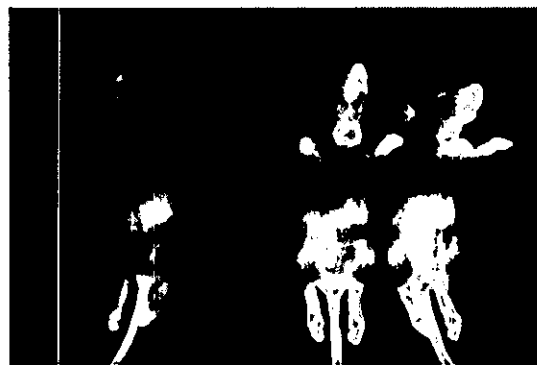
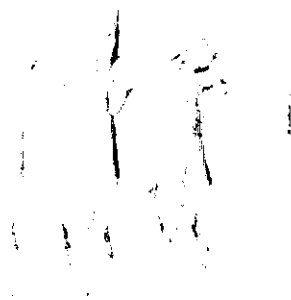


ジェチルスチルベストロールによってエストロゲンシグナルが検出された line について、生後 5 週齢の F2 ラットを作製した。F2 ラットにジェチルスチルベストロールを  $1000 \mu\text{g}/\text{kg}$  で腹腔投与し、投与 24 時間後にルシフェリンを  $150\text{mg}/\text{kg}$  濃度で腹腔投与した。ルシフェリン投与後、FUJI film 社の LAS3000 を用いて、経時的にその発光シグナルについて検出した。ルシフェリン投与 30 分後まで、ルシフェリンの発光シグナルを検出することができた。5 週齢のオスラットでは、生殖器および肝臓にエストロゲンシグナルを検出することができた。いずれも剃毛は行わなかった。



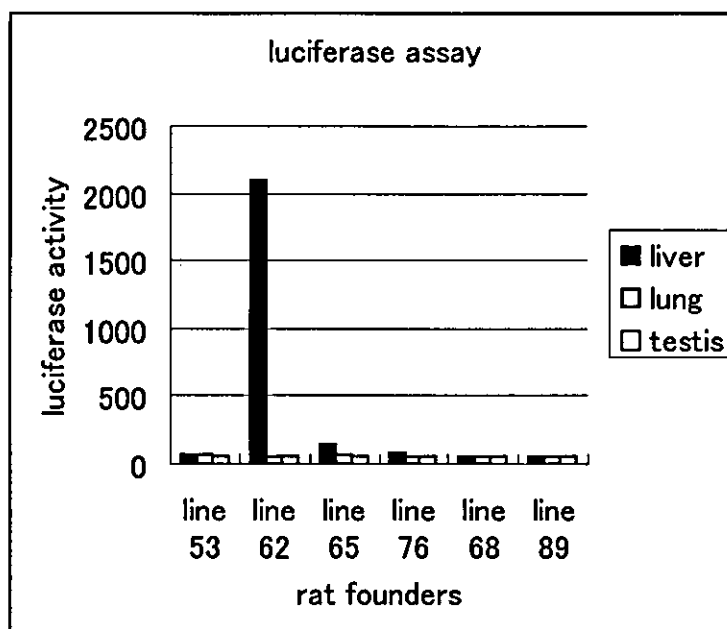
コントロール

ジエチルstilベ  
ストロール投与群

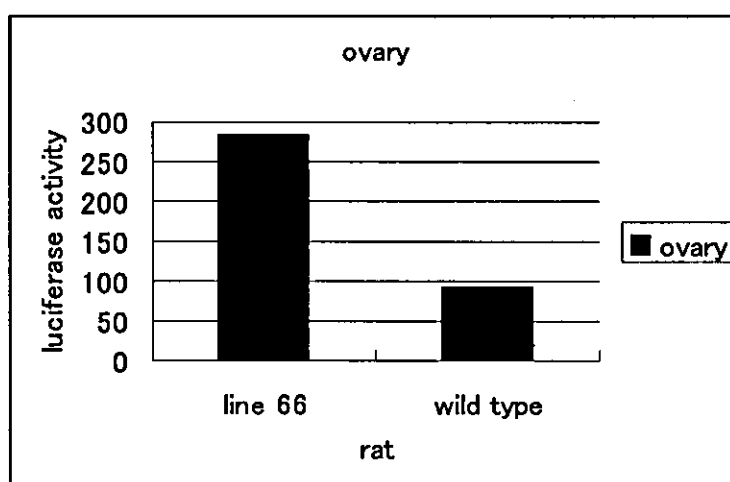
図上：16日齢ラットでは、非常に強いエストロゲンシグナルを検出することができた。



