

厚生労働科学研究費補助金

萌芽的先端医療技術推進研究事業

超極限分子プローブによる組織障害の
再生・治癒機構の分析と
高精度局所診断技術の開発

(H14-ナノ-018)

平成15年度 総括・分担研究報告書

主任研究者

南 谷 晴 之

平成16（2004）年3月

目 次

I. 総括研究報告			
超極限分子プローブによる組織障害の再生・治癒機構の解析と 高精度局所診断技術の開発	主任研究者	南谷晴之	1
II. 分担研究報告			
1) 脳微小循環の血流・代謝イメージングシステム	主任研究者 研究協力者	南谷晴之 塚田孝祐	15
2) 脳への選択的物質移送システムを用いて脳梗塞や脳虚血による傷害の画像化	主任研究者 研究協力者	南谷晴之 鈴木弘美	21
3) 血管炎発症機構の in vivo イメージング -MPO-ANCAの関与-	分担研究者	鈴木和男	25
4) 微小循環イメージングと糖尿病性細小血管障害機構の解明	分担研究者	関塚永一	37
5) 心筋・肝細胞・内皮細胞等のマルチカラーイメージングと分子機能解析	分担研究者	川西 徹	45
6) 炎症反応、関節炎発症におけるCD69分子の役割と血栓形成のイメージング	分担研究者	中山俊憲	57
7) 標識モノクローナル抗体による神経障害防御機構の解析と診断治療への応用	分担研究者	新井孝夫	67
8) ナノプローブを用いた単一分子レベルの細胞内生体機能解析と病理診断への 応用	分担研究者	船津高志	73
9) 密着型フラッシュ軟X線顕微鏡による細胞外マトリックス様構造の解析と 密着型紫外線顕微鏡による細胞観察	分担研究者	眞島利和	79
10) 局所選択的診断治療用リポソーム粒子包含ナノ粒子の開発	分担研究者	松村英夫	85
11) 量子ドットの多臓器不全診断治療への応用	分担研究者	山本健二	89
12) 超高感度 ³¹ P-NMRプローブの開発	分担研究者	田之倉優	93
13) 真核生物ポリペプチド鎖終結因子eRF1の動的構造の解析	分担研究者	村松知成	97
14) 神経細胞再生因子の動的解析	分担研究者	霜田幸雄	103
15) ストレス応答・細胞死情報伝達過程のイメージング手法の開発	研究協力者	朽津和幸	111
III. 研究成果の刊行に関する一覧表			119
IV. 研究成果の刊行物・別刷			127

厚生労働科学研究費補助金 萌芽的先端医療技術推進研究事業
総括・分担研究報告書

超極限分子プローブによる組織障害の再生・治癒機構の解析 と高精度局所診断技術の開発

主任研究者

南谷晴之 (慶応義塾大学大学院理工学研究科基礎理工学専攻・教授)

分担研究者

鈴木和男 (国立感染症研究所生物活性物質部・室長)
関塚永一 (国立埼玉病院・副院長)
川西 徹 (国立医薬品食品衛生研究所生物薬品部・部長)
中山俊憲 (千葉大学大学院医学研究院免疫細胞医学・教授)
新井孝夫 (東京理科大学理工学部応用生物科学科・教授)
船津高志 (東京大学大学院薬学系研究科・教授)
眞島利和 (産業技術総合研究所光技術研究部門・主任研究員)
松村英夫 (産業技術総合研究所光技術研究部門・主任研究員)
山本健二 (国立国際医療センター研究所・部長)
田之倉優 (東京大学大学院農学生命科学研究科応用生命化学専攻・教授)
村松知成 (国立がんセンター研究所生物物理部・主任研究者)
霜田幸雄 (東京女子医科大学総合研究所・助教授)

研究協力者

塚田孝祐 (川崎医科大学生理学教室・助手)
鈴木弘美 (藤田保健衛生大学総合医科学研究所難病治療共同研究部門・助手)
朽津和幸 (東京理科大学理工学部応用生物科学科・助教授)
大幡久之 (昭和大学薬学部薬理学教室・助教授)
大内 敬 (東京理科大学理工学部応用生物科学科・助手)

超極限分子プローブによる組織障害の再生・治癒機構の解析と 高精度局所診断技術の開発

主任研究者 南谷 晴之 慶応義塾大学大学院理工学研究科基礎理工学専攻 教授

研究要旨

蛍光・燐光発光分子、蛍光蛋白、蛍光抗体、量子ドット、磁気微粒子などの物理的・生化学的作用に基づく分子認識機構を有するナノプローブを用いて、微小循環障害、血管炎、免疫障害などホメオスタシスの破綻に基づく種々の細胞・組織障害の生理メカニズムを分子・細胞レベルで解析する高感度フォトニックイメージング技術を開発した。本研究はトランスレーショナルリサーチの一環として、病態発現のメカニズムと細胞・組織の再生治癒過程に関する分子機序を局所的にイメージング解析し、診断治療への応用展開をはかることを目的として遂行された。分担研究者、研究協力者を含めて本研究では、バイオイメージング用ナノプローブと各種イメージングシステムの開発を行い、細胞・組織内のオルガネラや機能分子の動態をイメージング解析し、それぞれの生理機能や病態発現と再生・治癒機構の解明を試みた。とくに (1) 脳など実質臓器における虚血・再灌流時の血行動態、酸素代謝、活性酸素産生、(2) 腫瘍新生微小血管内の血流動態と酸素代謝の関係、(3) 糖尿病易血栓性に関わる血球細胞と血管内皮細胞の相互作用、(4) 難治性血管炎における免疫異常と活性化白血球の関わり、(5) 心筋・肝細胞・内皮細胞のマルチカラーイメージングと分子機能解析、(6) 神経細胞・癌細胞の apoptosis 誘導過程におけるシグナル伝達、などの解明を進めた。

A. 研究目的

蛍光・燐光発光分子、量子ドット、磁気微粒子、蛍光抗体、蛍光蛋白などの物理的・生化学的作用に基づく分子認識機構を有する超極限分子プローブを用いて、生体内で起こる血管炎や微小循環障害によって誘発される種々の組織傷害や細胞傷害のメカニズムを分子・細胞レベルで解析・診断する超高感度イメージング技術を開発するとともに、その障害の発現メカニズムと障害からの再生・治癒過程に関する分子機序を局所的に解析し、診断治療への応用展開を行うことを目的としている。その項目は、1) 超極限分子を骨格とするナノ粒子プローブの

開発と応用、2)高感度高速度バイオイメージング技術の開発と応用、3) 複数の異なるナノプローブの発光現象を利用する多波長励起マルチフォトニックイメージングシステムの開発と応用、4)組織細胞内の分子生理機能の時空間的計測・解析技術の開発と応用、5)糖尿病性細小血管障害・脳血栓など特異的な血流ダイナミクスのイメージング解析と薬理効果の評価、6) 腫瘍新生血管の光化学反応に基づく血流遮断効果や糖尿病性微小循環における血管閉塞・血栓形成の解析と診断治療への応用などである。また、病態に対する促進・抑制分子機能や薬理効果の解析評価を行い、トランスレーショナルリサーチの一環として臨床診断治療への応用

展開をはかることを目的として遂行された。

B. 研究方法

実質臓器や組織の微小循環レベルにおける血流動態や個々の血球細胞の挙動を可視化するには種々の蛍光標識プローブを利用するのが有効である。組織微小血管内の血行動態を可視化解析するために、FITC-dextran (励起波長 488nm、蛍光波長 520nm) 20mg/ml を iv 投与し、血漿成分の流動現象を可視化して、全血血流動態の定量化を行った。また、赤血球の流速を測定するために、予め、循環赤血球の約 5% を採血し、これを体外で蛍光プローブ FITC (励起波長 488nm、蛍光波長 520nm) で ex-vivo 標識した後、返血し、顕微鏡下で微小血管を流れる個々の蛍光標識赤血球の流動現象を可視化した。白血球の可視化にはアクリジンオレンジ (励起波長 430nm、蛍光波長 530nm) 0.5mg/kg を iv 投与し体内染色するか、ローダミン 6 G (励起波長 514nm、蛍光波長 590nm) 50 μ g/ml で ex-vivo 標識して、微小血管内の白血球のローリングや粘着数を可視化計測した。一方、血小板の可視化には CFSE (励起波長 494nm、蛍光波長 520nm) かローダミン 6 G を iv 投与・体内染色するか、CFDASE で ex-vivo 標識して、微小血管内の流動、血小板血栓生成動態を可視化評価した。これら血球細胞の挙動や血流動態の可視化解析には、高感度高速度 CCD ビデオイメージングシステム (Nippon Roper CR imge2000、浜松ホトニクス SIT) を、血球細胞の速度計測には画像相関法を用いて行った。FITC 標識赤血球の流速計測と同時に光励起した Pd ポルフィリンからの燐光寿命より酸素分圧を計測する技術 (蛍光・燐光ナノプローブを用いたフォトニック・イメージング解析法による臓器微小血管内の血流速度・酸素分圧同時計測法) を開発し利用した。予め、対象動物に Pd ポルフィリンを iv 投与し、対象となる微小血管に励起パルス光 (Nd : YAG laser SH、波長

