

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・治癒機構の解析と  
高精度局所診断技術の開発

(H14-ナノ-018)

平成16年度 総括・分担研究報告書

主任研究者

南 谷 晴 之

平成17（2005）年3月

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・治癒機構の解析と 高精度局所診断技術の開発

(H14-ナノ-018)

平成16年度 総括・分担研究報告書

主任研究者

南 谷 晴 之

平成17（2005）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 南谷晴之 研究協力者 塚田孝祐	..... 17
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 南谷晴之 研究協力者 鈴木弘美	..... 21
3) ナノイメージングによる血管炎発症初期の分子機構解析	分担研究者 鈴木和男	..... 25
4) 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	..... 35
5) 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	..... 45
6) 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	..... 51
7) 細胞組織動態の解析に向けた軟X線顕微鏡技術開発	分担研究者 眞島利和	..... 63
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	..... 67
9) 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	..... 73
10) 超高感度 <sup>31</sup> P-NMRプローブの開発	分担研究者 田之倉優	..... 81
11) ヒトポリペプチド鎖終結因子eRF1の動的構造解析	分担研究者 村松知成	..... 87
12) 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	..... 93
13) 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	..... 97
14) 神経細胞再生因子の解析	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		..... 123
IV. 研究成果の刊行物・別刷		..... 133

## 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：所属施設：慶応義塾大学大学院理工学研究科基礎理工学専攻 教授  
氏名：南谷晴之

分担研究者：所属施設：国立感染症研究所生物活性物質部 室長  
氏名：鈴木和男  
所属施設：国立医薬品食品衛生研究所生物薬品部 部長  
氏名：川西 徹  
所属施設：東京理科大学理工学部応用生物科学科 教授  
氏名：新井孝夫  
所属施設：独立行政法人国立病院機構埼玉病院 副院長  
氏名：関塚永一  
所属施設：産業技術総合研究所光技術研究部門 主任研究員  
氏名：眞島利和  
所属施設：東京大学大学院薬学研究科 教授  
氏名：船津高志  
所属施設：千葉大学大学院医学研究院免疫発生学教室 教授  
氏名：中山俊憲  
所属施設：東京大学大学院農学生命科学研究科 教授  
氏名：田之倉優  
所属施設：理化学研究所ゲノム科学総合研究センター 上級研究員  
氏名：村松知成  
所属施設：産業技術総合研究所光技術研究部門 主任研究員  
氏名：松村英夫  
所属施設：国立国際医療センター研究所 副所長  
氏名：山本健二  
所属施設：東京女子医科大学総合研究所研究部 助教授  
氏名：霜田幸雄

#### 研究協力者：

鈴木弘美（藤田保健衛生大学総合医科学研究所）、塚田孝祐（慶応義塾大学医学部医化学教室）、朽津和幸（東京理科大学理工学部応用生物科学科）、大幡久之（昭和大学薬学部薬理学教室）、大川原明子、長尾朋和（以上、国立感染症研究所）、高橋啓、大原関利章、直江史郎（以上、東邦大学医学部病理学教室）、長谷川明洋、村田薫（以上、千葉大学大学院医学研究院免疫発生学教室）、三浦典子、大野尚仁（以上、東京薬科大学薬学部）、山岸舞（東京大学大学院薬学研究科）、村山研、黒岩憲二（以上、東京理科大学理工学部応用生物科学科）、湯本史明、胡芳宇、金森陽子（以上、東京大学大学院農学生命科学研究科）、星野昭芳、真鍋義則、藤岡宏樹、塩原あまね、桑原三佳子（以上、国立国際医療センター研究所）

## 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

本研究「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」では、ナノプローブ技術、ナノバイオイメージング技術、細胞組織の分子生理機能の研究に秀でた研究グループを組織し、生体の恒常性破綻に起因する種々の細胞組織障害と再生治癒機構の解明を目指して研究を推進した。第一に、新規に開発した FRET 型 GFP 変異体、Cd-Se を基材とする量子ドット、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、磁気ナノ粒子を包含するリポソーム粒子と高効率蛍光・燐光プローブを用いて組織・細胞の分子認識を可能にした。第二に、複数の異なるナノプローブの発光現象を利用したマルチカラーイメージングや1分子蛍光イメージング、高感度高速度イメージング、軟X線顕微鏡イメージングなど、新たな生体情報を提供するイメージング技術の開発を行った。第三に、これら物理的・生化学的作用に基づく分子認識機構を有する各種ナノプローブを用いて、細胞構築・細胞機能のイメージング解析を行うとともに、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・細胞障害のメカニズムや細胞死のメカニズムを分子・細胞レベルで解析するとともに、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応用する、いわゆる Translational Research を展開した。主な研究項目は、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リニ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イメージング解析と薬理効果の評価、6)腎炎・関節炎など炎症反応における特異的蛋白分子作用と易血栓性の解析、7)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、8)血管内皮細胞と白血球・血小板間相互作用における分子生理機能の解析、9)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、10)腫瘍細胞・神経細胞などにおけるアポトーシス・細胞死に関わるタンパク質・酵素の作用機序の解析、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、Translational Research 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した。成果の一部は各研究分担者の研究報告書に記述した。

### A. 研究目的

本研究では、種々の細胞組織障害と再生治癒機構の解明を目指して、*in-vivo*、*in-situ* ならびに *in-vitro* 系で形態変化のみならず分子生

理機能変化を時空間的な可視情報としてとらえるためのナノプローブ技術、ナノバイオイメージング技術の開発を行い、各種蛍光・燐光ナノプローブを用いて生体内で起こる血管炎や

微小循環障害による細胞組織障害の発現メカニズムを分子・細胞レベルで解析するとともに、その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、診断治療へ応用展開する Translational Research を目的とした。