図上：16日齢ラットでは、非常に強いエストロゲンシグナルを検出することができた。16日齢では、特に、肝臓での強いエストロゲンシグナルが観察された。



オスのトランスジェニックラットにおける DES 投与後のルシフェラーゼ活性。DES 投与 24 時間後に、肝臓、肺、精巣を採取し、ホモジネート作成後、ルシフェリン曝露後の発光シグナルを *in vitro* で検出した。



メスのトランスジェニックラットにおけるルシフェラーゼ活性。性成熟したメスの卵巣を採取し、ホモジネート作成後、ルシフェリン曝露後の発光シグナルを *in vitro* で検出した。

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)  
分担研究報告書

蛍光による in vivo イメージング方法

主任研究者 石塚真由美 北海道大学大学院獣医学研究科 助教授  
(環境獣医科学講座)  
分担研究者 藤田正一 北海道大学大学院獣医学研究科 教授  
(環境獣医科学講座)

研究要旨

現在、個体レベルの in vivo 光イメージングの中で、実用化しているのはルシフェラーゼ・ルシフェリンを用いた発光イメージングである。本研究では、ルシフェラーゼを組み込んだトランスジェニックラットを作製し、細胞では解析できない個体レベルでの環境化学物質による影響を解析した。その研究の過程で、エストロゲンシグナルを可視化するために、受容体結合部位下流にルシフェラーゼ遺伝子を連結したカセットを作成し、トランスジェニックラットを作製して、neonatal 時期の脳内のエストロゲンシグナルへの影響について解析している。しかし、光拡散による局在化の限界や、深部測定の高難しさなど、ルシフェリンをシグナルとした際の in vivo イメージングの様々な問題点が明らかとなった。

一方、蛍光プローブによる個体 in vivo イメージングは、発光シグナルと異なり、3次元解析を可能にする。もし、蛍光タンパクを用いることができれば、腫瘍や再生医療、ウイルスなど、さまざまな研究分野に関して多くの情報を得ることができる。しかし、これまでのところ、代表的な蛍光タンパクである Green Fluorescent Protein (GFP)などは血管を透過しないため、深部透過性の蛍光プローブが存在しないことから、蛍光による in vivo イメージングは、体表あるいは ex vivo の解析にとどまっている。

そこで、本研究では、光イメージングによる in vivo の深部解析法について開拓することを目的とした。キシレノール・オレンジやロンダミン 123 など、Alexa750、アリザリンコンプレクソンなど、600 nm 付近以上の励起・蛍光波長を持つ蛍光色素について、in vivo

での解析が可能かどうか、その条件を検討した。これまでの研究では、より詳細な *in vivo* 解析のために、体液吸収率の低い近赤外 700nm 励起、800-900nm 蛍光の発現タンパクによる *in vivo* での深部解析が必要であることがわかった。また、同時に、通常の LED 光源では深部の測定が難しいため、*in vivo* 解析のためにハード側の光源強化も必要であることが明らかとなった。

## A. 研究目的

NIH では生命医療のイメージングとバイオエンジニアリングを目的として、NIBIB (National Institute of Biomedical Imaging and Bioengineering) を設立した。蛍光・偏光を用いた光イメージングも当然その研究対象となっており、光マンモグラフィーなど、癌診断領域などでの応用が期待されている。また、最近になって、ルシフェラーゼを組み込んだ *in vivo* 光イメージングが報告されている。

本研究では、*in vivo* での環境化学物質の毒性を検出することを目的として、*in vivo* でエストロゲンシグナルを可視化するトランスジェニックラットを作製している。この研究では、*in vivo* スクリーニングのレポーターとして、シグナルの強いルシフェラーゼを選んだ。蛍光分子に比べると発光分子の方が感度は高く、血液を透過しない短波長蛍光タンパクである Green Fluorescent Protein (GFP) に比べると、

