

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 孝祐 慶応義塾大学医学部 医化学教室 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。本年度までの研究で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してきた。本研究で構築したシステムは脳だけではなく、顕微鏡ステージに展開可能な臓器であれば応用が可能である点は特徴の一つとして挙げられる。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。本年度は多臓器観察への応用を検討し、その中でも肝微小循環に関する実験成果を報告する。

A. 研究目的

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。

本研究ではこれまでに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してきた。本計測系の脳以外の臓器への応用を検討すべく、出血性ショックモデルにおける肝微小循環計測を実施し、その有用性を検討した。

B. 研究方法

B-1 血流の可視化・解析システムの確立

図1は本研究課題において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慶應義塾大学動物実験委員会の承認を受け (No.1756), 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ーションを行い, それぞれ血圧測定および薬品投与に使用した。腹部を正中切開し, さらに横切開を加え肝臓を露出し, アクリルステージに呼吸運動の肝臓への伝導を抑制しながら展開した。肝臓表面は温度を 37°C にコントロールしながら PBS を灌流した。出血性ショックモデルは大腿動脈から 0.7 ml/min で脱血を行い, 血圧 40 mmHg を 15 分間維持し, その後保存ヒト赤血球を Hct 50% に調整し大腿静脈から 1.2 ml/min の速度で輸血した。

B-3 血流・酸素分圧計測方法

肝微小循環血流は赤血球を 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

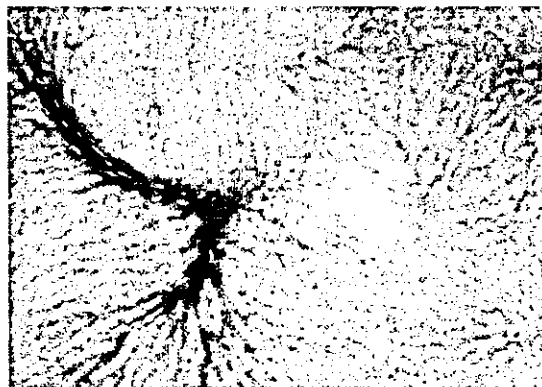


図 2 肝微小循環血流の解析

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)に代入することで定量化した。

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

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

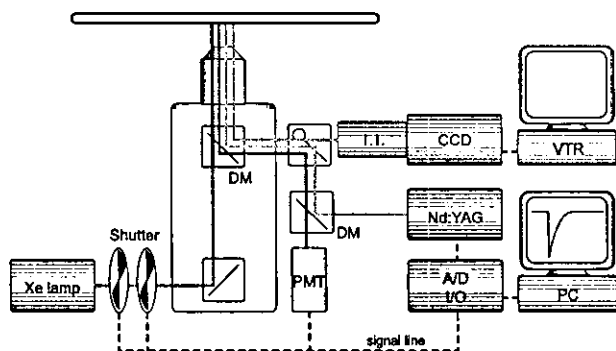


図 1 微小循環-組織酸素代謝計測システム (倒立顕微鏡タイプ) のシステム略図

光寿命, K_q は Stern-Volmer 定数である.

C. 研究結果

各計測パラメータの精度・妥当性については昨年報告したので割愛する. 脳組織における酸素代謝を時系列的に評価するために, ラット脳微小循環を対象とした出血性ショックモデルにおける血流・酸素分圧の変化を同一プロトコールにおいて実験した. 図3に急性出血性ショックおよび返血蘇生時の血圧, 心拍数, 中心静脈肝臓微小循環動態と酸素分圧変化の変化を示した. 肝臓中心静脈血流速度は血圧とほぼ同様に低下し, 同様にして酸素分圧は血圧の変化に呼応していた. 血流, 酸素分圧は輸血後 15

分後にはベースライン値まで回復する様子が観察された.

D. 考察

微小循環はエネルギーを得るための酸素やその他栄養物の運搬を行い, 生命現象の恒常性維持に非常に重要な役割を担っている. 従って微小循環における血流障害は直接組織への酸素供給に影響を及ぼすことになる. 本研究課題においてマイクロ・ナノスケールの微小循環レベルの血流動態や酸素代謝の計測は従来にない精度・確度で可能になったといえる. 昨年度までの本研究でラット大脳皮質における脳微小循環調節機構の解析のために脳微小循環動態