本研究では特に、蛍光・燐光発光分子、量子ドットなどの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た。また、酸化ストレスが恒常性の破綻に伴う活性酸素亢進や消去系の機能低下で活性酸素種の蓄積、より反応性の高い活性酸素種の生成が起こり、直接・間接的に微小循環障害に深く関わることから、生体の内因性あるいは外因性因子によって活性酸素の処理が不十分な状態になるために生じる酸化ストレスに関して、ラット・マウスの微小循環を対象に光化学反応に基づく酸化ストレス付加モデルと虚血再灌流モデルを構築し、実質臓器内での酸化ストレスと微小循環障害の関係を各種蛍光・燐光ナノプローブのマルチフォトンイメージング技術を駆使して解析した。研究項目は、1)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ンイメージングシステムの開発と応用、2)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、3)虚血再灌流傷害における血管内皮細胞と血小板・白血球の相互作用の解析、4)糖尿病性微小血管障害・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、5)腫瘍等新生血管の構築と光化学反応に基づく血栓形成・血管閉塞・血流遮断効果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、臨床診断治療への応用展開をはかること

を目的として研究を遂行した。

## B. 研究方法

### 蛍光ナノプローブの開発と利用：

数種の蛍光・燐光プローブを同時に生体組織・細胞中に投与して、種々の細胞・組織内の分子生理機能や微小血管中の血球細胞の動態をナノ・マイクロレベルで可視化解析した。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) 50µg/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。

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、その官能基に核酸、蛋白、オリゴペプチドを tagging させ、Vero 細胞やリンパ T 細胞のエンドソームマーカとして活用するとともに、ライソゾームや細胞質への伝達、アダプター分子とシグナルペプチドの結合により安定に核やミトコンドリアに局在化させ可視化することに使用した。量子ドットの安全性について MTT アッセイとコメットアッセイの

二法で検討した。メルカプトウンデカン酸とメルカプトグリセロールの表面加工の違いにより、同じナノ粒子でも生物毒性の有無があり、安全な物質、毒性のある物質ともに製造可能であることが判明した。各種臓器における量子ドットの蓄積性・排泄能についてもイメージング法によって評価した。

異なる2種のGFP変異体の間にペプチド配列基質を挿入したFRET型GFPを作製、チロシンリン酸化やCaspase活性を可視化し細胞死の評価に使用した。細胞死のシグナル伝達メカニズムであるカスパーゼカスケードをFRET現象のマルチカラーイメージングで解析する2種の蛍光タンパクプローブを作製した。シグナル伝達の上流で働くイニシエーターカスパーゼ(IC)と下流で働くエフェクターカスパーゼ(EC)によって切断されるペプチド配列を挟む融合タンパク質を各カスパーゼ活性化検出用プローブとして作製した。EYFPとDsRedを用いたIC活性化プローブ、ECFPとDsRedを用いたEC活性化プローブを同一HeLa細胞に発現させ、488 nm励起によるEYFP蛍光の上昇、458 nm励起によるECFP蛍光の上昇によってカスパーゼ活性化をモニターして同一細胞内で2種のカスパーゼ活性化の同時解析に使用した。また、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使用した。

□カチオン性リポソームを付加した蛍光標識モノクローナル抗体の生細胞導入技術確立し、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。ヒドロキシラジカルによる細胞死を抑制するモノクローナル抗体DT-1は、アストログリアの細胞表面抗原を認識し、アストログリアの細胞死抑制活性因子の分泌を促進する作用があることが示された。一方、微生物代謝物質ネオエキヌリンAがペルオキシナイ

トライトにより誘導される神経細胞死を抑制する作用を有し、ペルオキシナイトライトの消去能を有するが、NOやヒドロキシラジカルについては消去能を示さないことを明らかにした。

バイオイメージングシステムの開発と利用：

上記の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リック・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 $\tau$ 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 $\tau_0$ 、 $\tau$ 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リックイメージングシステム(ニューオプト、BOPIS-□)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。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<sup>+</sup> 3.0 mEq/L, Mg<sup>2+</sup> 2.3 mEq/L, Ca<sup>2+</sup> 2.3 mEq/L, Cl<sup>-</sup> 135.2 mEq/L, HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> 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。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3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、マウス背部皮内の微小血管系の構造と血流動態が顕微鏡下で可視化できる。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 (NIKON、TE-1000) やリアルタイム共焦点走査型レーザ顕微鏡 (YOKOGAWA、CSU-21) 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。

### C. 研究結果

#### (1) 微小循環障害における血流動態と酸素代謝の解析

上記のナノプローブとナノバイオイメージング技術を活用して、生体の恒常性破綻に伴う酸化ストレスと微小循環障害を解析した。ex-vivo-FITC 標識赤血球と Pd ポルフィリン酸素プローブによる血流・酸素動態の計測と細胞ミトコンドリア内 NADH の紫外吸光観測により、脳表層組織の血流・酸素代謝変化の定量化した。また、虚血再灌流障害における血流動

態を ex-vivo-標識 Rhodamine 6 G 白血球と CFDASE 標識血小板の rolling・粘着過程可視化解析によって定量化した。生体の恒常性破綻に伴う微小循環障害を血流動態と酸素代謝の関連から評価し、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。また、脳、肝臓の虚血再灌流障害において血小板・白血球の接着亢進、血流停滞、血栓増悪を定量的に明らかにした。図4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。このようなイメージングから血流速度と酸素分圧を計測した結果が図5である。急性的な脳虚血を起こさせ、短時間で返血・再灌流した結果では、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するが、時間経過が長くなると血流の停止により酸素分圧の極端な低下となり、細胞傷害が顕著となる。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の観点からすると、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にした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してく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。

#### (2) 虚血再灌流傷害における脳皮質の血流動態、白血球・血小板粘着の解析

一方、脳虚血・4 時間後の再灌流実験では、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。これは虚血・再灌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6は虚血・再灌流後の血管内皮への白血球および血小板の粘着数を計測した結果である。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。とくに図7に示すように糖尿病モデルマウスではその粘着亢進が著しくなり、病態として重篤な症状となる。このような血栓形成は、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。関連して脳における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結果は、研究協力者鈴木弘美の成果報告書に記述した。