532nm) を照射する。酸素濃度に依存して発光する燐光を 620nm のロングパスフィルタを介してフォトマルで光電変換し、AD 変換後にパソコンで波形処理して、燐光寿命 τ より次の Stern-Volmer 式に基づいて酸素分圧 pO_2 を求めた。

$$\tau_0 / \tau = 1 + K \tau_0 pO_2$$

ここで τ_0 、 τ はそれぞれ酸素分圧が 0 および pO_2 mmHg のときの燐光寿命、 K は Stern-Volmer 定数である。図 1 は多波長励起フォトニックイメージングシステムの概要を示す図である。これらの実験ではラットやマウスの *in-vivo* 実験系でなされた。ラット・マウスを対象にした血栓形成モデルの構築にはポルフィリン系光感受性物質と特定波長励起光の相互作用に基づく光化学反応を利用し、活性酸素産生、サイトカイン産生、酵素作用を解析した。

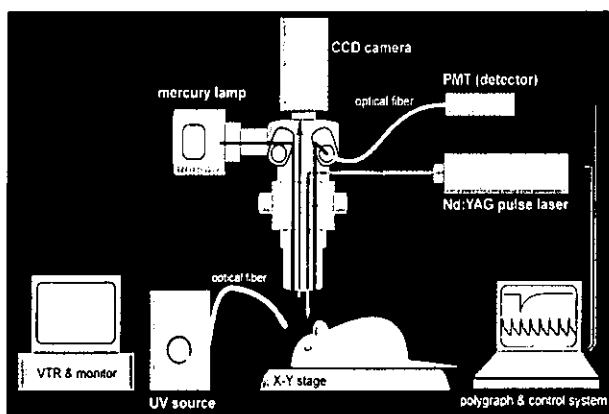


図 1 多波長励起フォトニックイメージングシステム

図 2 は、病態モデルラット脳表の微小循環障害を長時間生理的に観測するために作成した直径約 4 mm の closed cranial window であり、window 内は人工髄液 (Na^+ 147.8 mEq/L, K^+ 3.0 mEq/L, Mg^{2+} 2.3 mEq/L, Ca^{2+} 2.3 mEq/L, Cl^- 135.2 mEq/L, HCO_3^- 19.6 mEq/L, lactate 1.7 mEq/L, phosphate 1.1 mM, and glucose 3.9 mM) を灌流している。Window は円形カバーガラスでラバーリングを覆い密閉してあり、生理状態

が保たれる。図3は closed cranial window 内で観測されたラット脳表の微小血管系の構造を示している。

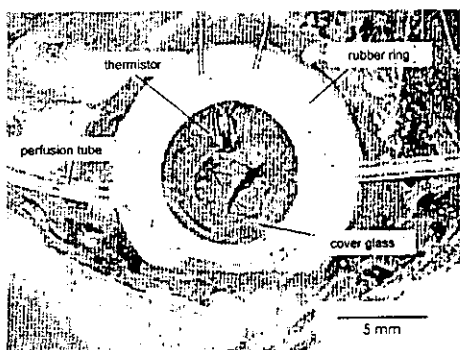


図2 左頭頂骨に作成した closed cranial window



図3 window 内で観察される微小血管構造

図4は、病態モデルマウスの微小循環障害を慢性的に観測するために作成された dorsal skin fold chamber であり、図5に示すようにマウス背部皮内の微小血管系の構造がよくわかる。

一方、血管障害や血栓形成に関わる血管内皮細胞 (HUVEC) と血小板・白血球の相互作用を検討するために、培養細胞を用いた *in-vitro* 系において各種蛍光プローブを用いて細胞骨格形態の動的変化・細胞内分子機能変化の可視化解析および活性酸素種の同定と定量化を蛍光生体顕微鏡やリアルタイム共焦点走査型レーザー顕微鏡を用いて行った。また、Apoptosis を含む細胞機能や分子機能の分析にフローサイトメトリー、ウェスタンブロット法などの分析法も利用した。

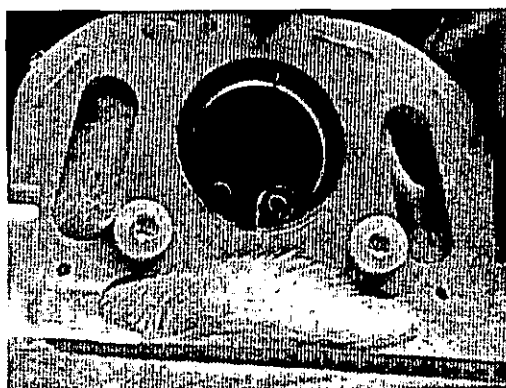


図4 マウス背部の dorsal skin fold chamber

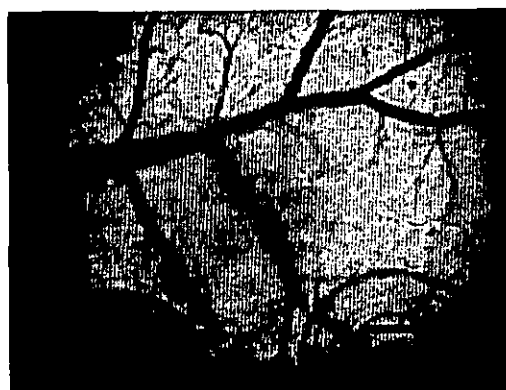


図5 dorsal skin fold chamber 内で観察された腫瘍組織の微小血管構造

C. 研究結果

微小循環障害・血栓形成に基づく血流停止・血管閉塞あるいは虚血応答をラットの腸間膜・肝臓・脳表層微小血管を対象に可視化解析した。図6は Wistar 系雄性ラットの closed cranial window 内で観測された脳表微小血管内の FITC 標識赤血球の流動状態を可視化したものである。図7はこの微小血管中央部の血流速度を画像相関法で計測した結果と酸素分圧を上記の燐光寿命法で同時計測した結果である。脱血によって急性的な脳虚血を起こさせ、短時間で返血・再灌流した結果であるが、短時間の措置であるがゆえに脳内血管の血流と酸素分圧は前値に復帰していることがよくわかる。

一方、後頁に示した図8は脳虚血・4時間後の再灌流時に脳表層微小血管中を流動する白

血球が血管内皮上に粘着するとともに血小板が接着し小凝集塊となり、流れによって剥離する様子を捕らえた映像である。虚血・再灌流後の血管内皮と白血球および血小板間の分子相互作用によりこれら血球細胞の粘着と血栓形成が顕著に亢進することがよくわかる。

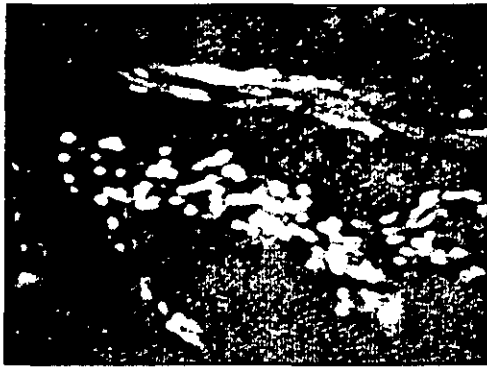


図6 Closed cranial window 内で観測されたラット脳表層微小血管内の FITC 標識赤血球の流動状態

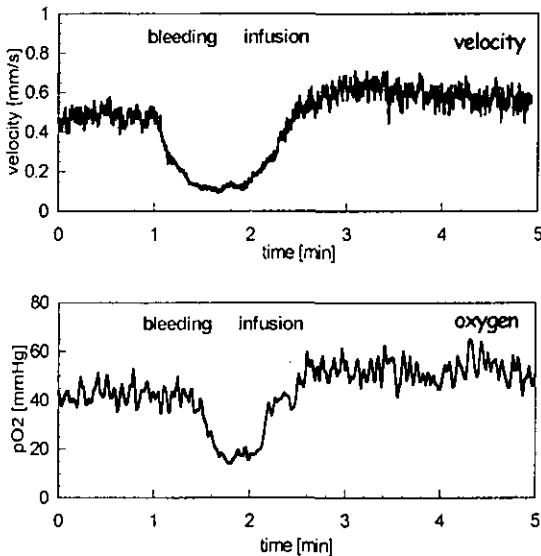


図7 急性虚血・再灌流における脳表層細静脈の血流速度と血中酸素分圧の経時変化

図9は、ラット脳表層における直径の異なる微小血管（細動脈）内酸素分圧と周辺組織の酸素分圧を計測した結果である。径が細くなるにつれて血中酸素分圧は低下しており、また血管外の組織中の酸素分圧は血管からの距離が隔たるとにしがい指数関数状の勾配をもって低

下していく。血管が閉塞して血流が低下すると虚血状態となり、血中ならびに組織中の酸素分圧は 10mmHg 以下に低下して極めて重篤な状態に陥る。

oxygen tension [mmHg]