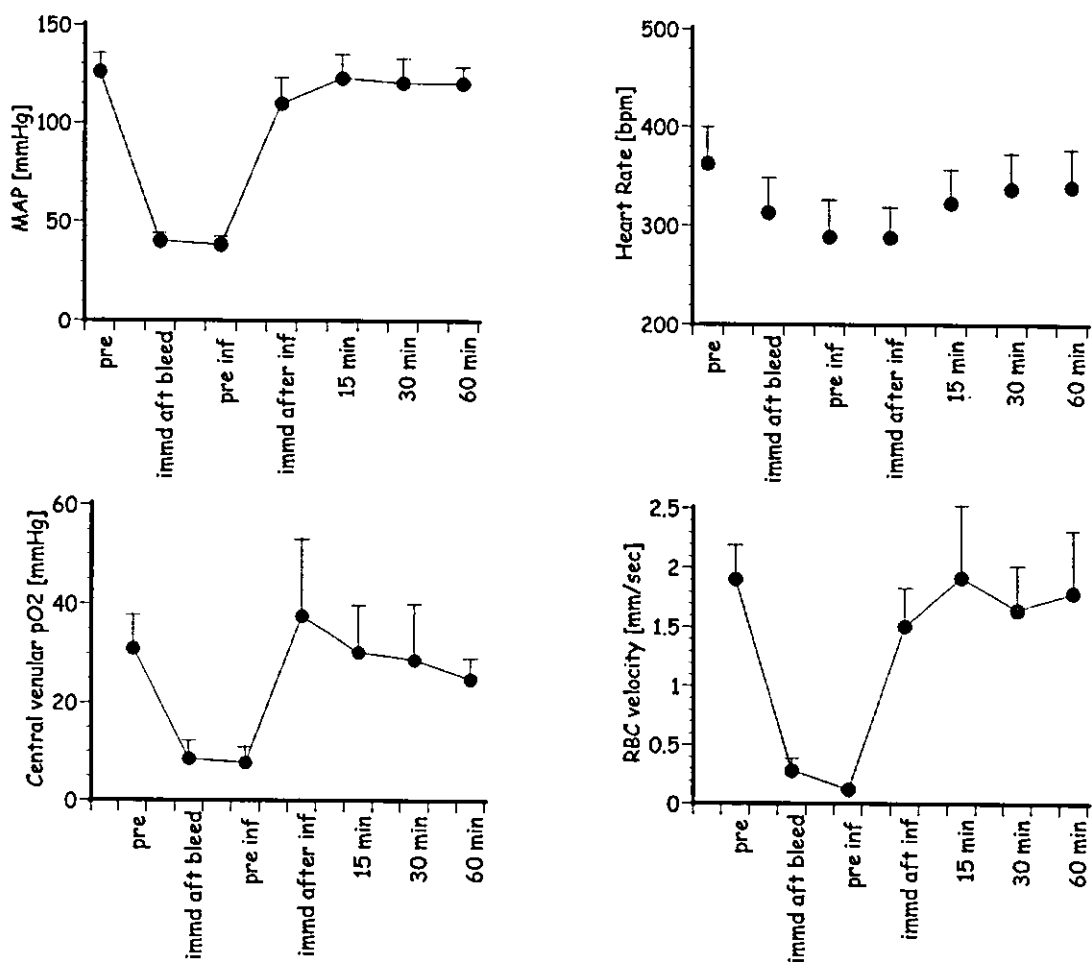


図3 出血ショックモデルにおける血圧 (上段左), 心拍数 (上段右), 中心静脈酸素分圧 (下段左) 中心静脈血流速度 (下段右) の変化

と微小血管内酸素濃度の同時計測が可能な方法を提案し、脳局所酸素代謝計測の定量評価を可能にした。また、血流・酸素分圧の微小循環パラメータに加えて脳細胞内ミトコンドリアの NADH 蛍光から虚血の指標を得る検討を加えた。血流・酸素分圧は微小血管内の情報であり、即ち酸素を供給する側の情報であるが、それに対し、虚血の指標とした NADH 蛍光は脳細胞内のミトコンドリアから発せられたものであり、酸素受給側の酸素代謝レベルを表すものと位置付けられる。本年度はそれを肝微小循環計測に応用し、脳以外の多臓器へのシステム応用に関して検討を加えた。NADH 蛍光の肝臓への応用は、血液中のヘモグロビンによる吸収が著しいために困難であった。これは今後の検討課題とする。

E. 結論

本研究を総すると、臓器微小循環酸素代謝を定量的に解析するためにポルフィリン色素の光化学反応を利用した非接触かつ連続的な酸素分圧計測法の生体計測への応用を提案し、その基礎的実験を行うと共に生体計測を実施することで有効性を検討した。今回施行した出血ショック・返血蘇生実験の他、臓器虚血・再灌流実験による虚血再灌流障害の検討への応用、また各病態モデル実験への応用が可能である。

F. 健康危険情報

特になし。

G. 研究発表

G-1 論文発表

- 1) 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*, 96(4),

1561-8, 2004.

- 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*, vol. 210(3), pp. 200-204, 2004
- 3) 塚田孝祐: 低酸素のバイオイメージング, 別冊医学のあゆみ「レドックス」, 印刷中

G-2 学会発表

- 1) 塚田孝祐, 末松 誠, 南谷晴之: 脳局所微小循環レベルにおける酸素代謝の光学的解析法, 第 11 回日本血液代替物学会年次大会, 2004-7 (札幌)
- 2) 塚田孝祐, 菅沼和弘, 米谷 隆, 南谷晴之, 末松 誠: α -NO ヘモグロビン含有赤血球の出血性ショックに対する微小循環改善効, ナノメディシン公開シンポジウム, 2004-12 (東京)
- 3) Tsukada K., Suganuma K., Yonetani T., Suematsu M.: T-state stabilization of hemoglobin allostery: A potential therapeutic stratagem for post-ischemic organ microvascular damages, *6th Asian Congress for Microcirculation*, 2005-2, (Tokyo)

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし。

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 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 鈴木弘美 藤田保健衛生大学総合医科学研究所難病治療研究部門 助手

研究要旨

アルツハイマー病などの神経変性疾患、脳梗塞、脳腫瘍などの種々の脳疾患ではミクログリアが活性化し疾患部分に集積することから、神経細胞の変性や生存維持に対する関連性が注目されている。ミクログリアが、脳内において休止型から活性型に形態変化すると末梢型ベンゾジアゼピン受容体(PBR)が発現することが知られており、ポジトロン CT (PET) で PBR を画像化すれば、神経変性部分や障害の状態の診断が可能となる。今回我々は、Ethanol Injury モデルを作成して活性化したミクログリアを PBR 製剤と動物用 PET でイメージングを行った。

A. 研究目的

アルツハイマー病 (AD) やパーキンソン病などの神経変性疾患ではミクログリアが病変部に集積し活性化していることが知られている。最近、病変部に集積し活性化するミクログリアの一部が神経障害性を発現 (毒性転換) し病態形成に重要な役割を果たしていることがわかってきた。一方、ミクログリアが休止型から活性型に変化すると末梢型のベンゾジアゼピン受容体 (PBR) が発現するが、PBR の発現とミクログリアの毒性転換に関連性が深いことが示唆されている。したがって、生体内で PBR の発現をモニタリングできれば神経変性疾患の早期診断が可能となると考えられる。ポジトロン CT (PET) は生体内の分子レベルの生理的な体内動態を非侵襲的に評価可能な方法である。脳内の活性型ミクログリアは動物で組織化学的に評価できるが、PET を使えば生体内で繰り返し検査が可能であり、経時的な変化も観察できるため、種々の神経疾患の新

規な早期診断法が確立できる可能性を持っている。近年の技術の進歩により、小動物専用の高解像度、高感度の装置が開発され、動物実験での利用も進んでいることから、脳内のミクログリアを活性化するラットモデルを作製し、PET と PBR 製剤により毒性転換した活性型ミクログリアを生体内で画像として評価可能かどうか検討した。

B. 研究方法

8週齢雄 Wistar ラット (体重 220-260g) にペントバルビツール系薬剤を腹腔内注射で麻酔を施し、脳定位固定装置へ使用して頭部を固定した。歯科用ドリルで Bregma より右 2mm 部分に穴を開け、エタノール 8 μ l を注入し、線条体部分に傷害部分を作製しモデルとした。脳内に傷害を作製した後、3 日後麻酔下に 1.5T MRI 装置にリストコイルを使用し、T2 強調像を撮像して線条体の障害の程度を評価した。術後 4 日目で

麻酔下に、 ^{14}C -PK11195 12~41MBq を尾静脈注射し、動物用 PET 装置で 60 分間ダイナミックスキャンを実施した。PBR の定量的評価として、小脳を参照部位とし、線条体の normalized distribution volume (NDV) (min) を算出し、比較した。コントロールとしてエタノールを注入していないラットについても同様に動物用 PET で評価した。

C. 研究成果

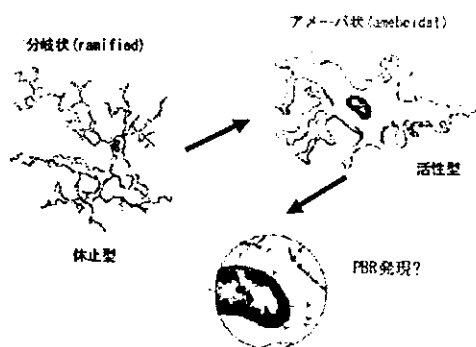


図1 ベンゾジアゼピン受容体 (PBR) の発現機序 (左) と Ethanol Injury モデルの HE 染色画像 (右上下)