### (3) 糖尿病における微小循環障害と血管内皮細胞・白血球・血小板相互作用の解析

これらの成果に基づき糖尿病性の細小血管障害・脳血流障害など特異的な血流動態をイメージング解析したが、図7の結果からわかるように活性酸素産生の亢進、血管内皮傷害、白血球の粘着、血小板膜破壊・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の働きを明らかにした。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。関連して血管内皮細胞と白血球・血小板間相互作用における分子生理機能を解析したが、ポルフィリン誘導体光化学反応(PDT)の活性酸素産生に基づく血栓形成過程において内皮細胞の細胞骨格F-actinの重合、細胞接着tight junctionの喪失、細胞短縮、内皮下露出が顕著に増加、さらに血小板と白血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。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、 $B_2$ 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。さらに拍動を有する血压可変型微小循環モデルによる糖尿病性内皮細胞対血小板凝集反応の解析を行い、糖尿病性最小血管障害の機構解明を行った。糖尿病に対する各種治療薬の効果を評価し、血栓抑制が有意に高まる結果を得たが、詳細については、共同分担研究者である関塚永一の成果報告書に記述した。

一方、摘出したマウス胸部大動脈の内皮細胞を対象に*in-situ*系でメカニカルストレスを負荷し血管内皮細胞のNO産生とCa応答、pH変化を解析したところ、リゾホスファチジン(LPA)刺激で内皮細胞のCa応答を介してトロンボキサンA2/プロスタグランジンH2の産生・遊離を促進し、内皮・血管組織の収縮を誘発することが示唆された。また、高濃度のLPAは強い流れ刺激が負荷された状態では一部の内皮細胞に傷害的に作用し、その傷害メカニズムにはCa応答の持続的な増強が密接に関与することが示唆された。その詳細については分担研究者の川西徹の成果報告書に記述した。

### (4) 血管新生における血管構築と血流動態・酸素代謝の解析

マウス dorsal skinfold chamber 法により新生血管(腫瘍モデル、VEGFモデル、bFGFモデル)の増殖過程における血管構築と血流動態・酸素代謝を観測し、その特異性を検討するとともに活性酸素産生に伴う腫瘍新生血管の血流遮断メカニズムについて検討した。腫瘍モデルは、マウス背部皮膚に乳癌細胞MT060562を埋め込み増殖させた。図8に示したように腫瘍新生血管の構築状態は正常血管網とは著しく異なり、血流速度ならびに酸素分圧の様相もかなり異なる。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。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。図9はVEGFによる血管新生構築部の酸素分圧マップを示したものであるが、早い速度で血管新生が促進される部位では酸素消費が多く、酸素供給不足となり、低酸素状態となることがよくわかる。

#### (5) 活性化好中球による急性腎炎血管症における血流障害のイメージング解析

急性糸球体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好中球活性化や好中球自己抗体の働きを血流*in-vivo*イメージングにより解析したところ、前者では顕著な血流速度低下、血流停止・逆流、白血球粘着が、後者では活性酸素誘導の血小板凝集が遅延、血栓形成・血管閉塞の遅延が観測され、活性化好中球の細胞膜表面に局在するCD69分子の局在移行とCD69の関与が示唆された。その結果より好中球活性化によるCD69分子の表面出現が血管得発症初期過程に関与していると推定された。また、MPO抗体の濃度依存的に内皮細胞のICAM-1発現が上昇し、Fab抗体でも同様の反応が見られ、これらの結果からMPOの関与と特に好中球が炎症において重要な役割を担っていると考えられた。FMLP刺激活性化好中球では、細胞表面に量子ドット標識MPO抗体が特異的に結合し炎症に関わることが示された。その詳細については分担研究者の鈴木和男の成果報告書に記述した。

#### (6) 細胞死におけるCaspase活性のイメージング解析

細胞死のシグナル伝達に関係するカスパーゼについて細胞内オルガネラ内カスパーゼ活性化をFRET型GFPでイメージング解析した結果、ミトコンドリア内及び小胞体内では活性化がないものの核内では細胞質にやや遅れて活性化されることを明らかにした。PDTによる活性酸素誘導アポトーシスでは、ミトコンド

リア膜電位の低下、細胞内Ca濃度上昇が観測され、Ca濃度上昇はCaspase-3, -6, -8の活性化に、活性酸素はCaspase-3, -8の活性化に不可欠であることが明らかとなり、Ca濃度上昇がアポトーシス誘導に不可欠と考えられた。また、活性酸素ペルオキシナイトライトによる神経障害で誘導される細胞死を防御するネオエキヌリンAは、細胞内に存在するシグナル伝達系のタンパク質を標的とする可能性があることが示唆された。FRET型GFPによるCaspase活性化に基づく細胞死に関する詳細については分担研究者の川西徹の成果報告書に記述した。

#### 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ンイメージングシステムはその要望に十分に答えるものである。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、肝臓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ン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、活性酸素産生による血栓形成については、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。微小血管の血栓形成過程における血小板粘着と血栓形成・血管閉塞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ったが、これ以外の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。光化学反応による酸化ストレスで血管内皮細胞（HUVEC）の球状タンパク質の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起こり、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。また、細胞接着を司っているtight junctionの構成タンパク質ZO-1については、光化学反応前には細胞間に線維状のZO-1が確認されたが、光化学反応後には喪失し、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ったといえる。以上の

ように、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セレクトインとEセレクトインの関与は少ないものの、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、vWFの活性化が認められた。内皮と白血球間での接着性亢進については、B2インテグリン、ICAM-1の活性化が認められ、またCD18、CD69、CD11aの活性化によって血栓生成が亢進したものと考えられる。