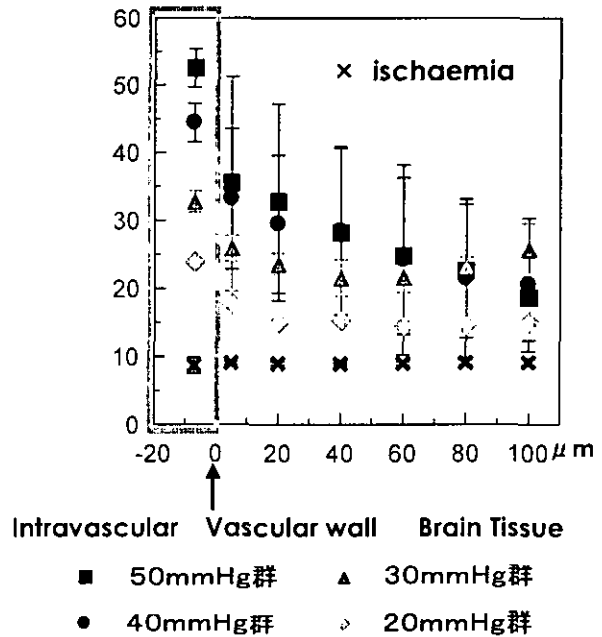


図9 脳表層微小血管および周辺組織内の酸素分圧：微小血管の大きさによって酸素分圧は異なるが、組織内の酸素分圧は距離が隔たるとにしがい低下する。虚血状態の微小血管・周辺組織ともに酸素分圧は大幅に低下する。

oxygen tension [mmHg]

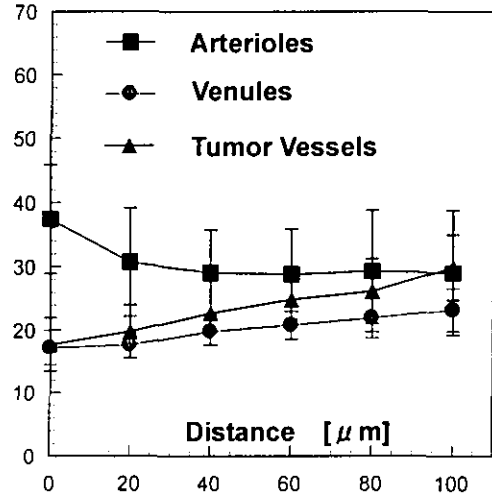


図10 マウス背部微小血管と周辺組織内の酸素分圧（腫瘍血管と正常血管では状態が異なる）

これに対して、図5に示したような腫瘍新生血管内の血流速度ならびに酸素分圧の様相はかなり異なる。図10~11は、マウス背部皮膚に乳癌細胞MT060562を埋め込み増殖させ、それに伴って構築された新生血管内の血流動態と酸素代謝の状態を示したものである。腫瘍微小血管は管径が細く複雑な形態を示し、血管内皮が脆弱で血流速度は低い。図11からわかるように腫瘍血管の血流は細静脈と同等の低流速で流れており、酸素分圧も極めて低い低酸素状態にあるといえる。相対的にみて正常な細静脈の酸素分圧は細動脈系の50%以下であり、また腫瘍血管では周辺組織で酸素消費が高いため正常細静脈系よりさらに低い酸素状態にあることがわかる。

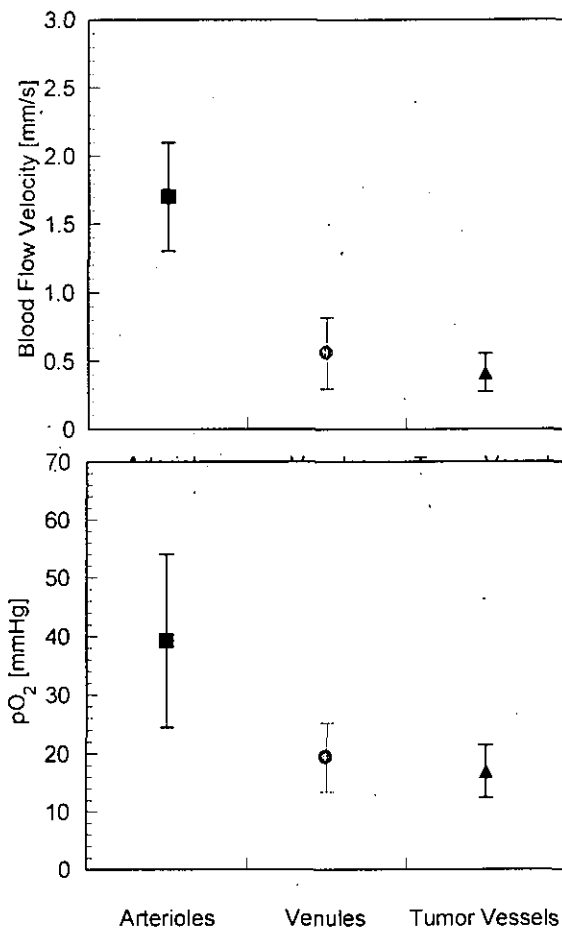


図11 正常組織の細動脈、細静脈ならびに腫瘍組織微小血管の血流速度と酸素分圧（腫瘍血管では低流速、低酸素分圧である）。

光化学反応は、光感受性物質の光励起によって産生される活性酸素が主体となって細胞傷害や血行障害を誘起させるものであり、apoptosis、necrosisの重要因子となるが、本研究では活性酸素産生、すなわち酸化ストレスに基づく血管内皮への白血球粘着と血小板膠着、さらさらにその発展系としての血小板血栓生成に関わる効果をラット腸間膜と脳表層微小血管で観測した。また活性酸素種の同定を活性酸素消去剤のスカベンジャ作用によって評価した。図12はラット腸間膜内の血流と血栓・塞栓イメージおよび脳微小血管中の蛍光標識した血小板血栓形成過程の可視化イメージである。いずれも左側は酸化ストレス付加前の血流状態、右側は酸化ストレス付加後の血流状態で完全に血管が閉塞して血流は遮断されている（Vascular shut down:VSD）。

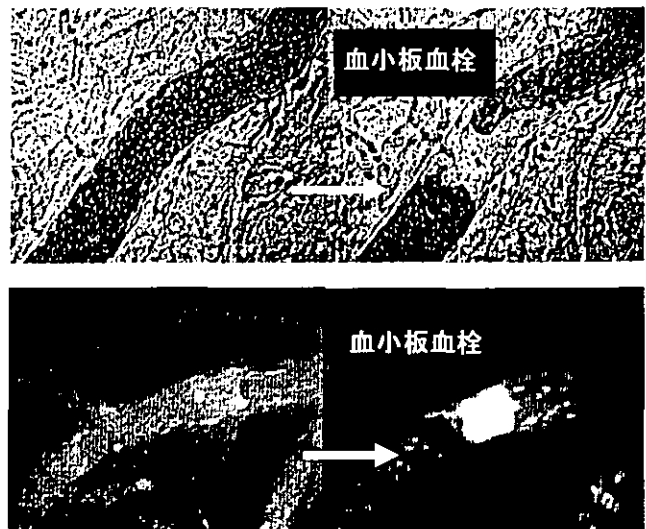


図12 光化学反応による活性酸素産生（酸化ストレス）に基づく血栓形成の可視化イメージ：上段はラット腸間膜微小血管、下段はラット脳表層微小血管（蛍光色素で血小板を体内染色）

図13はラット腸間膜上の腫瘍組織内の微小血管と正常微小血管に対して光化学反応に基づく酸化ストレス付加を行ったときの血小板粘着・血栓開始時間と完全閉塞・血流遮断時間を比較したものである。腫瘍血管では血流速度の

低下（低ずり速度）も顕著であり、血栓開始時間および血流遮断時間は極端に短くなることが明らかであり、光化学治療（PDT）における血流遮断効果の高さとその有効性が認められる。この状態で白血球の動態（ローリングと粘着）を調べたところ、図 14 に示すように腫瘍血管において PDT を施行することにより血管内皮障害にともなう白血球のローリング数と粘着数が control に比べて顕著に増加している。微小血管の血栓形成過程における血小板粘着開始と血管閉塞・血流遮断時間に対する活性酸素の関与をスカベンジャを用いて調べたところ、一重項酸素とスーパーオキシドアニオンの関与が大であることが明らかとなった。

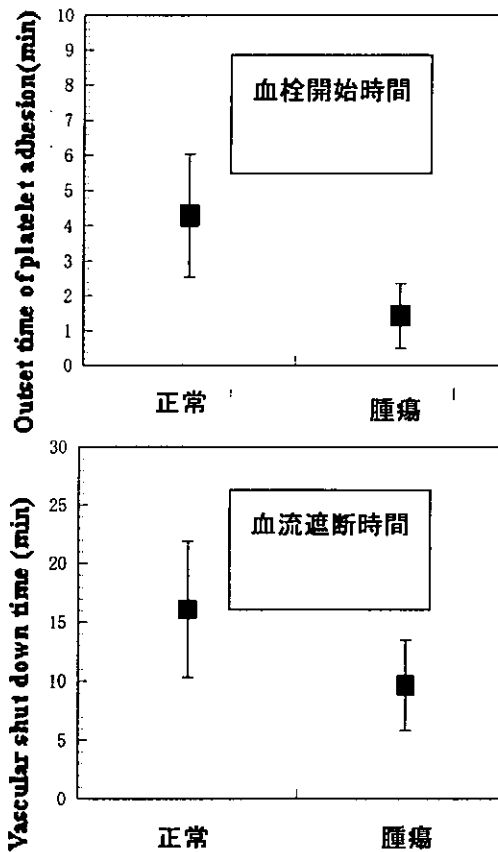


図 13 光化学反応に基づく酸化ストレス付加時のラット腸間膜・腫瘍組織内微小血管と正常微小血管における血小板粘着・血栓開始時間と完全閉塞・血流遮断時間の比較。

巻末に示した図 8 に見られるように、脳虚血・4 時間後の再灌流時にも脳表層微小血管中を流動する白血球が血管内皮上に粘着するとともに血小板が接着し小凝集塊となり、流れによって剥離して flying thrombus となる。これは前術のように虚血・再灌流後の酸化ストレスが関与して、血管内皮と白血球および血小板間の分子相互作用によりこれら血球細胞の粘着と血栓形成が顕著に亢進すると考えられる。