ベンゾジアゼピンはミトコンドリア表面に存在し、ミクログリアが活性化すると細胞膜表面にレセプターを発現する (左)。

エタノールによる損傷が MRI で確認できたラットの注入側では非注入側に比べて、動物用 PET での撮像画像から PBR 結合量を定量的に観察すると有意な増加があることがわかった。また、同動物組織を用いた免疫染色ではエタノール注入側の線条体には活性化した形態を示すミクログリアを多く認め、動物用 PET の所見と一致していることから、PBR 結合の増大は活性型のミクログリアが損傷部位に集積している可能性が示唆された。

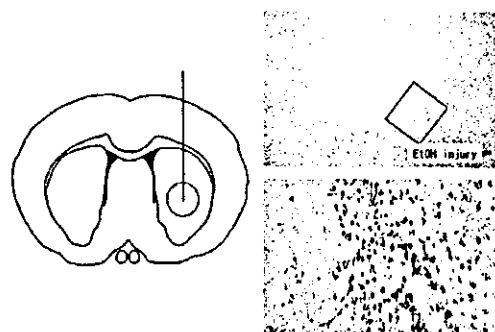


図2 Ethanol Injury モデルの作製方法
線条体部分に直接 Ethanol を注入することにより傷害を作製する Ethanol 注入部分は HE 染色にて白く抜けた画像を観察できる。(右上写真)
注入部と正常組織の境界部分を拡大すると細胞の集積を観察できる。(右下写真)

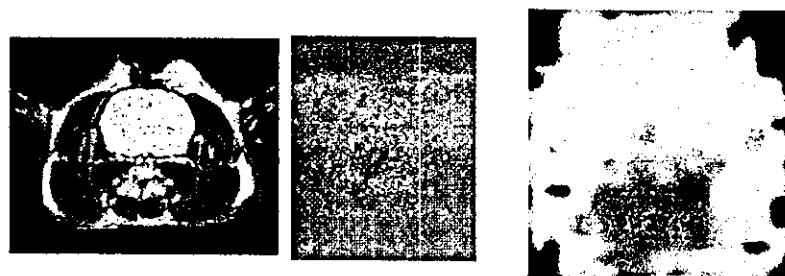


図2 Ethanol Injury モデルの MRI 画像 (左) と障害部分に集積したミクログリアの免疫染色 (中) と PET 画像 (右)

Ethanol Injury モデルを MRI で撮像すると障害部分を観察でき (左)、同動物サンプルにて免疫染色を行うとミクログリアが集積している様子が観察された (中)。

PET 画像においても細胞の集積を観察した部分に PBR 結合量が増加している様子が観察された (右)。

D. 考察

Ethanol Injury 動物モデルにおいて ^{11}C -PK11195 と動物用 PET で PBR を画像化すると、脳内でミクログリアが活性化する状態を評価できることがわかった。ミクログリアはその細胞の性質から脳内で神経変性や細胞障害がある部位に集積して活性化されることが知られている。したがって、PET を用いて PBR 結合能を撮像すれば脳疾患部位の非侵襲的な診断が可能となる。

我々は蛍光標識をしたミクログリアを血管注入した動物に一過性前脳虚血を起こして脳内に侵入したミクログリアの動態を調べたところ、外来性に脳に浸潤したミクログリアは特異的に神経傷害部位に集積することを確認している。一方、ミクログリアは高い貪食能を持つため蛍光マイクロビーズなどの人工物を効率良く取り込み細胞の標識ができる。そこで、脳に導入する前に金属微粒子マグネタイトを取り込ませたミクログリアをラットの頸動脈に注入すると、MRI により撮像することによって脳の病変部の非侵襲モニタリングにも応用できることも判った。さらに、投与前に細胞に特殊な処理を施すことで神経損傷や脱落を抑制し、神経修復を増強することも明らかになった。この性質を利用すると脳への特異的ドラッグデリバリーシステムが構築できるだけでなく、細胞導入によって神経再生、修復が可能となることが考えられる。また、今回のシステムと MRI による非侵襲モニタリングを組み合わせることによってミクログリアを用いた脳・神経系を標的化した脳疾患の診断や治療の精度や有効性を改善できる可能性があると考えられる。

E. 結論

ミクログリアの活性化にはいくつかの異なる状態が存在し、その一部が神経障害性を発揮して病態形成に深く関与していることがわかってきた。このミクログリアの活性化の状態の違いと PBR の結合能とに関連がある可能性があるが、これまでは全くわかっておらず、また PBR 製剤の脳内での結合部位について詳細に検討した報告が無いので、脳内結合部位の特定とミクログリアの活性化の状態の判定を行った本研究により、これまで漠然と「活性化ミクログリアの集積部位=病変部位」という考え方に基づいた PET 技術からミクログリアの活性化の状態を識別できる診断技術への発展が期待できると考えられる。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

(原著)

1. Himeda T, Ohara Y, Asakura K, Kontani Y, Murakami M, Suzuki H, Sawada M. A lentiviral expression system demonstrates that L(*) protein of Theiler's murine encephalomyelitis virus (TMEV) is essential for virus growth in a murine macrophage-like cell line. (2005) *Virus Res.* Mar;108(1-2):23-28.
2. Imamura K, Hishikawa N, Ono K, Suzuki H, Sawada M, Nagatsu T, Yoshida M, Hashizume Y. Cytokine production of activated microglia and decrease in neurotrophic factors of neurons in the hippocampus of Lewy body disease

brains. Acta Neuropathol (Berl).
(2004)

(解説・著書)

1. 鈴木弘美, 澤田 誠: 脳機能障害とミクログリアのかかわりおよび細胞を用いた標的化治療・診断 医学のあゆみ No. 210(3); 187-190, 2004

(国内学会)

1. 鈴木弘美, 小野健治, 澤田 誠(2004) 脳・神経系に特異的な細胞浸潤のイメージング, 第31回東海遺伝医療・再生医療研究会・名古屋, 7, Feb.
2. 小野健治, 吉原 賢, 鈴木弘美, 澤田 誠(2004) 骨髄移植初期に脳内へ移行する細胞の性質に関する解析, 第31回東海遺伝子・再生医療研究会, ・名古屋・7, Feb
3. 外山 宏, 鈴木弘美, 澤田 誠, 旗野健太郎, 加藤隆司, 伊藤健吾(2004) ラット脳における¹¹C-PK11195 と動物用 PET による活性型ミクログリア画像化の試み 日本核医学会 第58回中部地方会・名古屋, 21, Feb.