マウス dorsal skinfold chamber 法により新生血管の増殖過程と血流動態・酸素代謝を観測し、その特異性を検討したが、bFGFモデルとVEGFモデルの差は血管新生に働く各増殖因子の働く役割の違いを示唆している。新生血管占有面積についてbFGFモデルでは4~5週にかけて急増するのに対してVEGFモデルでは2~3週で進行が早く、VEGFでは4~5週になると作用中心部では血管数が減少するのに対して辺縁部の血管占有面積が増加して辺縁部の広がりが確認された。中心部では血管新生の進行が著明に増大するために低酸素状態となり血管が壊死状態に陥ることが示唆された。酸素分圧の計測によってその現象は確認され、VEGFの作用の方が低酸素による血管新生の促進効果が高いと考えられた。腫瘍モデルにおいては血管新生の成長が持続するものの腫瘍組織の増殖により数量的には他のモデルに比べて少なく低酸素状態となっていることが特徴的である。

本研究では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アポトーシス発現のメカニズムを検討し、細胞のアポトーシス誘導経路について分子シグナル伝達の探索を行った。活性酸素の中でも一重項酸素がDNA断片化に関与していることが明らかとなった。ミトコンドリア膜電位の低下を確認したが、この現象は酸化ストレスによる早期の段階で起こり、アポトーシス誘導過程の上流に関与している可能性が考えられた。また、細胞内Caイオン濃度の上昇が確認され、細胞内Ca濃度上昇をキレート剤で阻害するとアポトーシス誘導が阻害され、一方、細胞外Caの流入を阻害してもアポトーシスが誘導されたことから細胞内のCa貯蔵部位からCaの放出がアポトーシス誘導に関与していると考えられた。Caspase系列については、Caspase-3、Caspase-6、Caspase-8の活性化が確認されたが、Caspase-8がCaspase-3を活性化する過程が考えられ、Caspase-6とCaspase-3は互いの活性化に密接に関わっていることが示唆された。また、Caspase-3、Caspase-8の活性化には細胞内Caと活性酸素が関与し、Caspase-6の活性化には細胞内Caが必須に関与するが、活性酸素は一部関与していることが明らかとなった。

腎炎モデルマウスを用いた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が、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、血管閉塞が観測され、MPOの関与、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。また、好中球による血管内皮傷害時のapoptosis signal伝達過程におけるp38 MAPK(p38)とCaspase 8の活性化を検討した結果、TNF $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ によりMAPK-p38が最もリン酸化され、Caspase 8の18kDaの活性化型(c-Cas8)が生成されていることを確認して

いる。この種の血管内皮細胞傷害は活性化好中球を介して生起し、血管内皮細胞内では、IL-1 $\beta$ 等の受容体を介しp38のリン酸化やCaspase 8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に関して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の開発が必要であるが、今後の課題として残った。

本研究では多くの分担研究者の参画で多岐にわたる研究が展開されたが、研究対象を広げ過ぎたことから成果が十分に得られなかった部分もある。しかし、FRET型GFP、量子ドット、蛍光抗体、生体適合性を付加した蛍光・燐光プローブなどのナノプローブおよび高感度のマルチフォトニクイメージングシステム、軟X線顕微鏡などの新規イメージングシステムの開発がなされ、その有効性が十分に確認された。成果の一部は、製薬企業からの薬理効果の評価に利用されようとしている。また、糖尿病や自己免疫性血管炎の障害機構や血栓形成メカニズムの解明、細胞死のシグナル伝達機構と各種活性酸素の関与など、新しい知見も得られた。開発プローブやイメージングシステムの臨床応用への展開は将来的な課題となったため、今後十分に検討する必要がある。

研究成果の学術的・国際的・社会的意義について考えると、生体適合性を付加した蛍光・燐光分子を生体内に導入し細胞や組織の分子生理機能を可視化解析することは決して新しいことではないが、本研究では複数の特定分子生理機能をマルチモーダルに詳細に解析し、なおかつ動的に実質臓器での観測が可能となったことは学術的にも意義深い。国内外でナノメディシン分野がしのぎを削る勢いで進んでいるが、日本の高度な光学機器と精密機器に支えられ超高精細・高感度・高速度のバイオイメージング技術を生むことができ国際的にも意義深い。さらに本研究では糖尿病をはじめとする成

人病疾患に関わる微小循環障害・血管炎・新生血管障害を対象とするなど、病態診断・疾病治療に対して寄与するところ少なくないと考えられ社会的意義も大きいと考える。

以上を踏まえて今後の展望を考えてみる。本研究では、臨床現場で活用されうる幾つかのシーズを生み出したが、開発したナノプローブとイメージングシステムの生体適合性と安全性をさらに検討し、今後、臨床診断法への展開と医療機器の開発に向けて研究を集約加速させたいと考えている。とくに生体機能の見える窓としての眼底網膜や口腔内薄層の微小循環系を対象とする多波長マルチフォトニックイメージングシステムを開発し、糖尿病、高脂血症などに関わる細小血管障害のモニター、新生血管機能解析に発展させる必要がある。また、脳、肝臓、腎臓を対象とした酸化ストレスと微小循環障害の関連性を詳細に検討しなければならない。

## 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。脳・肝臓・腎臓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、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。

微小循環障害や血管炎によって誘発される種々の細胞組織障害のメカニズムとその再生

治癒機構に関する分子生理機能と細胞死のシグナル伝達機構について主にイメージング手法で解析し、その成果を診断治療へ役立てることを目的として本研究を行った。分子・細胞レベルで可視化解析するための各種蛍光・燐光ナノプローブとバイオイメージング技術の新規開発、その有効な利用法の確立、ならびに種々の機能解析に新しい知見を得ることができたことは本研究の大きな成果であった。ヒトを対象とした臨床応用への展開には更なる検討と生体適合性および安全性の確認が必要である。

最後に本研究課題に携わった他の分担研究者の研究成果の概要を総括する。(1)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や遺伝子発現マーカとして、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としての可能性を検討した。磁気微粒子についてはヘマタ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。一方、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。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が、この他に、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。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アナライザーの活用では、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するとともに細胞内の無機リン酸とpHを生きた状態で短時間に観測する方法を可能にした。