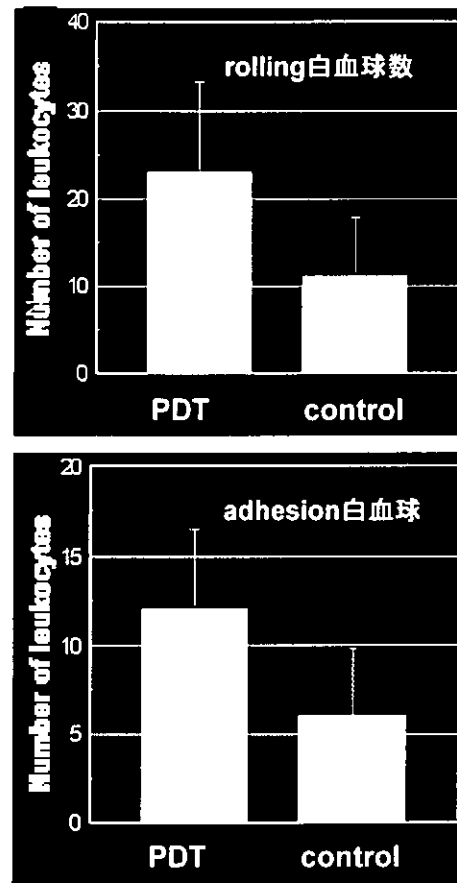


図 14 ラット腸間膜微小血管内のローリング白血球数と粘着白血球数の比較：PDT 試行により両者とも顕著に増加する。

このような血栓形成・血流遮断は、とくに糖尿病において顕著な速さで起こるが、糖尿病における易血栓性の亢進は大きな問題であり、いわゆる細小血管障害の生起頻度の高まりが明らかとなった。この光化学反応による急性血栓モデルにおいて、赤血球速度、血小板粘着開始時間、血流遮断時間、接着白血球数などを計測



図9 虚血・再灌流後の脳表層微小血管中の白血球(赤:ローダミン6G)と血小板(緑:CFSE)動態. 多くの白血球の粘着と血小板凝集塊の接着・剥離が観測される.