4. 澤田 誠, 鈴木弘美(2004) ミクログリアの脳保護作用と毒性転換. 生体防御機能異常ワークショップ - 2004 第7回肝臓生物学研究会合同大会・沖縄, 17-18, June.
5. 小野健治, 鈴木弘美, 澤田 誠(2004) 骨髄移植後初期に脳内へ移行する未分化骨髄細胞の性質に関する解析, 第27回日本神経科学大会・第47回日本神経化学学会大会合同大会 (Neuro2004)・大阪, 22-26, Sep.
6. 今井文博, 鈴木弘美, 二宮 敬, 澤田 誠(2004) 脳親和細胞を用いた脳虚血性疾患に対する細胞治療の開発・名古屋, 6-8, Oct.
7. 外山 宏, 工藤 元, 旗野健太郎, 鈴木弘美, 小野健治, 澤田 誠, 加藤隆司, 伊藤健吾(2004) ラット脳における¹¹C-PK11195 と動物用 PET による活性型ミクログリア画像化の試み, 第44回日本核医学会総会, 京都, 4-6, Nov.

H. 知的財産権の出願・登録状況
なし。

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 国立感染症研究所生物活性物質 室長

研究要旨 ナノイメージングによる血管炎発症にかかわる因子を解析した。バイオイメージングによる生体内の動態を *in vivo imaging* により解析した。本年度は、活性化好中球表面に発現する CD69 の関与をイメージング解析した。CD69 ノックアウトマウスでは、活性酸素誘導の血小板凝集が遅延し、血管炎発症への影響が認められた。また、好中球の活性化により、表面に CD69 分子の局在移行が確認された。これらの結果から、好中球活性化による CD69 分子の表面出現が、血管炎発症初期課程に関与していると推定される。

A. 研究目的

血管炎発症初期の分子機構をナノイメージングによって解析することを目的とした。

血管炎（関節リウマチ(RA)、全身性エリテマトーデス(SLE)等)の疾患の患者の血中には、myeloperoxidase を抗原とする MPO-ANCA 自己抗体に加え、抗 CD69 自己抗体が検出されている(X. Yu, *et al.* *J. Immunol.* 166: 1360-1369, 2001)。また、RA 患者においては、滑膜中、末梢血中の好中球の CD69 分子が細胞膜上に表出していることが報告された(Atzeni *et al.* *Clin Exp Rheumatol.* 22:331-334, 2004)。一方、抗タイプ II コラーゲン抗体の静脈注射により誘導される関節炎が、CD69 欠損(CD69-KO)マウスでは発症せず、滑膜に好中球が浸潤しないが、野生

型(WT)マウス由来の好中球を静脈注射すると滑膜での炎症が発生することから、活性化好中球の CD69 分子が炎症反応に関与している可能性が示唆されている(Murata *et al.* *Int Immunol.* 115:987-92, 2003)。この様に、好中球に発現する CD69 分子と炎症との関連を示唆するものである。すなわち、血管炎の発症の要因に、活性化した好中球の関与が指摘されている(Arimura, Y., *et al.* *Clinical Nephrol.* 40, 256-264, 1993, L. Harper *et al.* *Arthritis Rheumatism* 44:921-930, 2001)。

そこで、本年度は、CD69-KO マウスを使って、CD69 分子が血管炎発症や病態とどのように関わっているかを血管炎の発症率により調べた。また、本分子が血管炎発症に関与する血小板凝集にどのよ

うに影響しているかを調べた。また、好中球の活性化これらの現象が、活性化した好中球での CD69 の挙動に依存している可能性が大きいことから、炎症性サイトカインや走化性因子で好中球を刺激して活性化させ、CD69 分子の細胞膜表面への移行・局在について共焦点レーザー顕微鏡、斜光照明蛍光顕微鏡を用いてイメージング解析した。

B. 研究方法

1) CD69-KO マウスにおける活性酸素誘導の血栓形成の遅延

光感受性物質に光を照射し血中に活性酸素を発生させ、FITC デキストランにより血流を観察する状況下でビデオ映像を取得し、血栓形成による血流遮断時間を測定した。

2) コンフォーカル顕微鏡での CD69 の局在観察

健常者末梢血から比重分離法によって好中球を分離し、スライドグラス上に直径 7 mm 孔ラバープレート張り付けた well に、好中球を 37°C、10min で粘着させた。その後、PMA(100ng/ml)、FMLP (fMet-Leu-Phe, 1 μ M)、TNF α , PMA (100 ng/ml), FMLP (1 μ M), TNF- α (20 ng/ml), IL-1 β (20 ng/ml), or CAWS (*Candida albicans* water soluble fraction、カンジダ標準株 IFO1385 由来, 100 μ g/ml)を各 well に添加し、37°C、10min で加温した。刺激後、直ちに 1%パラホルムアルデヒドで固定し、FITC 標識抗 CD69 抗体で染色

して観察した。

3) 斜光照明蛍光顕微鏡を用いてイメージング解析

健常者末梢血液から分離したヒト末梢好中球 (2.0 \times 10⁷cell/ml) を BSA in PBS(0.001%)を入れたスライドガラスチャンバー (5 mm 径) に接着させ、PMA(1 μ g/ml)、FMLP(1 μ M)を添加し、抗 CD69 抗体-Cy5 標識を終濃度 4 nM になるように添加し、検鏡した。

(倫理面への配慮)

動物実験にあたっては、国立感染症実験動物計画委員会の動物愛護の指針にもとづいて行った。

C. 研究結果

1) CD69-KO マウスにおける活性酸素誘導の血栓形成の遅延

また、最終年度は、CD69-KO マウスでの血栓形成についても検討し、血管内への活性酸素誘導の血栓形成による血流遮断の有意な遅延が生じた (図 1)。

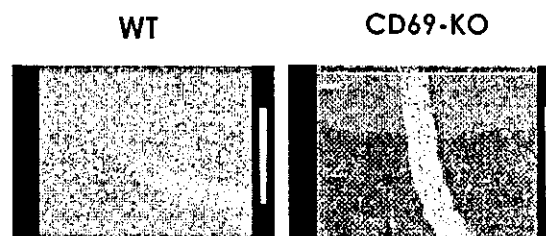


図 1. CD69-KO マウスにおける ROS 誘導の血栓形成の遅延
誘導 3 分後のムービーの 1 カット

2) CD69 分子の好中球細胞膜局在変化

コンフォーカル顕微鏡を用いて、その後、PMA、FMLP、TNF α 、IL-1 β 、CAWS の刺激によって活性化した好中球の細胞表面に局在する CD69 を解析した。その結果、CAWS を除く、PMA、FMLP、TNF α 、IL-1 β のいずれの刺激によっても、CD69 が好中球表面に表出した (図 2)。