ナノメディシン分野は、今後発展の一途を辿るものと予測され、本研究の成果は、今後、臨床の現場で活用される実用的な診断治療技術および医療機器へ展開されるシーズを作り出したと考える。

## F. 健康危険情報

特になし。

## G. 研究発表

### G-1 論文発表

- 1) Hirose Y., Sekizuka E., Nakadate H., Ozawa T., Minamitani H., Oshio C., Ishii H. : Role of oxidative stress in interaction between endothelial cells and platelets in diabetes, *Organ Microcirculation - A Gateway to Diagnostic and Therapeutic Interventions* , pp.239-241, ed. by H.Ishii, M.Suematsu, K.Tanishita, H.Suzuki, Springer-Verlag Tokyo, 2005.
- 2) 南谷晴之、塚田孝祐 : 臓器血流と酸素代謝の光・イメージング解析、*医学のあゆみ*、210(3), pp200-204, 2004.
- 3) Hirose Y., Nakadate H., Gokan H., Minamitani H., Sekizuka E., Oshio C., Izumida T., Sakamoto N., Shimozawa M., Yoshikawa T. : Enhanced platelet aggregability in diabetic patients established by

laser light scattering method, *Microcirculation Annual*, 20, pp.49-50, 2004.

- 4) Nakadate H., Sekizuka E., Oshio C., Hirose Y., Gokan H., Minamitani H. : The effect of shear stress on the accelerated adhesion of diabetic platelets, *Microcirculation Annual* , 20, pp.51-52, 2004.
  - 5) Shibuya N., Iwata Y., Minamitani H., Ushiyama A., Ohkubo C. : Blood flow dynamics and intravascular oxygen tension of tumor microvessels in photodynamic therapy, *Microcirculation Annual*, 20, pp.87-88,2004.
  - 6) Terao S., Sekizuka E., Ishikawa M., Yamaguchi N., Minamitani H., Kawase T. : Color imaging of platelets and leukocytes labeled with different fluorescent material in brain pial vessels of C57BL/6 mouse, *Microcirculation Annual*, 20, pp.99-100, 2004.
  - 7) Nagao T., Murayama K., Koshio O., Ohno H., Miura N., Takahashi K., Mabuchi A., Minamitani H., Suzuki K. : 腎臓血管傷害のイメージング、*Pharma Medica*, 22(5), pp185-189, 2004.
  - 8) 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, *J.Appl. Physiol.*, 96, pp1561-1568, 2004.
- ### G-2 学会発表
- 1) Minamitani H. : Nano-medicine - A new concept for innovative translational research to the clinical diagnosis and therapy: Multimodal photonic imaging analy-

- sis of organic cell disorder by using fine molecular fluorescent probes, *Proc. 1st Int. Sympo. Innovative Bio-Physio Sensor Technology*, pp.7-8, 2004-6 (Busan, Korea).
- 2) Minamitani H., Shibuya N., Iwata Y., Ushiyama A., Ohkubo C. : Blood flow dynamics and intravascular oxygen tension of tumor microvessels under photodynamic treatment, *Abstracts 23rd Conf. Europ. Soc. Microcirculation*, OAR1, pp.59, 2004-9 (Lisbon, Portugal).
  - 3) 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ジング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)
  - 4) 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)
  - 5) Nagao T., Mabuchi A., Minamitani H., Suzuki K. : role of MPO-ANCA in vasculitis, 日本免疫学会総会・学術集会記録、34、pp277、2004-1 (札幌)
  - 6) 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)
  - 7) 寺尾聡、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)
  - 8) 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)
  - 9) 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)
  - 10) 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)
  - 11) 南谷晴之、塚田孝祐、新井達也、寺尾聡、関塚永一、大塩力 : マルチフォトニックイメージングシステムによる虚血脳微小循環の血流動態と酸素代謝の計測、第 43 回日本 ME 学会大会論文集、pp170、2004-5 (金沢)
  - 12) 長尾朋和、松村実美子、馬淵綾子、越尾修、南谷晴之、鈴木和男 : MPO-ANCA の糸球体内皮細胞への作用、生体防御機能異常ワークショップ 2004 講演抄録集、pp24、2004-6 (沖縄)
  - 13) 村山研、長尾朋和、鞍馬秀輝、長谷川昭洋、船津高志、南谷晴之、新井孝夫、中山俊憲、鈴木和男 : 血管炎における活性化好中球の CD69 分子、第 15 回日本生体防御学会学術総会抄録集、pp48、2004-7 (長崎)
  - 14) 長尾朋和、松村実美子、馬淵綾子、越尾修、南谷晴之、鈴木和男 : MPO-ANCA による糸球体内皮細胞粘着分子の Up-regulation、第 15 回日本生体防御学会学術総会抄録集、pp47、2004-7 (長崎)
  - 16) 内田翔太、関塚永一、大塩力、広瀬耕徳、後閑治彦、南谷晴之 : マルチカラーイメージングを用いた微小流路内の血液流動状態の