ルシフェリンは 600nm の波長を持つ為、ある程度皮膚や血液を透過することができる。

一方、ルシフェラーゼによる *in vivo* 解析でも、実際には、以下の問題があることが明らかとなった。まず、1) 発光を利用した解析では、光拡散のため、正確な転写活性化の局在を追うことができない。また、2) 解析時にルシフェリンなど基質の投与が必要である。さらに、最も問題であったのは、3) Green Fluorescent Protein (GFP) など短—中波長の蛍光タンパクに比べればシグナルの皮膚・血管透過性は格段に上がっているが、それでも 1cm 以上深部の解析は困難であったことである。現在、*in vivo* 発光学解析で精度・感度の高い Xenogen 社の IVIS や、*in vivo* イメージャーとして開発されたベルトールド社の Night Owl でも、luciferase では深部の解析は困難であった。また、GE HealthCare より、3次元の解析も可能な *in vivo* 蛍光解析装置 (eXplore Optix) の国内販売が始まったが、ルシフェリンのような発光では、減衰係数から推測する 3次元解析も不可能である。

in vivo 解析の為には、近赤外 700–800nm の領域に励起・蛍光波長を持つ蛍光タンパクが理想的である。

現在、Green Fluorescent Protein (GFP) を筆頭にウミシイタケやイソギンチャク、スナギンチャク、ハナツタ、サンゴなどから蛍光タンパクが開発されている。現時点で in vivo 解析に使用可能な蛍光タンパク候補は、クロンテックより販売されているサンゴ由来 HcRed1 (励起 588nm、蛍光 618nm)、あるいは AsRed (励起 576nm、蛍光 592nm) である。そこで、前述の蛍光タンパクの励起・蛍光波長に似た、600 nm 付近以上の波長を持つ様々な蛍光色素を用いて、in vivo イメージングの条件について検討した。

## B. 研究方法

蛍光色素として、キシレノール・オレンジ (励起波長 570 nm、蛍光波長 610 nm)、Alexa750 (励起波長 650 nm、蛍光波長 780 nm)、ロンダミン 123 (励起波長 500 nm、蛍光波長 540 nm)、アリザリンコンプレクソン (励起波長 530–560 nm、蛍光波長 580 nm) を用いた。

キシレノール・オレンジ、アリザリンコンプレクソンはラットに生後 1 日齢より 3 日間皮下投与した。投与 1 週間後に living whole animal を撮影に用いた。

ロンダミン 123 および Alexa750 はマウスおよびラット新生仔に腹腔内投与および脳室内投与を行った。Alexa750 は

6000MN のアミノ基をもつポリエチレングリコールと結合させ、尾静脈投与も行った。

## C. 結果

キシレノール・オレンジ、アリザリンコンプレクソンは蛍光の波長が、600 nm であるルシフェリ発光波長と似ており、かろうじて血管などを通過する。骨組織に取り込まれるため、手足や尾部分の透過撮影は可能であった。しかし、生後 10 日齢では、深部におけるシグナルが弱く、撮影が不可能であった。

ロンダミン 123 について、腹腔内投与を行ったところ、シグナルが弱く、深部撮影は不可能であった。この波長域では in vivo イメージングは難しいことが分かった。

一方、最も長波長である Alexa750 は近赤外の波長を持ち、血液などを透過する。本研究では脳室内および腹腔内両方とも深部の透過撮影が可能であった (図)。Alexa750 をアミノ基を持つポリエチレングリコールに結合させ、尾静脈注射を行い、静脈撮影を試みたところ、一部血管撮影が可能であった。

## D. 考察

蛍光イメージングでは、発光では不可能であった 3 次元解析の可能性が考えられ、in vivo 光イメージングでは蛍光を用いる方が将来的に発展しうると考えている。しかし、長波長領域のライト光源および CCD

カメラ、フィルターについては、700nm程度の解析を限界とする機種が多い。アロカ社のオデッセイのように700-800nm近赤外領域のみ対象とした機種はあるが、メンバー解析を対象とし、レーザースキャン方式となっていることから、in vivoでの解析は行うことができない。一方、これまでの研究の過程で、FUJI フィルム社の好意により、光源やフィルターについて、これまでに無い長波長域の解析が可能となり、in vivo イメージングの条件についてバンドフィルターやLED光源波長などさまざまな検討を行うことができた。

in vivo 光イメージングは、米国に比べて2-3年遅れているといわれている。実際、Xenogen社のIVISやGE HealthCare社などin vivoに特化したイメージャーの国内販売は米国普及の2-3年後の販売となっている。

現在、HaloTag (Promeg社) やQdot (カンタム社) のように、in vivo イメージングのための蛍光タンパクや、蛍光色素が開発されている。しかし、HaloTagはin cellのために開発されたリガンド結合型蛍光タンパクであり、半導体量子ドットQdotはルシフェリン同様事前の投与が必要である。In vivo トラッカー用に発現タンパクとして開発されたEvrogen社のKindling-RedはKindlingによって600nmの蛍光を発する。しかし、Kindling波長が最長でも550nmであるため、in vivo 体表のみのトラッカーとしか言いえないことが考えられる。