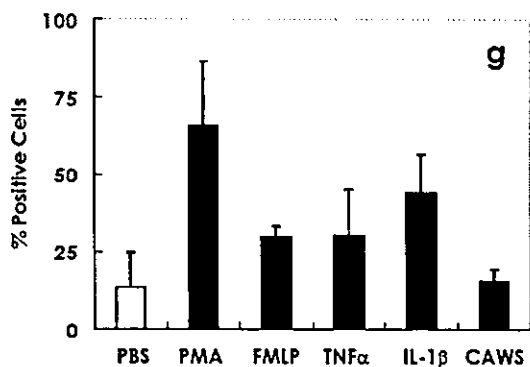
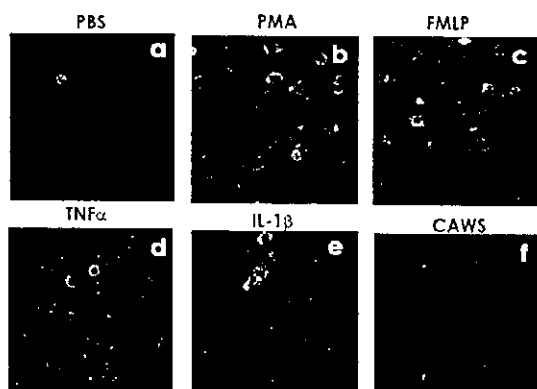


図 5. CD69 分子の好中球細胞膜局在変化

各刺激剤で活性化したときの CD69 の細胞表面への移行

a: PBS, b: PMA, c: FMLP, d: TNF α , e: IL-1 β , f: CAWS の刺激による表出画像。
g: 陽性細胞率

3) 斜光照明蛍光顕微鏡を用いてイメージング解析

初期反応をしらべたところ、40 秒ですでに細胞表面に移動していたが、それ以後は、バックの蛍光が上昇し、再度検討する必要がある (図 4)。

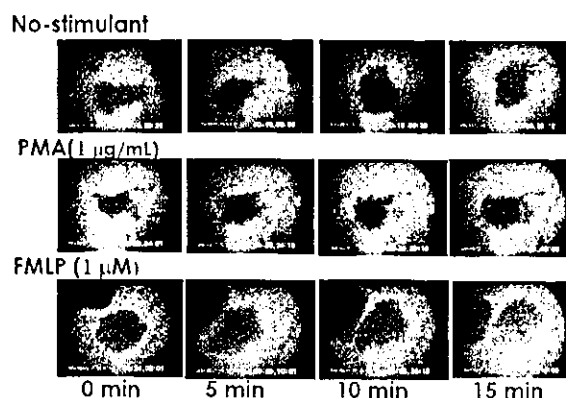


図 4. 斜光照明蛍光顕微鏡を用いた CD69 分子の好中球表面への移行のイメージング解析

D. 考察

血管炎モデルマウスおよび臨床研究の結果から、MPO および MPO-ANCA 産生が血管炎の発症誘導に不可欠であること、また、炎症性サイトカインが血管炎の発症に連動し、特に、TNF- α および IL-1 β が重要であることが明らかになってきている。また、これらのサイトカインによって活性化された好中球が血管炎の発症に関連していることが推定されており、好中球の活性化状態にかかわる MPO と MPO-ANCA に加え、好中球内分子の役割が重要であると考えられていた。

本研究では、1) CD69-KO マウスにおける活性酸素誘導の血栓形成の遅延、2)

CD69 分子の好中球細胞膜局在変化について解析した。

CD69 分子が細胞膜周囲に局在したことが認められた。この結果は、活性化好中球表面に出る CD69 分子が、炎症性サイトカインレベルの上昇と連動しておこったと推定される。

in vitro において、ヒト末梢血好中球が、好中球走化性因子 fMet-Leu-Phe、炎症性サイトカイン TNF- α および IL-18 で刺激した細胞表面に CD69 分子が細胞膜周囲に表出したことが認められことから、好中球の活性化によって表面に存在する CD69 分子が血栓形成を誘導すると推定される。

E. 結論

本研究は、ナノプローブによるバイオイメージング法による血管炎の発症機構の解析を行った。血管炎発症に関する因子の解析では、新たに好中球 CD69 の局在変化を解析することができた。また、本分子が血栓形成に関っていることも明らかとなり、活性化好中球が血管炎発症に関与していることがわかった。本研究で使用したバイオイメージングによる生体内の動態の解析技術は、*in vivo imaging* としてわれわれが提唱してからそれほど時間も経っていないが、急速に種々の生体機能に欠かせない方法として定着しはじめている。

本研究は、大川原明子（国立感染症研）、村山研（国立感染症研、東京理科大・理工）、

長尾朋和（国立感染症研、現コーネル大・医[ニューヨーク]）、松村実美子（国立感染症研、慶應大・院理工）、高橋啓、大原関利章、直江史郎（以上東邦大・医・大橋病院・病理）、長谷川明洋、村田薫、中山俊憲（以上千葉大院医）、三浦典子、大野尚仁（以上東京薬大・薬）、船津高志、山岸舞（以上東京大院薬）、南谷晴之（慶應大・院理工）、新井孝夫（東京理科大・理工）の多数の施設の先生方の協力によった。

F. 研究発表

1. 論文発表

1. T. Oharaseki, Y. Kameoka, F. Kura, A.S. Persad, K. Suzuki, S. Naoe. Susceptibility loci to coronary arteritis in animal model of Kawasaki disease induced with *Candida albicans*-derived substances. *Microbiol.Immunol.* 49: 181-189, 2005.
2. A. Hoshino, K. Fujioka, T. Oku, S. Nakayama, M. Suga, Y. Yamaguchi, K. Suzuki, K., M. Yasuhara, K. Yamamoto. Quantum dots targeted to the assigned organelle in living cells *Microbiol. Immunol.* 48: 985-994, 2004
3. N. Nagai-Miura, Y. Shingo, Y. Adachi, A. Ishida-Okawara, T. Oharaseki, K. Takahashi, S. Naoe, K. Suzuki and N. Ohno. Induction of