- 観察、第13回日本バイオイメージング学会  
学術集会要旨集、pp93-94、2004・11（京都）
- 17) 松村実美子、高橋未帆、渋谷典子、守屋智  
子、鈴木和男、南谷晴之：光化学反応による  
血管内皮細胞傷害のイメージング解析、第  
13回日本バイオイメージング学会学術集会  
要旨集、pp113-114、2004-11（京都）
- 18) 後閑治彦、関塚永一、大塩力、広瀬耕徳、  
南谷晴之：高血糖血管内皮細胞における活性  
酸素産生亢進、第13回日本バイオイメージ  
ング学会学術集会要旨集、pp166-167、  
2004-11（京都）
- 19) 高橋亮太、新井達也、塚田孝祐、石川真実、  
関塚永一、大塩力、南谷晴之：脳皮質細動脈  
近傍における血流動態および酸素分圧勾配  
の計測、第13回日本バイオイメージング学  
会学術集会要旨集、pp186-187、2004-11（京  
都）
- 20) 広瀬耕徳、関塚永一、大塩力、泉田太郎、  
後閑治彦、内田祥太、南谷晴之：糖尿病患者  
における血小板凝集能亢進に対する  
fibrinogen の関与、第27回日本血栓止血学  
会、pp.2004-11（奈良）
- 21) 鈴木奈穂、関塚永一、石川真実、寺尾聰、  
荻野陽望、大塩力、南谷晴之：脳虚血再灌流  
時におけるマルチカラーイメージングによ  
る白血球-血小板動態の同時解析、第11回  
日本ヘモレオロジー学会抄録集、pp54、2004  
年11月（東京）
- 22) 広瀬耕徳、関塚永一、穂苅量太、三浦総一  
郎、大塩力、後閑治彦、内田祥太、南谷晴之：  
高グルコースおよび静止圧負荷における培  
養血管内皮細胞障害のメカニズム、第11回  
日本ヘモレオロジー学会抄録集、pp71、  
2004-11（東京）。
- 23) 後閑治彦、関塚永一、大塩力、広瀬耕徳、  
南谷晴之：高血糖血管内皮細胞における酸化  
ストレス亢進、第11回日本ヘモレオロジー  
学会抄録集、pp72、2004-11（東京）
- 24) 荻野陽望、関塚永一、石川真実、寺尾聰、  
大塩力、鈴木奈穂、南谷晴之：白血球・血小  
板のマルチカラーイメージングを用いた糖  
尿病状態における脳虚血再灌流障害の発生  
機序の解析、第11回日本ヘモレオロジー学  
会抄録集、pp73、2004年11月（東京）
- 25) 内田祥太、関塚永一、大塩力、広瀬耕徳、  
後閑治彦、林哲也、南谷晴之：MC-FAN お  
よび LSPA を用いた糖尿病血流動態悪化時  
の各血球成分別の解析、第11回日本ヘモレ  
オロジー学会抄録集、pp74、2004-11（東京）

#### H. 知的財産権の出願・登録状況

なし。

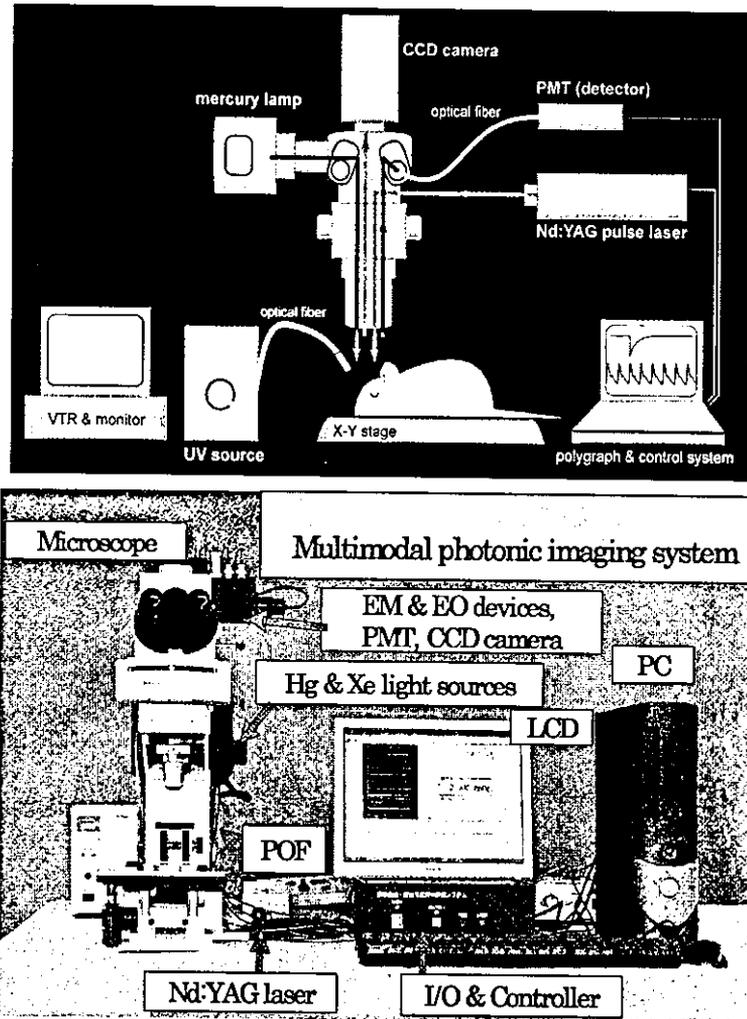


図1 多波長励起フォトニックイメージング システム (上: 概念図、下: 実装システム)