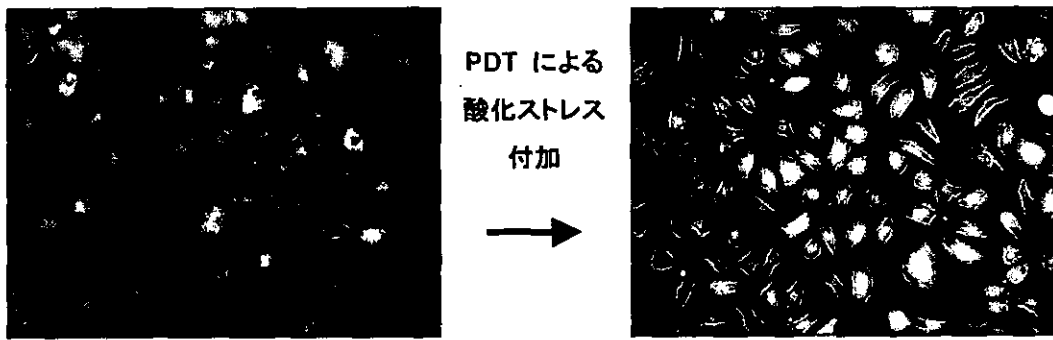


図15 PDT・酸化ストレスによる培養血管内皮細胞 (HUVEC) の顕著な短縮・形態変化

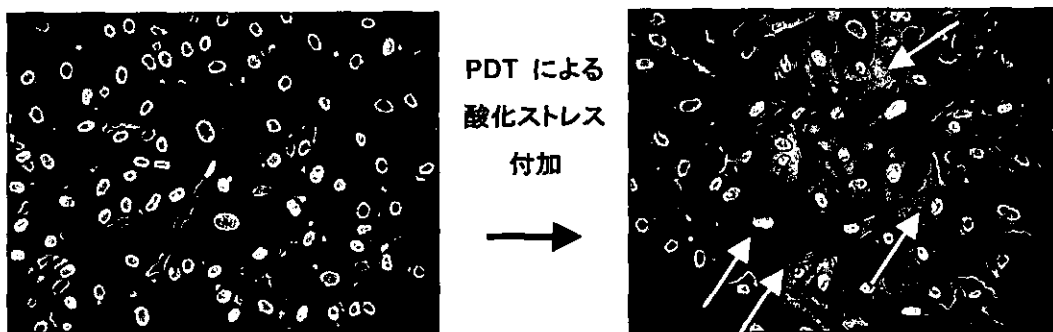


図16 PDT・酸化ストレスによる培養血管内皮細胞 (HUVEC) 内のF-アクチンの重合促進

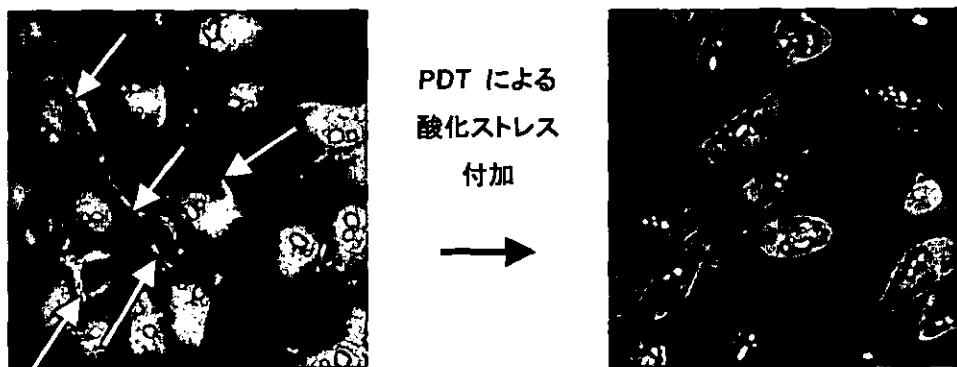


図17 PDT・酸化ストレスによる培養血管内皮細胞 (HUVEC) 間接着タンパク・タイトジャンクションの消失

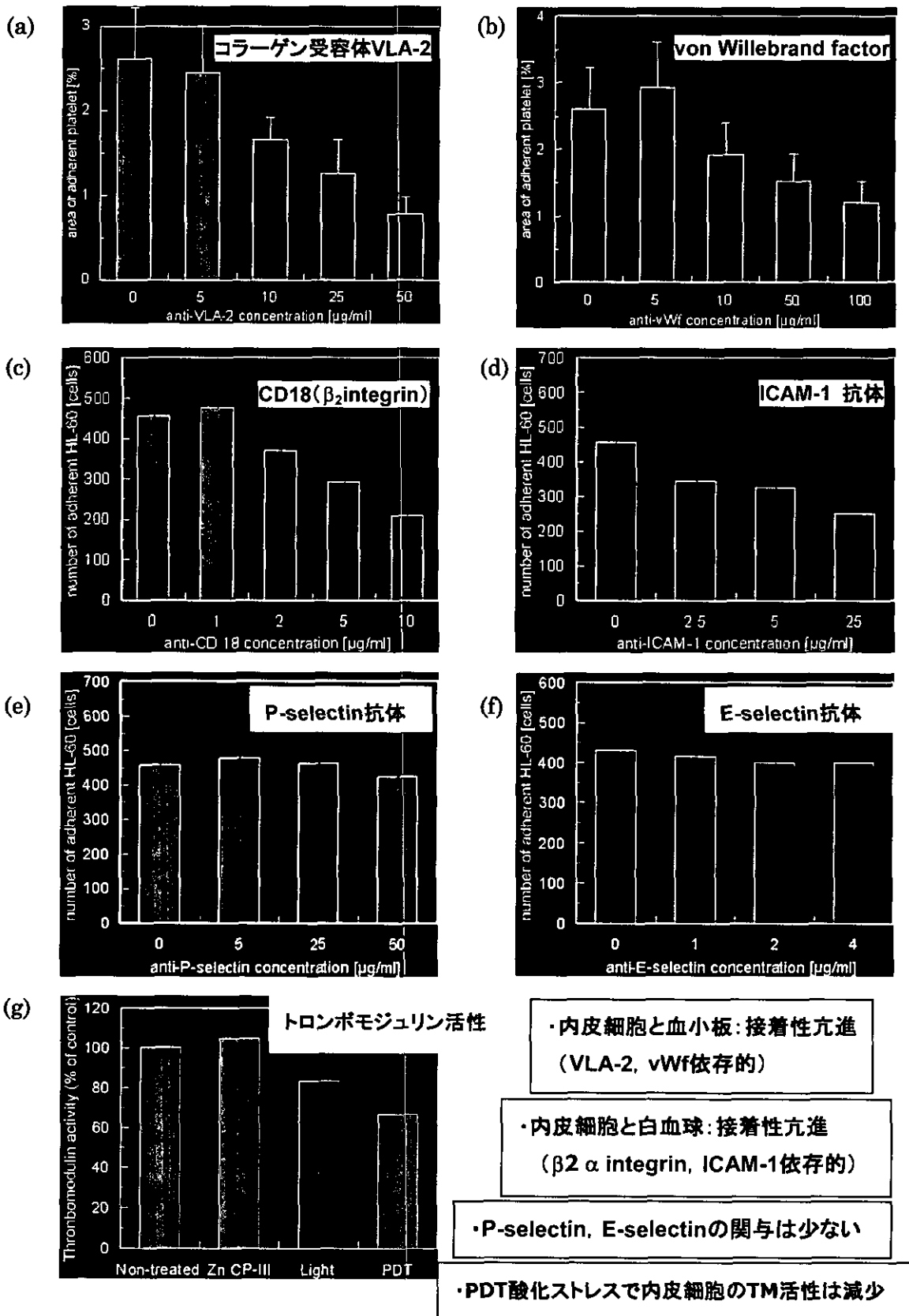


図 18 培養血管内皮細胞 (HUVEC) への血小板と白血球の接着性亢進を接着性抑制因子や抗体を使って調べた結果, PDT 酸化ストレスで血小板と白血球の接着性は亢進.

し、健常状態と比較検討した結果、活性酸素産生に基づく活性化白血球・血小板及び内皮細胞の相互作用により内皮傷害、血小板膜破壊・脱顆粒・作用物質放出が促進され、カスケード的に血小板粘着能の亢進、凝固系の促進、血栓成長、血管閉塞に至る過程が確認された。糖尿病では赤血球の変形能の低下や赤血球膜の硬化が認められるので、血管内皮への傷害も増加するものと考えられる。

一方、血管障害や血栓形成に関わる血管内皮細胞 (HUVEC) と血小板・白血球の相互作用を検討するために、培養細胞を用いた *in-vitro* 系において各種蛍光プローブを用いて細胞骨格形態の動的変化・細胞内分子機能変化の可視化解析をした。まず、Calcein-AM (励起 300nm、蛍光 510nm) 染色した内皮細胞の形態変化を観測した結果、図 15 に見られるように、光化学反応の活性酸素産生により細胞短縮が起こり、内皮下基質の露出が顕著に増加することを確認した。また、図 16 に見られるように蛍光プローブ Rhodamine-phalloidin (励起 554nm、蛍光 573nm) で染色したアクチンフィラメントの可視化により、光化学反応後に球状タンパク質の G アクチンから線維状の細胞骨格 F アクチンへの重合が認められ、細胞の形態変化・短縮化・細胞先端部の増強に作用しているものと考えられた。図中、細胞中央部の明るく見える部分は DAPI (励起 358nm、蛍光 461nm) で染色した細胞の核を示している。図 17 は上記と同様に光化学反応の活性酸素産生による細胞接着を司っている tight junction の構成タンパク質 ZO-1 を免疫蛍光染色したイメージである。光化学反応前には細胞間に ZO-1 の線維状の確認されるが、光化学反応後にはタイトジャンクションの喪失、内皮下の露出が認められ、内皮細胞の短縮とともに細胞間隙が広がり内皮下露出が顕著となる。以上のように、光化学反応の活性酸素産生による培養血管内皮細胞の形態変化は、短時間のうちに顕著に起こり、内

皮下組織の露出部分に血小板の粘着凝集や白血球の接着が容易に起こり、これら血球細胞の接着性の亢進が顕著となることが明らかとなった。また、*in vivo* 実験でも白血球 (好中球や単球) のローリングと接着が加速度的に誘起されるを確かめている。これら血管内皮細胞と血小板および白血球の粘着凝集に関して抗体を用いた接着阻害実験を試みた結果、光化学反応による急性血栓生成モデルでは、接着因子の P セレクチンと E セレクチンの関与は少ないものの、図 18 (a)~(g) に見られるように内皮細胞のトロンボモジュリン活性の減少、内皮と血小板間での接着性亢進において VLA-2、v WF の活性化が認められ、内皮と白血球間での接着性亢進において $\beta 2$ インテグリン、ICAM-1 の活性化が認められ、また CD18、CD69、CD11a の活性化による血栓生成亢進が認められた。

D. 考察

脳虚血は脳血管障害のみならず心肺蘇生時や外傷時などにもみられる病態であり、脳神経細胞は虚血侵襲に極めて脆弱である。その病態・薬理作用や再灌流時の細胞・組織の機能解析を行うには、微小循環の血流動態と酸素代謝また細胞内ミトコンドリアのエネルギー代謝過程で使用される NADH 変化による虚血指標を時空間的に捉えることが極めて重要であり、本研究の多波長マルチフォトリックイメージングシステムはその要望に十分に応えるものである。また、*in-vivo* 実験において虚血・再灌流時の白血球と血小板の血流動態を可視化可能にしたことは、この関連研究に大きな手段を提供したことで意義深い。脳をはじめ各種実質臓器の微小循環系を対象とした本研究において、血流速度や血管径、酸素濃度はそれぞれ異なる物理量であるが、従来、これら複数のパラメータを同一個体で計測する場合、それぞれ独立した計測装置を使用することになり、計測系が複雑化した原因である。本研究で開発した

マルチフォトリックイメージングシステムは、血流動態計測は光励起した FITC から発する蛍光から、酸素分圧計測では光励起した Pd-TCPP から定量化することができ、その他の分子生理機能に対しても異なるナノプローブと励起光源を使ってマルチカラーイメージングが可能となった。全てのパラメータの計測に光励起による発光現象を利用することに着目し、異なる波長の励起光源を利用した光学系をシステムアップすることで双方の情報を連続的かつ簡便に取得可能としたことは本研究の大きな成果である。

一方、光化学反応の活性酸素産生による血栓生成については、活性酸素産生、血小板 LDH 放出誘発(血小板そのものの凝集作用は抑制)、内皮細胞 F アクチン重合・細胞骨格変化、tight junction 消失、細胞質の収縮、血管内皮基底膜の露出、基底膜コラーゲンからの血小板コラーゲン受容体を介する血小板活性化、フィブリノーゲンレセプター GP II b/III a の活性化、vWF レセプター GP I b の活性化、vWF を介する接着、また白血球の活性化による二次的な活性酸素の産生、内皮基底膜の露出促進、白血球の接着性亢進、血小板の粘着亢進などが相乗的に起こる。糖尿病では非酵素的糖化反応により GP I b、GP II b/III a の増加が顕著となり、易血栓性を示すと考えられる。微小循環障害については、上記活性酸素以外の ROS や種々の活性化因子の関与についても検討する必要がある。

E. 結論

本研究では、血管炎や微小循環障害によって誘発される種々の組織傷害や細胞傷害のメカニズムを分子・細胞レベルで解析・診断するために各種蛍光・燐光標識ナノプローブと高感度イメージング技術を開発し、これらを用いて傷害の発現メカニズムと傷害からの再生・治癒過程に関する分子機序を局所的に解析した。腸間膜・肝臓・脳を対象に微小血管内の血流動態を

可視化解析し、赤血球速度・変形能、血小板粘着・血栓形成過程、白血球粘着能などの動的変化を明らかにするとともに、糖尿病微小循環障害や脳虚血などの病態把握と治療効果の評価を行った。また、培養細胞系を用いて細胞内の分子機能をイメージング解析し新しい知見を得るとともに、使用したナノプローブやイメージング技術の有効性を検証した。

最後に本研究課題に携わった分担研究者の研究成果を含めて総括する。

(1)超極限分子プローブの開発：生体親和性を高めたナノプローブの開発を継続し、実用化に近づけた。蛍光蛋白は、Cy3 で標識した GFP やプロリン変異体 GFP を基質蛋白質の運動マーカーや遺伝子発現マーカーとして、GFP 変異体 ECFP と EYFP の FRET を Apoptosis における細胞内チロシンリン酸化やカスパーゼ活性の解析に活用した。また、カチオン性リポソーム付加・蛍光標識モノクローナル抗体の生細胞導入技術を確立し、生存維持活性をもつアゴニスト抗体および神経細胞の活性酸素傷害・細胞死のイメージングに活用した。さらに蛍光標識したミクログリアの網膜・脳神経浸潤と傷害細胞死抑制効果のマーカーとしての可能性を検討した。量子ドットは Cd-Se ナノ粒子をホットソープ法で合成し、有機酸、シロキ酸、アミンなどで表面加工、その官能基により核酸、蛋白、オリゴペプチドに tagging させ、Vero 細胞およびリンパ T 細胞のエンドソームマーカーとして活用した。磁気微粒子についてはヘマトイトを内包するリポソームを作製し、膜透過性・エレクトロパーミエーションや分子キャリアとしての可能性を検討した。また、数種の蛍光・燐光分子プローブを生体組織・細胞中に局所投与して、種々の細胞・組織内の分子生理機能をナノレベルで可視化解析することに成功した。