- Coronary Arteritis with Administration of CAWS (*Candida albicans* Water-Soluble Fraction) Depending on Mouse Strains. *Immunopharmacol. Immunotoxicol.* 26:527-543, 2004.
4. Y. Kameoka, A. S. Persad and K. Suzuki. Genomic variations in myeloperoxidase gene in the Japanese population. *Jpn. J. Infect. Dis.* 57: S12-13, 2004
 5. Y. Aratani, F. Kura, H. Watanabe, H. Akagawa, Y. Takano, K. Suzuki, M.C. Dinauer, N. Maeda, and H. Koyama. In vivo role of myeloperoxidase for the host defense. *Jpn. J. Infect. Dis.* 57: S15, 2004
 6. E. Muso, T. Ito-Ihara, T. Ono, E. Imai, K. Yamagata, A. Akamatsu, K. Suzuki. Intravenous immunoglobulin (IVIg) therapy in MPO-ANCA related polyangiitis with rapidly progressive glomerulonephritis in Japan. *Jpn. J. Infect. Dis.* 57: S17-18, 2004
 7. Shiohara A, Hoshino A, Hanaki K, Suzuki K, and Yamamoto K. On the cyto-toxicity caused by quantum dots. *Microbiol.Immunol.*48:669-676, 2004.
 8. Ito, M., Nagata, N., Yumoto, F., Yamagoe, S., Suzuki, K., Adachi, K. and Tanokura, M.: ¹H, ¹³C, ¹⁵N resonance assignments of the cytokine LECT2. *Journal of Biomolecular NMR* 29:543-544, 2004.
 9. C. Ovejero, C. Cavard, A. Perianin, T. Hakvoort, J. Vermeulen, C. Godard, M. Fabre, P. Chafey, K. Suzuki, B. Romagnolo, S. Yamagoe, C. Perret. Identification of the leukocyte cell-derived chemotaxin2 (LECT2) as a direct target gene of β -catenin in the liver. *Hepatology* 40:167-176, 2004.
 10. T. Saito, A. Okumura, H. Watanabe, M. Asano, A. Ishida-Okawara, J. Sakagami, K. Sudo, Y. Hatano-Yokoe, T. Abo, Y. Iwakura, K. Suzuki, and S. Yamagoe. Increase of Hepatic NKT Cells in LECT2-Deficient Mice Contributes to Severe Concanavalin A-Induced Hepatitis. *J Immunol.* 173:579-585, 2004.
 11. S. Suzuki, K. Honma, T. Matsuyama, K. Suzuki, K. Toriyama, K. Yamamoto, K. Miyazaki, M. Nakamura, K. Yu, A. Kumatori. Critical roles of Interferon regulatory factor-4 in CD11b^{high}CD8⁻ dendritic cell development *Proc Natl Acad Sci USA.* 101:8981-8986, 2004.

12. A. Ishida-Okawara, T. Ito-Ihara, E. Muso, T. Ono, K. Saiga, K. Nemoto, K. Suzuki. Neutrophil contribution to the crescentic glomerulonephritis in SCG/Kj mice. *Nephrol., Dial. Transplant.* 19:1708-1715, 2004.
13. Ohashi, Y.Y., Kameoka, Y., Persad, A.S., Kohi, F., Yamagoe, S., Hashimoto, K., and Suzuki, K.. Novel missense mutation found in Japanese patient with myeloperoxidase deficiency. *Gene* 327: 195-200, 2004.
14. Hoshino, A., Hanaki, K., Suzuki, K. and Yamamoto, K., Applications of T-lymphoma labeled with fluorescent quantum dots to cell tracing markers in mouse body, *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 314: 46-53, 2004.

和文発表

1. 鈴木和男「バイオイメージングが切り開く新たな診断・治療評価技術」
医学のあゆみ 210巻 171
2. 長尾朋和、鈴木和男「血管炎初期反応のイメージング」*医学のあゆみ* 210巻 196-199
3. 長尾朋和、村山 研、越尾 修、大野尚仁、三浦典子、高橋 啓、馬淵綾子、南谷晴之、鈴木和男 腎臓血管傷害のイメージング
PharmaMedica 22: 185-189, 2004
(医療薬学雑誌)

2. 学会発表
国際会議

1. Kazuo Suzuki, Eri Muso, Shigeto Kobayashi, Toshiko Ito-Ihara, David Scott, Richard Watts, Oliver Flossmann, Suzanne Lane, and David Jayne. Japan-UK Vasculitis Epidemiology Study - First meeting, Emmanuel College, Cambridge, UK
2. Aratani, Y., Kura, F., Watanabe, H., Akagawa, H., Takano, Y., Suzuki, K., Dinauer, M., Maeda, N., and Koyama, H: In vivo role of myeloperoxidase for the host defense. The 4th international Peroxidase Meeting, October, 2004 (Japan).
3. Suzuki K, Muso E, Nauseef WM: Contribution of peroxidases in host-defense, diseases and cellular functions. The 4th International Peroxidase Meeting, Joint with the 10th Myeloperoxidase Meeting 2004.10.27-30 (Kyoto)
4. Muso E, Ito-Ihara T, Ono T, Imai E, Yamagata K, Akamatsu A, Suzuki K: Intravenous immunoglobulin (IVIg) therapy in MPO-ANCA related polyangiitis with rapidly progressive glomerulonephritis in Japan 2004. The 4th International Peroxidase Meeting, Joint with the

10th Myeloperoxidase Meeting
2004.10.27-30, Kyoto

5. Akiyoshi Hoshino, Akiko Ishida-Okawara, Toshiko Ito-Ihara, Eri Muso, Masato Yasuhara, Taeko Dohi, Kenji Yamamoto, and Kazuo SUZUKI Fluorescent labeling of cells and biomolecules with nanocrystal quantum dots - MPO expressed on surface of activated neutrophils with Quantum dot-conjugated antibody. 4th International Peroxidase Meeting. Oct 27-30, 2004, Kyoto

国内会議

1. 村山研、長尾朋和、鞍馬秀輝、長谷川明洋、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 34 回京都腎臓免疫研究会、京都、5 月 22 日
2. 宇野賀津子、猪原登志子、田原佐知子、田中麻理、米本智美、塚本達雄、深津敦司、鈴木和男、岸田綱太郎、武曾恵理 腎炎患者における末梢血リンパ球分画の IL12/IL18 への反応性の検討 第 34 回京都腎臓免疫研究会、京都、5 月 22 日
3. 猪原登志子、小野孝彦、深津敦司、北徹、鈴木和男、武曾恵理。ANCA 関連腎炎・血管炎に対するヒト免疫グロブリン(IVIg)治療 15 例における治療効果と 6 ヶ月予後の検討。第 47 回

日本腎臓病学会学術総会。平成 16 年 5 月 27 日。栃木

4. 大原関利章、横内 幸、若山 恵、三浦典子、鈴木和男、大野尚仁、直江史郎、村田久雄、高橋 啓 カンジダ誘導マウス動脈炎モデルにおける動脈炎成立過程の組織学的検討 第 93 回日本病理学会総会、2004/6/9-11、札幌
5. 活性化好中球による血管炎発症への関与—MPO-ANCA による糸球体内皮細胞傷害—生体防御機能異常ワークショップ 2004、2004 年 6 月 17-18 日 (沖縄)
6. 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、2004 年 6 月 17-18 日 (沖縄)
7. 荒谷康昭、倉 文明、渡辺治雄、高野幸枝、鈴木和男、小山秀機 ミエロペルオキシダーゼと真菌感染 生体防御機能異常ワークショップ 2004、2004 年 6 月 17-18 日、(沖縄)
8. 荒谷康昭、倉 文明、渡辺治雄、高野幸枝、鈴木和男、小山秀機 ミエロペルオキシダーゼ欠損マウスの生体防御能 第 26 回 日本フリーラジカル学会学術集会、2004 年 6 月 24-25 日 (山形)
9. 大原関利章、高橋 啓、三浦典子、大川原明子、村山 研、土田和徳、金