既存の蛍光プローブがin vivoで深部測定を難しくしている理由のひとつは、蛍光のみが長波長域を持っており、励起が600nm以下のものが多いためである。また、光源ライトの強度もin vivoを想定した機種が殆ど無いため、深部測定を難しくしている。本研究では、励起光源の強化と長波長の蛍光色素を使用することで、蛍光でのin vivo撮影が可能であることが明らかとなった。既存の蛍光タンパクでは血管透過性が弱いため、さらに長波長の蛍光プローブが必要であることもわかった。

#### E. 結論

キシレノール・オレンジやロンダミン123など、Alexa750、アリザリンコンプレクソンなど、600nm付近以上の励起・蛍光波長を持つ蛍光色素について、in vivoでの解析が可能かどうか、その条件を検討した。これまでの研究では、より詳細なin vivo解析のために、体液吸収率の低い近赤外700nm励起、800-900nm蛍光の発現タンパクによるin vivoでの深部解析が必要であることがわかった。また、同時に、通常のLED光源では深部の測定が難しいため、in vivo解析のためにハード側の光源強化も必要であることが明らかとなった。

#### F. 健康危険情報 なし

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

Shaban, Z., Soliman, M., El-shazly, S., El-bohi, K., Abdelazeez, A., Kehelo, K., Kim, H., Muzandu, K., Ishizuka, M., Kazusaka, A., Fujita, S. AhR and PPAR $\alpha$  Antagonistic effects on CYP2B and CYP3A and additive inhibitory effects on CYP2C11. *Xenobiotica*. (In press)

Nikaidou, S., Ishizuka, M., Maeda, Y., Hara, T., Kazusaka, A., Fujita, S. Effect of components of green tea extracts, caffeine and catechins on hepatic drug metabolizing enzyme activities and mutagenic transformation of carcinogens. *J Vet Med Sci*. (In press)

Shaban, Z., El-Shazly, S., Abdelhady, S., Fattouh, I., Muzandu, K., Ishizuka, M., Kimura, K., Kazusaka, A., Fujita, S. Down regulation of hepatic PPAR $\alpha$  function by AhR ligand. *J Vet Med Sci*. 66(11):1377-86 (2004)

Sakamoto, K.Q., Ishizuka, M., Kazusaka, A., Fujita, S. Iodine intake as a possible cause of discontinuous decline in sperm counts: a re-evaluation of historical and

geographic variation in semen quality. *Jpn J Vet Res*. 52(2):85-94. (2004).

Kim HS, Ishizuka M, Kazusaka A, Fujita S. Alterations of activities of cytosolic phospholipase A2 and arachidonic acid-metabolizing enzymes in di-(2-ethylhexyl)phthalate-induced testicular atrophy. *J Vet Med Sci*. 66(9):1119-24 (2004).

Saito K, Sakai N, Kim HS, Ishizuka M, Kazusaka A, Fujita S. Strain differences in diazepam metabolism at its three metabolic sites in sprague-dawley, brown norway, dark agouti, and wistar strain rats. *Drug Metab Dispos*. 32(9):959-65 (2004).

Shaban Z, El-Shazly S, Ishizuka M, Kimura K, Kazusaka A, Fujita S. Related PPAR $\alpha$ -dependent modulation of hepatic CYP1A by clofibric acid in rats. *Arch Toxicol*. 78(9):496-507 (2004).

Saito K, Kim HS, Sakai N, Ishizuka M, Kazusaka A, Fujita S. Polymorphism in diazepam metabolism in Wistar rats. *J Pharm Sci*. 93(5):1271-8 (2004)

### 2. 学会発表



Shaban, Z, El-Shazly, S, 石塚真由美、  
数坂昭夫、藤田正一、Ah 受容体リガンド  
による PPAR $\alpha$  機能の抑制、環境ホルモン  
学会(2004)

PERSISTENT ORGANOCHLORINE POLLUTANTS  
AND POLYBROMINATED DIPHENYL ETHER AND  
THEIR EFFECT. 10th International  
Congress of Toxicology (2004, Finland)