(2)高感度マルチフォトリックイメージング技術の開発：ナノプローブの細胞・組織内の局在性・機能性を可視化し、細胞機能・組織障害を

解析診断するマルチフォトニックイメージングシステムおよび高速度高感度イメージングシステムの新規開発・改良を行った。これにより、脳や肝臓など実質臓器の血行動態・酸素代謝・活性酸素産生のフォトニックイメージング解析を可能にした。また、多波長マルチカラーイメージングにより肝細胞や心筋細胞のCa動態、Caspase活性、ミトコンドリア膜電位変化の同時可視化に成功した。一方、密着型フラッシュ軟X線顕微鏡と密着型紫外線顕微鏡の新規開発により血球細胞や神経細胞など生細胞の炭素密度イメージングや癌治療に関わる重粒子線の細胞内粒子飛翔マッピングを高精度で行えることを明らかにした。NMRアナライザの活用では、X線結晶構造解析と併せて細胞分化、分裂、DNA複製・修復に関わる蛋白質の機能解析を行い、多くの蛋白質の立体構造を決定した。

(3)細胞・組織の分子生理機能の解析評価：

(3.1) 実質臓器、とくに脳の虚血・再灌流における血流動態と酸素代謝を同時計測するとともに活性酸素の組織傷害機構の解析を行う目的で、多波長励起マルチフォトニックイメージングシステムを開発し、ex-vivo-FITC標識赤血球とPdポルフィリン酸素感受性プローブの蛍光・燐光観測、及び細胞内ミトコンドリアのエネルギー代謝過程で使用されるNADHの紫外吸光観測により、脳表層組織の虚血・再灌流、麻酔下呼吸管理時の血流変動・酸素代謝変化の定量化に成功した。また、脳虚血・再灌流時のex-vivo-蛍光標識白血球と血小板の粘着過程や蛍光標識ミクログリアの脳神経細胞浸潤過程の可視化解析に成功した。

(3.2) 糖尿病微小循環における血行動態・血球細胞の振る舞いをフォトニックイメージングシステムを用いて評価した。糖尿病では活性酸素産生の亢進、血管内皮傷害、血小板膜破壊・脱顆粒・作用物質の放出促進、これに続いてカスケード的に血小板粘着能の亢進、凝固系の促

進、血栓成長、血管閉塞へ至る活性化メカニズムが働くことを示した。また、各種抗血栓薬を用いて、酵素作用、血栓促進・抑制因子、粘着・凝固因子の関与を解析し、血栓抑制に関わる薬理効果を検証した。

(3.3) 腎炎モデルマウスとCD69欠損ノックアウトマウスを用いて自己免疫疾患に基づく難治性血管炎に関わる好中球活性化や好中球自己抗体(ANCA)の働きを血流in-vivoイメージングにより解析した。前者では顕著な血流速度の低下、血流停止・逆流、血管内皮への白血球粘着、血管閉塞が、後者では血管閉塞の遅延が観測され、MPOの関与から特に好中球が炎症において重要な役割を担っているものと考えられた。さらに好中球による血管内皮傷害時のapoptosis signal伝達過程におけるp38MAPK(p38)とCaspase8の活性化を検討した結果、TNF α 、IL-1 β によりMAPK-p38が最も燐酸化され、Caspase8の18kDaの活性化型(c-Cas8)が生成されていることを確認した。血管内皮細胞傷害が活性化好中球を介して生起し、血管内皮細胞内では、IL-1 β 等の受容体を介しp38の燐酸化やCaspase8の活性化が起こり、apoptosis誘導されている可能性が示唆された。白血球による内皮細胞障害時に特異的に発現する分子のmRNAをイメージングするプローブ、およびCaspaseを特異的にイメージングするプローブ開発を行った。

(3.4) ポルフィリン誘導体の光化学反応による活性酸素産生に基づく血栓形成とapoptosis発現のメカニズムを検討した。その過程において内皮細胞の細胞骨格F-actinの重合、細胞接着を司るtight junctionの喪失、細胞短縮、内皮下露出が顕著に増加、さらに血小板および好中球の内皮細胞接着性が有意に増加し血栓形成が促進されることを明らかにした。また、抗体を用いた血栓形成阻害実験では、Pセレクトリン、Eセレクトリンの関与は少なく、 β_2 インテグリン(CD18)、ICAM-1、CD11aの関与が認められ、

血小板の VLA-2、内皮細胞の vWF の関与も強く認められた。一方、細胞の apoptosis 誘導経路について分子シグナル伝達の探索を行い、Ca イオンの細胞内流入、Caspase 系列の活性化、ミトコンドリア膜電位の上昇を確認、DNA 傷害を各種蛍光プローブのイメージングによって明らかにした。また、マウス dorsal skinfold chamber 法により新生血管の増殖過程と血流動態を観測し、その特異性を検討した。活性酸素産生に伴う腫瘍新生血管の血流遮断ならびに腫瘍細胞死の過程を核 DNA 断片化、ミトコンドリア酸化還元応答、Ca 動態、Caspase 活性についてナノプローブ・イメージングによって検討した。以上が平成 15 年度の研究成果の総括である。

F. 健康危険情報

特になし。

G. 研究発表

G-1 論文発表

- 1) Nagao T., Takahashi M., Matsuzaki K., Minamitani H.: Application of bioimaging techniques to mechanistic studies on photodynamic therapy, *Bioimages*, 11(29), pp53-60, 2003.
- 2) Minamitani H., Tsukada K., Sekizuka E. and Oshio C.: Imaging and functional analysis of blood flow in organic microcirculation, *Journal of Pharmacological Science*, 93(3), pp.227-233, 2003.
- 3) Minamitani H.: Functional analysis of microcirculation disorder by using nano-molecular probes and bioimaging technique, *Microcirculation Annual*, 19, pp27-28, 2003
- 4) Arai T., Tsukada K., Sekizuka E., Oshio C., Terao S., Hase K., Minamitani H.: RBC flow imaging and pO₂ measurement in cerebral microcirculation: Effect of hemodilution on oxygen supply to brain cortical arterioles, *Proc. IEEE EMBC 2003*, pp1054-1057, 2003
- 5) Tsukada K., Sekizuka E., Oshio C., Tsujioka K., Minamitani H.: Red blood cell velocity and oxygen tension measurement in cerebral microvessels by double-wavelength photoexcitation, *Journal of Applied Physiology*, in press.
- 6) Tsukada K., Sakai S., Hase K. and Minamitani H.: Development of catheter-type optical oxygen sensor and applications to bioinstrumentation, *Biosensors and Bioelectronics*, 18(12), pp 1439-1445, 2003.
- 7) 塚田孝祐, 緒方嘉貴, 辻岡克彦, 南谷晴之: 人工酸素運搬体 Neo Red Cell 交換輸血時の脳微小循環動態および酸素分圧計測, 脳循環代謝, vol. 15(4), pp. 196-197, 2003
- 8) Takahashi M., Nagao T., Imazeki Y., Matsuzaki K., Minamitani H.: Roles of reactive oxygen species in monocyte activation induced by photochemical reactions during photodynamic therapy, *Frontiers Med. Biol. Engng.*, 11(4), pp279-294, 2002

G-2 学会発表

- 1) 関塚永一、大塩力、南谷晴之: 糖尿病性血管障害のイメージング診断と治療への応用、日本バイオイメーjing学会公開シンポジウム「バイオイメーjingとナノテクノロジー」要旨集、pp74-75、2003-2 (東京)
- 2) 南谷晴之: 超極限分子プローブによる組織障害の再生治癒機構の解析と高精度局所診断技術の開発、日本バイオイメーjing学会公開シンポジウム「バイオイメーjingとナノテクノロジー」要旨集、pp76-77、2003-2 (東京)
- 3) 高橋未帆、渋谷典子、松崎和喜、長尾朋和、

