化学法を用いた視細胞特異的なタンパク質の発現解析、2) RT-PCR法を用いた視細胞特異的な遺伝子発現解析などで行われてきた。

再生視細胞の機能的な分化程度の解析には、パッチクランプ法を用いて視細胞の光応答の有無を記録するのが一番である。しかしながら視細胞は光に反応するという性質を持っているため、視細胞の機能解析には暗闇中でパッチクランプを行う必要があり、さまざまな工夫を必要とする。写真に示した感覚情報科学教室の暗闇パッチの実験セット(図1)では、実験中のみ簡単に暗室化できるようパッチクランプセットの周辺に暗幕を引いて、実験セットを囲む

暗室ができるように工夫している。赤外線暗視装置を使う場合もあるが、通常は実験台に光が入らないように薄暗い赤色光を点灯して暗室内では作業する。また実験に使用する機器の緑色のモニターランプはすべて銀紙でふさぎ、視細胞が機器の光に反応しないようにして使用する(図2)。さらにコンピューターのモニター画面には赤色のセロファン紙を張り付けて、赤色以外の光が漏れないようにすることも大切である。

顕微鏡のランプを点灯できないため、パッチ電極の細胞へのアプローチ操作は赤外線モニターに映る細胞の画像が頼りとなる。赤外線モニターのイメージを用いてパッチクランプ法を実施し、視細胞からの記録ができる状態になったところで初めて光刺激を与え、光応答の有無を解析する(図3)。



図 2

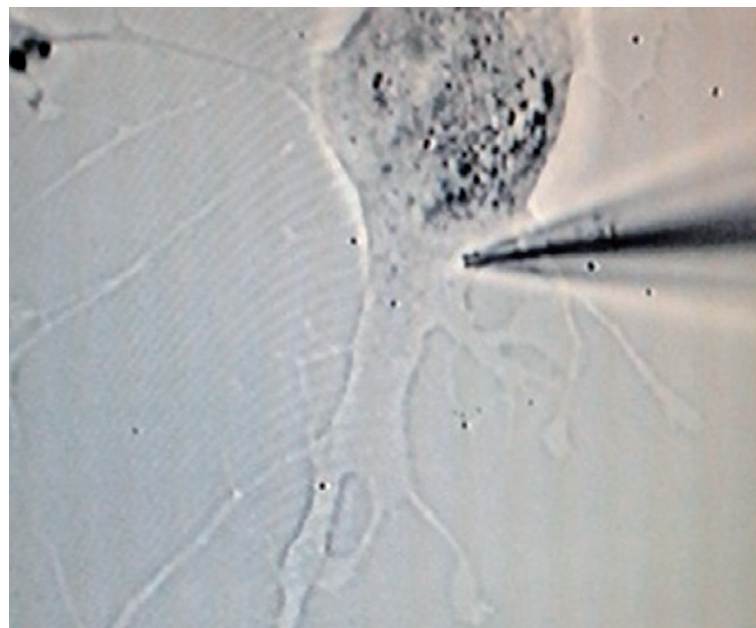


図 3

図1 パッチクランプセット (左) と暗室 (右)
暗室内にパッチクランプのセットがある。

図2 実験に使用している機器からの漏洩光対策
緑色のパイロットランプはすべて銀紙で遮蔽して使用する。

図3 分化誘導した視細胞からのパッチクランプ記録
赤外線モニター画像を使って電極を操作する。 Direct reprogramming によってヒト皮膚線維芽細胞から分化誘導した視細胞