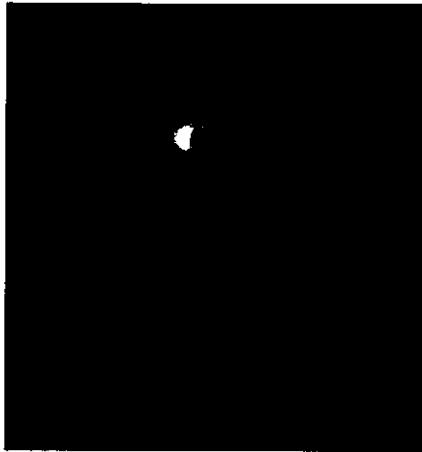
石塚真由美、高菅卓三、谷川力、数坂昭夫、  
藤田正一、野生ドブネズミに蓄積する環境  
汚染物質と生体影響の genomics 解析、環  
境ホルモン学会(2004)

藤田正一、石塚真由美、高菅卓三、谷川力、  
千葉一成、佐治尚介、坂本健太郎、数坂昭  
夫、日本の野生生物における内分泌攪乱と  
環境汚染、環境ホルモン学会(2004)

K.M. Muzandu, M. Ishizuka, A. Kazusaka  
and S. Fujita. POSSIBLE INVOLVEMENT OF  
PEROXYNITRITE IN ESTROGEN-INDUCED  
OXIDATIVE STRESS AND PROTECTIVE ROLE  
OF CAROTENOIDS. 10th International  
Congress of Toxicology (2004, Finland)

H-S. Kim, M. Ishizuka, A. Kazusaka and  
S. Fujita. DI-(2-ETHYLHEXYL) PHTHALATE  
SUPPRESSES TAMOXIFEN-INDUCED APOPTOSIS  
IN PITUITARY GH3 CELLS. 10th  
International Congress of Toxicology  
(2004, Finland)

M. Ishizuka, T. Takasuga, T. Tanikwa,  
S. Fujita. SUPPRESSION OF TESTOSTERONE  
SYNTHESIS IN TESTES OF WILD NORWAY  
RATS IN JAPAN: ACCUMULATION OF



Alexa750 の脳室内投与。上：脳室内に Alexa  
を注入した。下：コントロール。



Alexa750 の腹腔内投与。下：腹腔内に Alexa  
を注入した。上：コントロール。

研究成果の刊行に関する一覧表

書籍

著者氏名	論文タイトル名	書籍全体の編集者名	書籍名	出版社名	出版地	出版年	ページ

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Muzandu, K., Shaban, Z., Ishizuka, M., Kazusaka, A., Fujita, S.	Possible involvement of peroxynitrite in estrogen-induced oxidative stress.	Free Radical Research.			(In press)

Shaban, Z., Soliman, M., El-shazly, S., El-bohi, K., Abdelazeez, A., Kehelo, K., Kim, H., Muzandu, K., Ishizuka, M., Kazusaka, A., Fujita, S.	AhR and PPAR $\alpha$ Antagonistic effects on CYP2B and CYP3A and additive inhibitory effects on CYP2C11.	Xenobiotica			(In press)
Shaban, Z., El-Shazly, S., Abdelhady, S., Fattouh, I., Muzandu, K., Ishizuka, M., Kimura, K., Kazusaka, A., Fujita, S.	Down regulation of hepatic PPARalpha function by AhR ligand.	J Vet Med Sci.	66(11)	1377-1386	2004
Sakamoto, K. Q., Ishizuka, M., Kazusaka, A., Fujita, S.	Iodine intake as a possible cause of discontinuous decline in sperm counts: a re- evaluation of historical and geographic variation in semen quality.	Jpn J Vet Res.	52(2)	85-94	2004

Kim HS, Ishizuka M, Kazusaka A, Fujita S.	Alterations of activities of cytosolic phospholipase A2 and arachidonic acid-metabolizing enzymes in di-(2-ethylhexyl)phthalate-induced testicular atrophy.	J Vet Med Sci.	66(9)	1119-24	2004
Saito K, Sakai N, Kim HS, Ishizuka M, Kazusaka A, Fujita S.	Strain differences in diazepam metabolism at its three metabolic sites in sprague-dawley, brown norway, dark agouti, and wistar strain rats.	Drug Metab Dispos.	32(9)	959-65	2004
Shaban Z, El-Shazly S, Ishizuka M, Kimura K, Kazusaka A, Fujita S.	PPARalpha-dependent modulation of hepatic CYP1A by clofibric acid in rats.	Arch Toxicol.	78(9)	496-507	2004
Saito K, Kim HS, Sakai N, Ishizuka M, Kazusaka A, Fujita S.	Polymorphism in diazepam metabolism in Wistar rats.	J Pharm Sci.	93(5)	1271-1278	2004