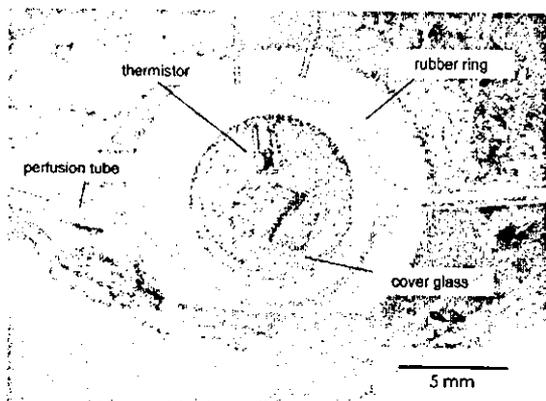


図2 ラット頭頂骨に作成した closed cranial window

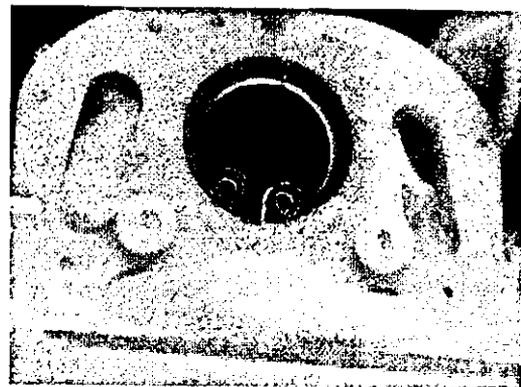


図3 マウス背部の dorsal skin fold chamber

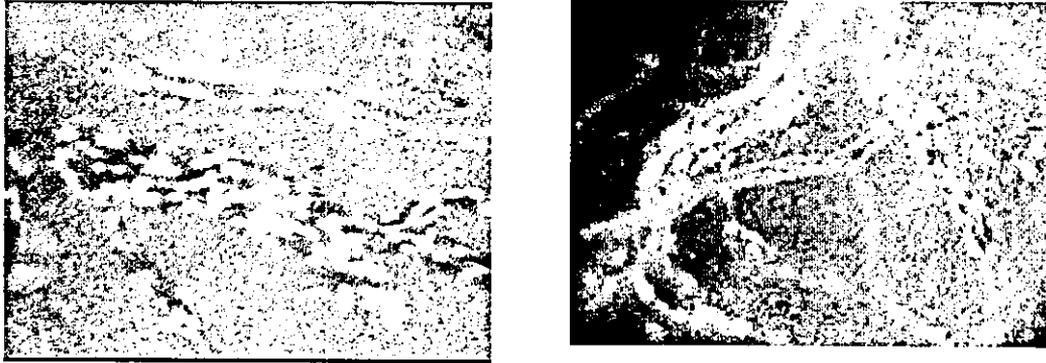


図4 ラット脳表層の微小血管内の FITC 標識赤血球の流動状態

### 脳皮質細動脈の血流速度と酸素分圧： 組織への酸素拡散

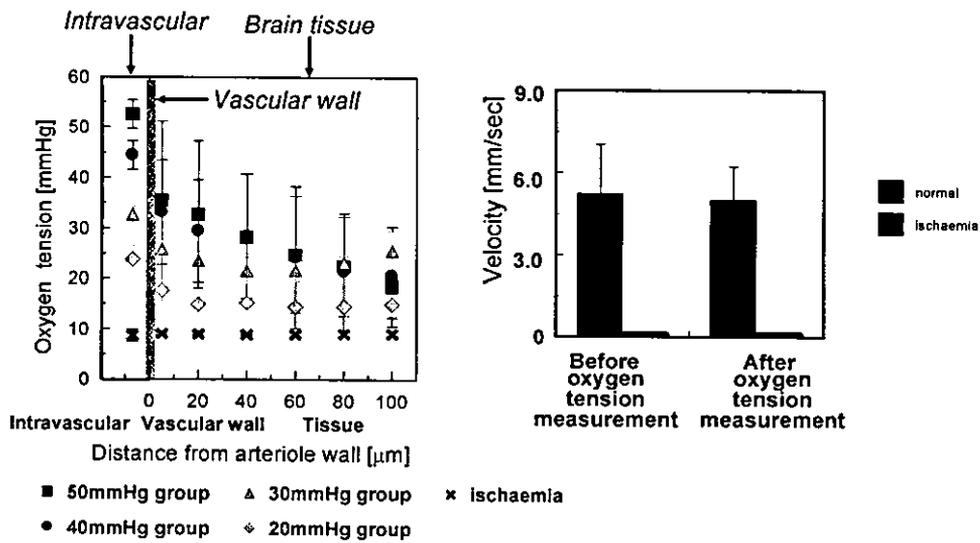


図5 虚血状態における脳皮質細動脈および周辺組織の酸素分圧と血流速度

虚血再灌流における脳微小循環内の白血球-血小板動態

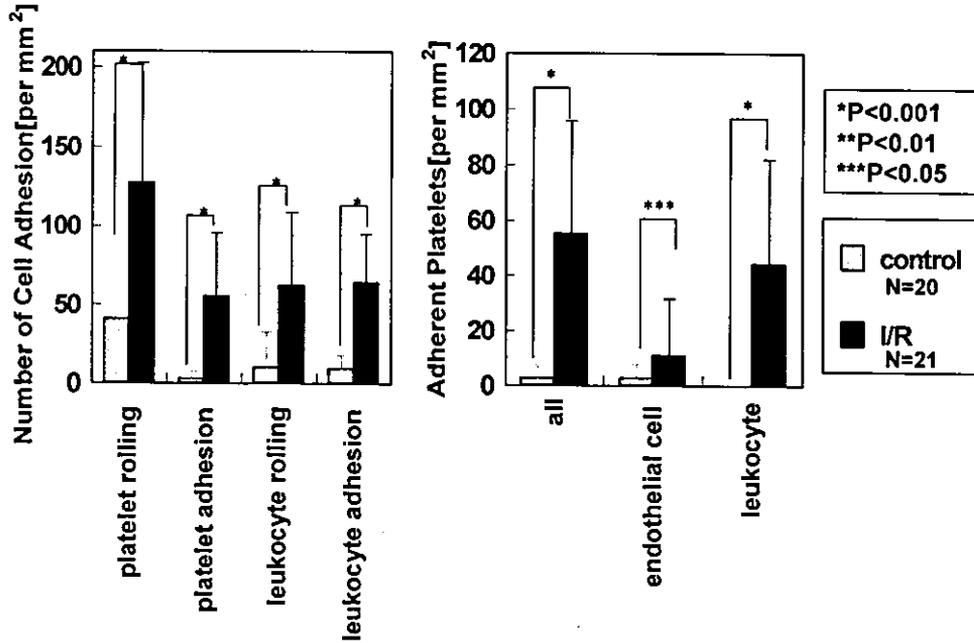


図6 虚血再灌流における脳微小循環内の内皮への白血球と血小板の粘着亢進