- 城義明、金子健二、大野尚仁、鈴木和男 川崎病類似マウス系統的動脈炎モデルにおけるヒト免疫グロブリンの治療効果の検討 第40回日本小児循環器学会総会、抄録、2004/6/30～7/2、東京
10. 村山研、長尾朋和、鞍馬秀輝、長谷川明洋、船津高志、南谷晴之、新井孝夫、中山俊憲、鈴木和男 第15回日本生体防御学会(長崎)「血管炎における活性化好中球のCD69分子」
 11. 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の粘着分子Up-regulation」 第15回日本生体防御学会(長崎)鈴木和男 第11回代替血液学会(札幌)「免疫グロブリンの血管炎抑制効果と人工化」
 12. 大川原明子、三浦典子、大原関利章、高橋 啓、岡村春樹、大野尚仁、鈴木和男「血管炎を誘導するCAWS投与初期のマウス好中球活性化とサイトカインの変動」第69回日本インターフェロン・サイトカイン学会(三沢)
 13. 小野孝彦、猪原登志子、劉寧、北徹、雑賀寛、根本久一、武曾恵理、大川原明子、鈴木和男 第16回腎とフリーラジカル研究会(京都)「好中球活性化、活性酸素産生とフィブリン沈着を介したSCG/Kjマウスにおける半月体形成機序」
 14. Youhei Koshimizu, Satoshi Yamagoe, Kazuo Suzuki, and Michiko Ohtomi. "Expression and localization of LECT2 in mouse brain 第27回日本神経科学会・第47回日本神経化学会合同大会(大阪)
 15. Akiyoshi Hoshino, Ken Murayama, Akiko Ishida-Okawara, Toshiko Ito-Ihara, Eri Muso, Noriko N. Miura, Naohito Ohno, Masato Yasuhara, Kenji Yamamoto, and Kazuo Suzuki. MPO Expressed on the Surface of Activated Neutrophils with Quantum Dot-conjugated Antibody. 第13回バイオイメージング学会学術集会11/4-6、京都)
 16. H. Sankawa, Y. Kameoka, N. Miura, N. Ohno, and K. Suzuki. Gene Expression in Splenocyte Response to CAWS Injection of Two Murine Strains. The 4th International Peroxidase Meeting Joint with the 10th Myeloperoxidase Meeting 2004. 11. 15 京都
 17. 三川 浩輝, 亀岡 洋祐, 三浦 典子, 大野 尚仁, 鈴木 和男 cDNAマイクロアレイによる血管炎惹起物質 *C. albicans* 由来菌体外多糖 第34回日本免疫学会総会・学術集会 2004. 12. 01 札幌
 18. 三川 浩輝, 亀岡 洋祐, 三浦 典子, 大野 尚仁, 鈴木 和男 cDNA

マイクロアレイ解析による血管炎に
関与する炎症性分子の遺伝子発現 第
27 回日本分子生物学会年会 2004.
12. 08 神戸

H. 知的財産権の出願・登録状況

(予定を含む。)

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

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 国立医薬品食品衛生研究所生物薬品部長

研究協力者 大幡久之 昭和大学薬学部薬理学教室助教授

研究要旨

組織細胞傷害の解析研究に応用可能な細胞内生化学現象の画像化法の開発およびその応用研究を行った。第1に細胞死のシグナルトランスダクションに関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イメージングで捉えるためのタンパク質系蛍光プローブを開発した。その結果、ミトコンドリア内および小胞体内ではカスパーゼ活性化はないものと考えられたが、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。第2に過去2年で確立した組織標本における細胞内 Ca^{2+} , pH, NO 産生等のマルチカラーイメージング法を用い、大動脈血管組織を標本として血管内皮細胞を流れ刺激下におきながら、リゾホスファチジン酸(LPA)刺激を加えることによって生じる血管収縮および血管内皮細胞傷害メカニズムを解析した。

A. 研究目的

細胞内で生じる生命現象を蛍光プローブを用いて光の変化に変換し、蛍光顕微鏡で画像解析する手法が生物学、医学領域の研究に利用され、様々な新知見を生んでいる。この解析法の利点は、生命現象を、生じている場で、二次元、三次元、さらには時間経過もあわせて四次元的に解析することが可能な点にあり、また観察の非侵襲性という特徴とあわせて、組織細胞傷害の解析研究においても極めて有用な手法と考えられる。そこで本研究では、組織傷害に関係すると考えられている細胞内生化学現象のイメージング解析法の開発を行う。今年度はタンパク質性プローブを細胞内オルガネラに局在化させ、細胞内オルガネラにおけるカスパーゼ活性化のイメージングを行うとともに、さらには Ca^{2+} , pH, NO の同時イメージングを利用して、流れ

刺激下においた血管内皮細胞傷害について解析した結果を報告する。

B. 研究方法

1. 局在化シグナルを付加したカスパーゼ活性化プローブの作製とイメージング

蛍光特性の異なる2つのGFP変異体の間にカスパーゼ3の基質となるペプチド配列(カスパーゼ3由来の配列(LDCGIETDSGVD))を挿入した融合タンパク質をカスパーゼ活性検出プローブとして作製した。GFP変異体としてはCFP, GFP, YFP, DsRed2から2種の組み合わせを選択することにより、蛍光特性の異なる6種のカラーバリエーション、CFP-GFP(CG), CFP-YFP(CY), GFP-YFP(GY), CFP-DsRed2(CR), GFP-DsRed2(GR), YFP-DsRed2(YR)のものを作製したが、さらにN末端に核局在性シ

表1 LSM510 測定条件

probe color	excitation (nm)	emission (nm)	
		donor	acceptor
CG	458	467.5-497.5	515-545
CY	458	467.5-497.5	515-545
GY	458	475-515	515-545
CR	458	467.5-497.5	560-615
GR	488	505-530	560-615

グナル, ミトコンドリア局在性シグナル, および小胞体局在性シグナルを付加した融合タンパク質の発現プラスミドを作製した。以上のタンパク質を HeLa 細胞に発現し, 主に LSM510 (Carl Zeiss) を用いて, それぞれ表1に示した波長についてマルチスキャンモードでイメージングを行った。カスパーゼの活性化は蛍光強度比の変化として検出される。画像処理, データ解析には MetaFluor (Universal Imaging) を用いた。