- 南谷晴之：光化学反応による内皮細胞の細胞骨格変化および抗血栓機能障害、第 42 回日本エム・イー学会大会，pp204、2003-6（札幌）
- 4) 守屋智子、松崎和喜、高橋未帆、長尾朋和、南谷晴之：光化学反応によるアポトーシス誘導過程における Ca^{2+} と Fas 機能の解析、第 42 回日本エム・イー学会大会，pp205、2003-6（札幌）
 - 5) 塚田孝祐、畑野瑞恵、山根正信、南谷晴之、辻岡克彦：脳虚血における微小循環血流と酸素代謝の非接触連続計測法、第 42 回日本エム・イー学会大会，pp289、2003-6（札幌）
 - 6) 中橋浩康、関塚永一、大塩力、小澤正、広瀬耕徳、南谷晴之：レーザ散乱粒子計測に基づく糖尿病血小板凝集能の測定、第 42 回日本エム・イー学会大会，pp291、2003-6（札幌）
 - 7) 南谷晴之、塚田孝祐、関塚永一、大塩力：臓器血流と酸素代謝の光・イメージング解析、公開シンポジウム「ナノとバイオの融合 学理構築、産業基盤形成」，pp91-96、2003-9（仙台）
 - 8) 塚田孝祐、南谷晴之、辻岡克彦：脳皮質酸素代謝の可視化解析、一軟膜微小循環血流と局所酸素分圧および NADH 蛍光計測からの検討一、第 18 回生体・生理工学シンポジウム，pp381-382、2003-10（新潟）
 - 9) 塚田孝祐、南谷晴之、辻岡克彦：蛍光と燐光を利用した脳微小循環血流と酸素代謝の可視化解析、第 17 回日本エム・イー学会秋季大会専門別研究会，pp95、2003-10（京都）
 - 10) 関塚永一、中橋浩康、広瀬耕徳、後閑治彦、南谷晴之、大塩力：目で見る血液の流れ一血液はさらさらと流れるだろうか一糖尿病における血管障害メカニズム、日本バイオイメージング学会公開シンポジウム「ナノバイオロジーをイメージングする」要旨集，ppS3-S6、2003-10（横浜）
 - 11) 塚田孝祐、関塚永一、大塩力、南谷晴之、辻岡克彦：軟膜微小循環血流と局所酸素分圧および NADH 蛍光計測による脳皮質酸素代謝の可視化解析、第 12 回日本バイオイメージング学会学術集会，pp217-218、2003-10（横浜）
 - 12) 渋谷典子、高橋未帆、松崎和喜、長尾朋和、南谷晴之：光化学反応による血栓形成過程における白血球と内皮細胞の相互作用、第 12 回日本バイオイメージング学会学術集会，pp253-254、2003-10（横浜）
 - 13) 寺尾聰、関塚永一、石川真実、山口則之、南谷晴之、河瀬武：異なる蛍光色素により色分け標識した血小板と白血球の観察一 mouse cranial window と 3 CCD カメラ装着生体顕微鏡を用いて一、第 12 回日本バイオイメージング学会学術集会，pp257-258、2003-10（横浜）
 - 14) 新井達也、高橋亮太、塚田孝祐、石川真実、関塚永一、大塩力、南谷晴之：血液希釈による脳血流増加の酸素供給に与える影響、第 12 回日本バイオイメージング学会学術集会，pp261-262、2003-10（横浜）
 - 15) 広瀬耕徳、関塚永一、大塩力、中橋浩康、後閑治彦、南谷晴之：光化学反応を用いた糖尿病における易血栓形成性の検討、第 12 回日本バイオイメージング学会学術集会，pp263-264、2003-10（横浜）
 - 16) 後閑治彦、関塚永一、大塩力、中橋浩康、広瀬耕徳、南谷晴之：糖尿病状態下における血管内皮細胞と血小板との相互作用の検討、第 12 回日本バイオイメージング学会学術集会，pp265-266、2003-10（横浜）
 - 17) 長尾朋和、長谷川明洋、越尾修、馬淵綾子、南谷晴之、中山俊憲、鈴木和男：活性酸素

- 誘導の血小板血栓形成における CD69 の役割、第 12 回日本バイオイメーjing学会学術集会, pp291-292, 2003-10 (横浜)
- 18) 守屋智子、松崎和喜、高橋未帆、長尾朋和、南谷晴之：光化学反応による Ca^{2+} 濃度変化とアポトーシス誘導のイメージング解析、第 12 回日本バイオイメーjing学会学術集会, pp303-304, 2003-10 (横浜)
- 19) 関塚永一、中楯浩康、広瀬耕徳、後閑治彦、南谷晴之、大塩力：血液の流れから見る糖尿病における血管障害メカニズム、第 10 回日本ヘモレオロジー学会, pp16-18, 2003-11 (神戸)
- 20) 中楯浩康、関塚永一、大塩力、広瀬耕徳、後閑治彦、南谷晴之：糖尿病状態下における AGE と活性酸素の血小板粘着への影響、第 10 回日本ヘモレオロジー学会, pp51, 2003-11 (神戸)
- 21) 広瀬耕徳、関塚永一、大塩力、中楯浩康、後閑治彦、南谷晴之：糖尿病における血小板 GPⅡb/Ⅲa 活性についての検討、第 10 回日本ヘモレオロジー学会, pp52, 2003-11 (神戸)
- 22) 後閑治彦、関塚永一、大塩力、中楯浩康、広瀬耕徳、南谷晴之：糖尿病における血小板凝集能亢進に対する BPS の抑制効果、第 10 回日本ヘモレオロジー学会, pp53, 2003-11 (神戸)
- 23) Minamitani H.: Optical fiber sensor based on phosphorescence quenching for measurement of blood oxygen pressure and fluorescence detection of blood flow, *Sensors Conference 2003*, pp138-139, 2003-11 (Taegu, Korea)
- 24) 南谷晴之、塚田孝祐、関塚永一、大塩力：マルチフォトニックイメージングによる組織微小循環の機能解析－酸化ストレスに基づく内皮細胞傷害と血栓形成、公開シンポジウム「ナノとバイオイメーjingの融合と医用への展開－安全な医薬・治療法へのアプローチ」、pp34-35、2004-1 (東京)
- 25) 南谷晴之：ナノプローブ・イメージングによる細胞・組織障害の機能解析、日本学術振興会・材料の微細組織と機能性第 133 委員会、第 180 回研究会, pp7-12、2004-1 (東京)
- 26) 渋谷典子、岩田裕美子、南谷晴之、牛山明、大久保千代次：腫瘍血管における光線力学的治療施行時の血流動態及び酸素分圧に関する研究、第 29 回日本微小循環学会総会, pp44、2004-2 (熊本)
- 27) 寺尾聰、関塚永一、石川真実、山口則之、南谷晴之、河瀬武：異なる蛍光色素により色分け標識した血小板と白血球の観察－mouse cranial window と 3 CCD カメラ装着生体顕微鏡を用いて－、第 29 回日本微小循環学会総会, pp52、2004-2 (熊本)
- 28) 広瀬耕徳、中楯浩康、後閑治彦、南谷晴之、関塚永一、大塩力、泉田太郎、坂元直行、霜沢真、吉川敏一：散乱光法を用いた糖尿病患者における血小板凝集能亢進の検討、第 29 回日本微小循環学会総会, pp69、2004-2 (熊本)
- 29) 中楯浩康、関塚永一、大塩力、広瀬耕徳、後閑治彦、南谷晴之：糖尿病易血栓性におけるシェアストレスの影響、第 29 回日本微小循環学会総会, pp69、2004-2 (熊本)
- 30) 南谷晴之、塚田孝祐、関塚永一、大塩力：生命情報のセンシング－多波長励起フォトニックイメージングシステムによる機能解析－、平成 16 年電気学会全国大会, ppS14(1)-S14(4)、2004-3 (相模原)

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし。

脳微小循環の血流・代謝イメージングシステム

主任研究者 南谷 晴之 慶応義塾大学大学院 理工学研究科基礎理工学専攻 教授
研究協力者 塚田 幸祐 川崎医科大学 生理学教室 助手

研究要旨： これまでの微小循環の酸素代謝に関する研究を俯瞰すると、血流動態からのアプローチに終始し、その主体となる分子状酸素の定量的な解析を踏まえた議論は極めて乏しいと言わざるを得ない。本研究では脳軟膜の微小循環のマイクロ・ナノスケールにおける血流動態・酸素拡散に着目し、局所脳循環代謝を評価可能なシステムを確立・実用することを目的とした。その背景として脳血管疾患は悪性新生物・心疾患に次ぐ死因にあげられており、病態モデルおよび脳循環代謝の実験的評価法の確立が急務であることも挙げられる。血流動態解析は循環赤血球の2%を蛍光色素(FITC)でラベルし、血流マーカとして機能させ、その血流ダイナミクスを可視化した。一方、脳軟膜局所酸素代謝の評価は酸素感受性物質の光化学反応を利用し、微小血管内および組織内の組織酸素分圧を計測する手法を確立した。さらに脳組織酸素代謝を時系列的に評価するために、細胞内ミトコンドリアのエネルギー代謝過程で使用される補酵素 NADH の紫外吸光特性に着目し、組織酸素代謝レベルのイメージングを試みた。H14 年度は計測パラメータの要素技術について、方法論の面から検討した。H15 年度は顕微鏡を中心とする光学系のシステム化について重点的に検討を加えたのでここに報告する。

A. 研究目的

脳組織には酸素と基質の storage がほとんどなく、その高次機能は全面的に微小循環に依存している。そのため強力な autoregulation により必要な局所血流が維持されている。脳組織とのガス交換を行う微小循環の計測はそれ故に極めて重要となるが、顕微鏡レベルの観察ゆえに技術的に困難となる。微小循環を対象にこれまでに数多くの計測装置が提案されてきたが、その血流速度や酸素濃度といった基本的な物理量ですら未だ決定的な計測法はない。

本研究では局所脳微小循環における血球動態観察と微小血管・組織における酸素分圧の計測を行い、また脳神経細胞内ミトコンドリアにおける好気性酸素代謝の指標として NADH 蛍