糖尿病時の虚血再灌流における脳微小循環内の白血球および血小板の粘着

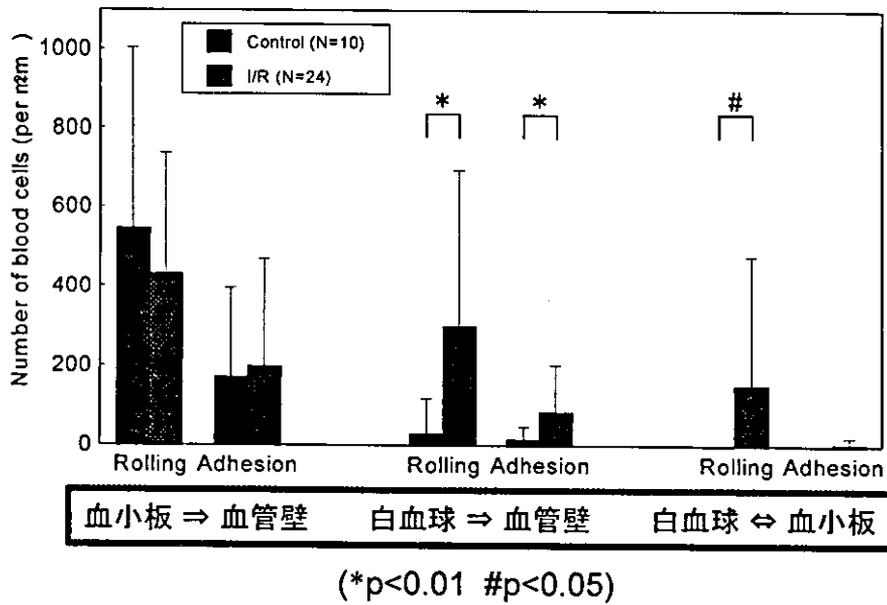


図7 糖尿病マウスの虚血再灌流における脳微小循環内の白血球と血小板粘着亢進

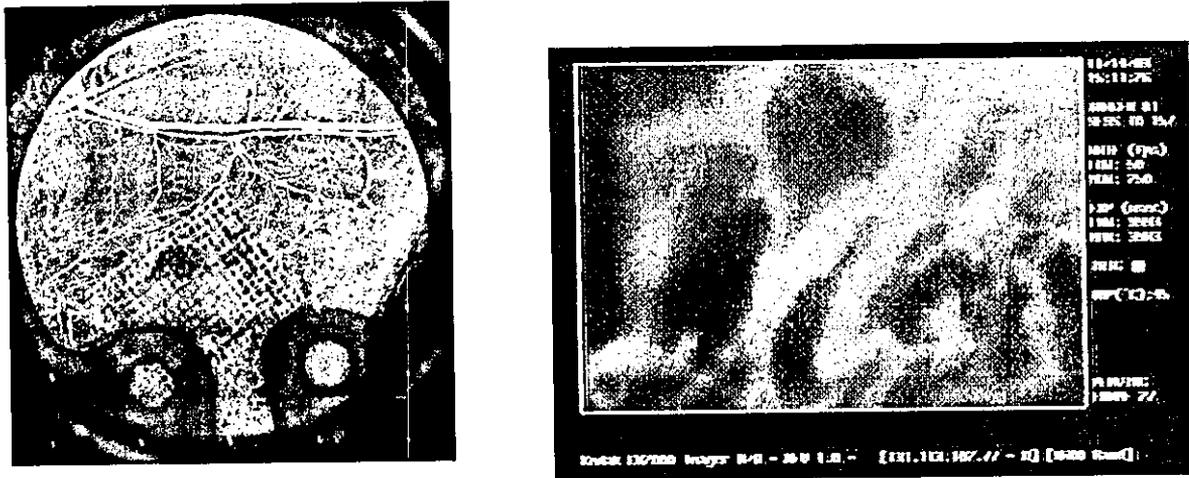
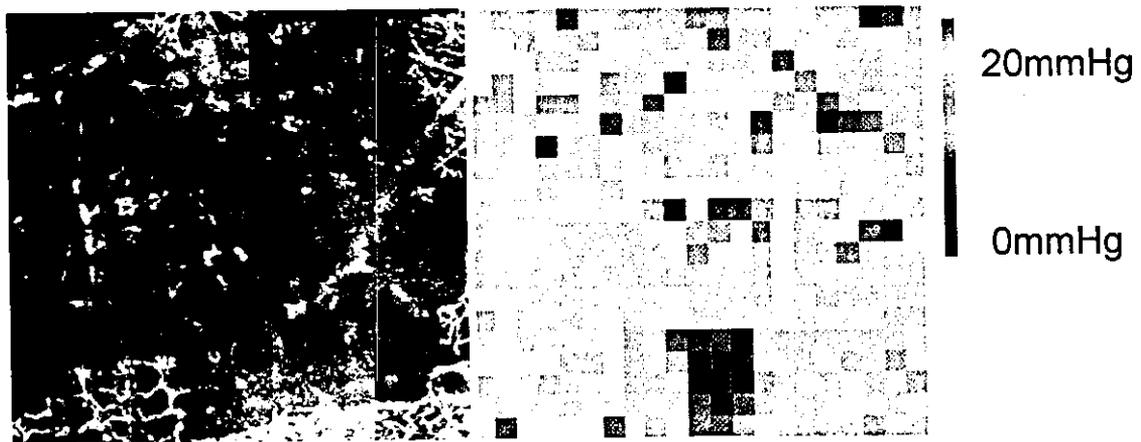


図 8 マウス背部の dorsal skin fold chamber 内に観測された新生血管構築状態とその拡大図  
 正常血管に比べ腫瘍新生血管では複雑で不定形の血管形態が観測される。



Blood vessels of VEGF Model and pO<sub>2</sub> Map

図 9 マウス背部の dorsal skin fold chamber 内に観測された新生血管網（左図）と  
 血管内および周辺組織における酸素分圧マップ