2. 細胞内 Ca²⁺応答, pH_i変化及び NO 産生のマルチカラーイメージング

ddY 系雄性マウス (5~8 週齢) から内皮細胞を傷つけないように注意しながら, 胸部大動脈を摘出し, 周囲に付着している脂肪組織を取り除いた後, 血流方向に沿って切り開いた。Ca²⁺ 蛍光指示薬として fluo-4/AM を負荷した組織片を自作の平行平板型チャンバーに固定し (図1), シリンジポンプから任意の流速で Krebs-Henzeliet-HEPES 溶液を灌流することによりシエラストレスを負荷した状態で, 血管組織片の蛍光画像を取得した。顕微鏡には, 従来の共焦点顕微鏡と比較して; 焦点面のみを効率よく観察できレーザーによる細胞傷害や蛍光指示薬の消光が少ない, 多光子励起レーザー走査型顕微鏡システム (Bio-Rad, RTS2000-MP) を用いて, 780 nm の多光子励起により生じる蛍光の 450 nm~600 nm をフォトマルチプラ

イヤードで検出し蛍光画像として記録した。本研究では, 蛍光画像を用いた血管応答の評価方法として収縮・弛緩反応に伴う内皮細胞の移動距離を測定した。血管組織片にフェニレフリンを適用すると, 適用と同時に組織片の収縮反応に伴う内皮細胞の移動が認められた。この内皮細胞の移動方向は, 平滑筋細胞の長軸方向に平行していた。

C. 研究結果

1. 細胞内小器官におけるカスパーゼ活性化の画像化

(1-1) 核内カスパーゼ活性化イメージング

まず, CY の C 末端に simian virus 40 large T-antigen 由来の核局在化シグナル (nuclear localization signal ; NLS) を融合した核局在型プローブ (NLS-CY) を作成した。これを HeLa 細胞に発現させ, 共焦点レーザー走査型蛍光顕微鏡を用いて観察すると, NLS-CY は核にのみ発現が認められ, 細胞質への発現は見られなかった (図2)。NLS-CY 発現 HeLa 細胞を TNF- α で曝露することによる蛍光強度変化および各蛍光強度の比 (ratio) の変化を計測したところ, 核内におけるカスパーゼの活性化による蛍光強度比変化が捉えられた。

次に, プローブの N 末端に MAP kinase kinase (MAPKK) 由来の核排出シグナル

(nuclear export signal ; NES) を融合した細胞質局在型カスパーゼ活性化検出プローブ

(NES-GR) を作成し, HeLa 細胞で発現させ, 共焦点レーザー走査型蛍光顕微鏡を用いて観察したところ, NES-GR は核を除く細胞質部分に一樣に発現がみられた (図3)。

そこで NLS-CY, NES-GR を同一 HeLa 細胞に共発現させ, LSM 510 META システムを用いて画像化, 解析を行った。LSM 510-META は, 試料から放出された蛍光をグレーティングによって分光し, スペクトルの順に 32 個の検出

器が並んだ META ディテクタによって各蛍光強度を検出するシステムであり、二つの蛍光の完全な分離が可能である。図 4 に、NLS-CY, NES-GR 共発現 HeLa 細胞に TNF \cdot α を曝露することで得られる蛍光強度比変化の典型例を示す。この細胞に発現した NLS-CY から得られる蛍光強度比は TNF \cdot α 曝露開始後 323 分から低下したのに対し、NES-GR から得られる蛍光強度比は TNF \cdot α 曝露開始後 325 分から低下した。したがって、TNF \cdot α 刺激を受けた細胞内ではまず細胞質のカスパーゼが活性化され、その後数分で核内カスパーゼが活性化されることが明らかとなった。

(1-2) ミトコンドリア内カスパーゼ活性化イメージング

CY の N 末端に subunit VIII of human cytochrome *c* oxidase 由来のミトコンドリア局在化シグナルを融合させたミトコンドリア局在型プローブ (Mito-CY) を作成し、HeLa 細胞に発現させ、共焦点レーザー走査型蛍光顕微鏡を用いて観察すると、Mito-CY は核の外側に局在が認められた。この局在はミトコンドリア局在プローブである MitoTracker Orange の局在と一致することから、Mito-CY はミトコンドリアに局在することが確認された。

MitoTracker Orange は rhodamine 骨格を持つ赤色蛍光物質であるが、ミトコンドリア膜電位が低下してもミトコンドリアからの遊離は少ない。そこで、今回の実験では MitoTracker Orange を細胞へ取り込ませることによりミトコンドリアの位置の把握を行いながら、TNF \cdot α 誘発アポトーシスにおけるミトコンドリア内カスパーゼ活性化の検出を試みた。図 5 に、Mito-CY 発現 HeLa 細胞を TNF \cdot α に曝露することで得られる蛍光強度変化および各蛍光強度の比の変化を示す。MitoTracker Orange が集積した部分を範囲指定して得られた蛍光強度の変化をミトコンドリア内発現プローブの蛍光強

度変化とし、核部分を範囲指定して得られた蛍光強度の変化を核内発現プローブの蛍光強度変化とした。核内発現プローブの各蛍光強度比は 178 分から急激な低下を示し、核内でカスパーゼの活性化が起きたことが確認された (図は省略)。一方ミトコンドリア内発現プローブの各蛍光強度比 (ratio) は、TNF \cdot α 曝露時間が経過するにしたがって低下していく傾向がみられたが、核内における ratio のグラフに見られたような急激な低下はみられなかったことから (図 5)、ミトコンドリア内ではカスパーゼの活性化が生じていないことが示唆された。

(1-3) 小胞体内におけるカスパーゼ活性化イメージング

CY の N 末端に calreticulin 由来の小胞体局在化シグナル、C 末端に ER retrieval sequence である KDEL を融合させた小胞体局在型プローブ (ER-CY) を作成し、HeLa 細胞に発現させ、共焦点レーザー走査型蛍光顕微鏡を用いて観察すると、ER-CY は細胞内に網目状に発現が見られ、小胞体への局在が示唆される蛍光像が確認された (図 6 a)。図 6 b に ER-CY-eff 発現 HeLa 細胞を TNF \cdot α に曝露することで得られる蛍光強度変化および各蛍光強度比 (ratio) の変化を示す。この細胞は、TNF \cdot α 曝露開始後 166 分に細胞萎縮が観察されたが、このとき細胞萎縮に伴う ECFP, EYFP 両者の蛍光強度上昇は検出されたが、各蛍光強度比に変化はなかった。この結果から、TNF \cdot α により活性化されるアポトーシスシグナル伝達経路中において、小胞体内のカスパーゼ活性化は生じないことが示唆された。

2. 流れ刺激下のマウス大動脈組織の内皮傷害イメージング

(2-1) 蛍光画像を用いた細胞個々の Ca²⁺応答と血管収縮・弛緩反応の同時測定

図 1 に示した自作の平行平板型チャンバーを