光を時系列解析し、脳虚血における局所脳循環・酸素代謝の可視化解析法を開発する。

B. 研究方法

B-1 血流の可視化・解析システムの確立

図1は新たに構築した血流・酸素分圧計測システムの全体図である。本計測システムの特徴は微小血管内の血流動態変化に伴う酸素分圧変化を経時的に計測可能な点にある。双方の情報を得るためにはそれぞれの励起光源を切り替えて計測対象部位に照射する必要がある。そこで血流動態と酸素分圧を1 Hz で計測できるように水銀ランプ光源の出射側に据え付けたシャッターを制御し、それぞれの光源を切り替えることで双方を経時的に計測するように設

計した。顕微鏡に搭載されたシャッターは TTL 制御により機械的に作動する。シャッターの開閉によって同期信号がレーザー装置へトリガーとして送られ、レーザーパルス光が照射される一連の協調動作をとる。レーザー光、水銀ランプの照射時間はそれぞれ 6 ns と 0.3 s、照射開始間隔は双方ともに 1 s である。

B-2 生体計測

本研究課題における実験は川崎医科大学動物実験委員会の承認を受け (No.02-086, 2003)、川崎医科大学動物実験指針に基づき実施された。

Wistar ラット (約 300-320 g) を α -chloralose (60 mg/kg), urethane (600 mg/kg) の腹腔内投与下に麻酔し、頸部を切開し気管挿管後、調節呼吸とした。ラットの大腿動静脈にカニューレションを行い、それぞれ血圧測定および薬品投与に使用した。脳表を露出後、約 4 mm 径の closed cranial window を作成した。window 内は人工髄液 (Na^+ 147.8 mEq/L, K^+ 3.0 mEq/L, Mg^{2+} 2.3 mEq/L, Ca^{2+} 2.3 mEq/L, Cl^- 135.2 mEq/L, HCO_3^- 19.6 mEq/L, lactate 1.7 mEq/L, phosphate 1.1 mM, and glucose 3.9 mM) を灌流した。その後、円形カバーガラスでラバーリングを覆い密閉した。

B-3 血流・酸素分圧計測方法

脳微小循環血流は赤血球を蛍光色素 FITC で標識することで可視化した。また血流画像の解析にはパターンマッチングを応用した画像処理システムを利用した。FITC 蛍光標識赤血球を観察する一方で、脳表微小血管内の酸素分圧は光励起されたポルフィリン分子から発光するリン光の酸素消光作用を利用することで計測を行った。酸素プローブとして Pd-meso-tetra-(4-carboxyphenyl)- porphyrin (以下 Pd-TCPP) を用いた。予め対象動物に Pd-TCPP を静脈内投与し、落射光学顕微鏡の対物レンズを通して対象臓器の微小血管に励起光 (Q-switched Nd:YAG laser-SH, 波長 532 nm) を照射する。血管内酸素濃度に依存して発光するリン光は 620 nm のロングパスフィルターを介して光電子増倍管を用いて光電変換し、電圧信号は AD 変換器を用いてサンプリング周波数 400 kHz, サンプリング数 500 点で取得した。リン光寿命を算出する波形処理では、出力信号の波形取り込み開始から 20 サンプリング分および最大電圧値に対する 1% 以下の範囲のデータを棄却した。その他の有効データを最小二乗法により指数関数でフィッティングすることでリン光寿命 τ を算定した。酸素分圧値への変換はリン光寿命を Stern-Volmer 式(1)に代入すること

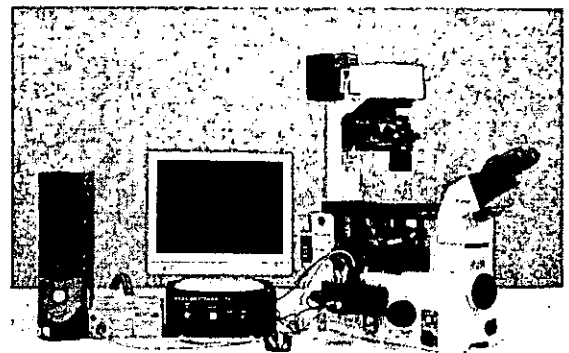
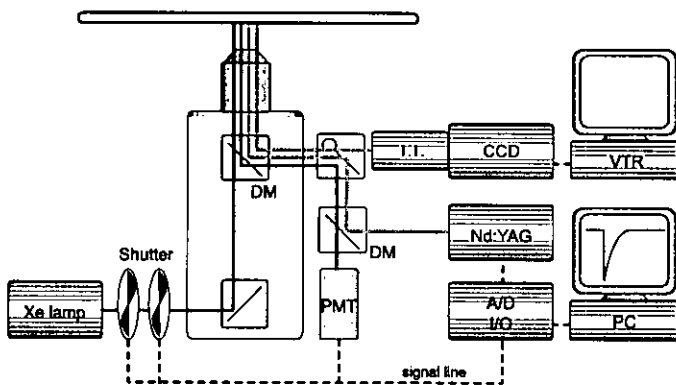


図1 微小循環-組織酸素代謝計測システム (倒立顕微鏡タイプ) のシステム略図 (左) と写真 (右)

で定量化した.

$$I_0/I = \tau_0/\tau = 1 + K_q \cdot \tau_0 \cdot pO_2 \quad \dots\dots\dots (1)$$

ここで I_0 と I は酸素分圧が 0 mmHg および pO_2 mmHg の時のリン光強度, τ_0 と τ は同様に酸素分圧が 0 mmHg および pO_2 mmHg の時のリン光寿命, K_q は Stern-Volmer 定数である.

B-3 NADH 蛍光による虚血指標の取得

脳微小血管の血流動態および血管内の酸素分圧の変化に対し, 組織酸素代謝を定量評価するために, NADH 蛍光を利用した. 図 2 に示したように, 微小循環の障害による酸素供給の低下に伴って ATP 産生の前駆物質である NADH は NAD^+ に変換されずにミトコンドリア内に蓄積される. NADH の蛍光輝度を画像化することによって局所領域における虚血の指標を時系列的にイメージングすることが可能である.

NADH の画像は Hg-Xenon ランプからバンドパスフィルタ (370 nm) を用いて UV 光を脳表に照射し, 蛍光 (420~570 nm) を画像化した. 脳表の NADH 蛍光画像を撮影する際には冷却 CCD カメラを用い, 特定領域の NADH 蛍光輝度を検出する場合には光電子増倍管を利用することで可能となる.

図 3 はラット大腿動脈より脱血・返血を行うことによって作製した急性出血モデルにおける脳組織の NADH 蛍光画像である. それぞれ (a) はコントロール, (b) は脱血時, (c) は返血蘇生における蛍光画像である. コントロールに比べ, 脱血による低血圧時 (40 mmHg) では組織の蛍光輝度が上昇しているのが分かる. 画像の取得は冷却 CCD カメラを使用し, 光蓄積時間を長くすることによって NADH 蛍光輝度の変化をイメージングすることが可能となった.

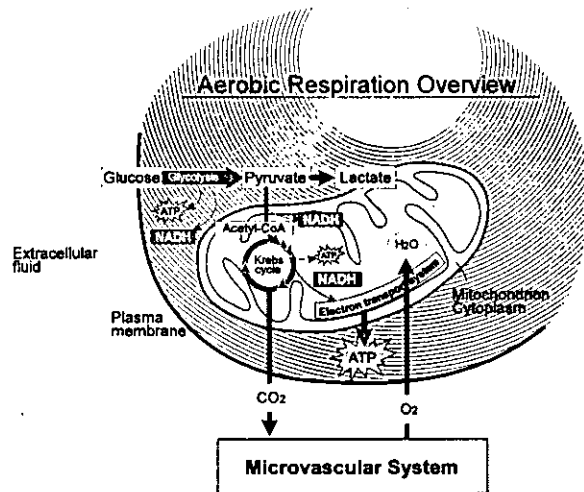


図 2 微小循環とエネルギー代謝の関係

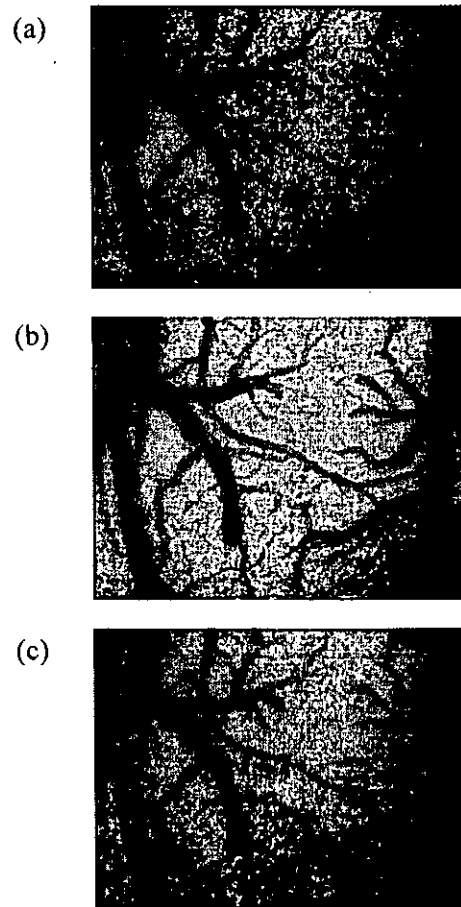


図 3 急性出血性ショックモデルにおける NADH 蛍光輝度の変化
(a) ベースライン (b) 出血性ショック状態 (c) 返血蘇生時