

図2 分子画像診断法
 a: バイオルミネッセンスイメージング (bioluminescence imaging: BLI) による発光(赤)と、蛍光イメージング (fluorescence reflectance imaging: FRI) による蛍光(緑)を示す。
 b: Caliper 社の IVIS-Lumina[®] (住商ファーマより画像提供)

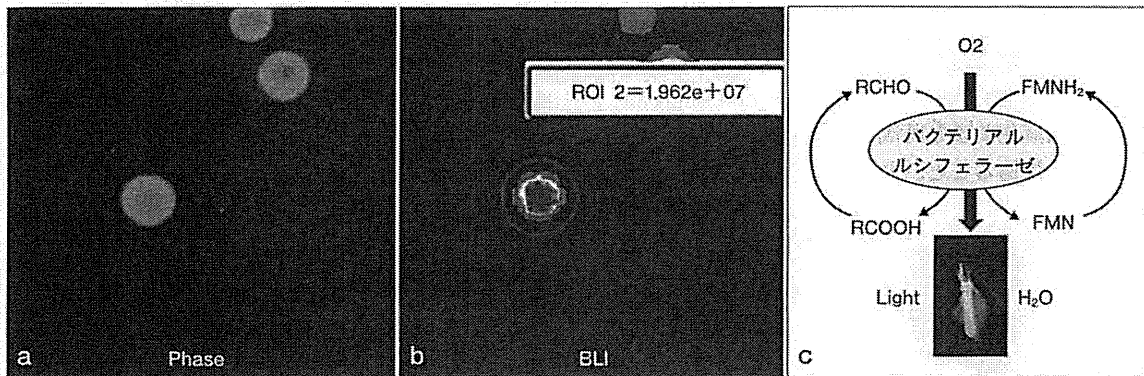
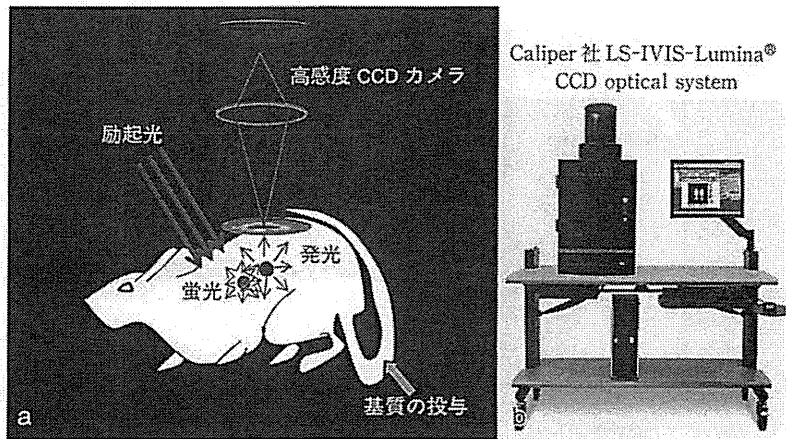


図3 Bacterial ルシフェラーゼを遺伝子導入された細菌と発光原理

a, b: 寒天培地上の細菌。BLIで発光が確認でき、ROI (Region of interest) で囲った範囲の発光量を定量化できる。
 c: Bacterial ルシフェラーゼは、脂肪酸とフラビンモノヌクレオチドの回路により O₂ と ATP の存在下で生存している細菌のみが発光する。基質の投与が必要ないのが特徴である。

in vivo イメージングは、このルシフェラーゼをリポーターとしている。ルシフェラーゼは基質である発光素ルシフェリンと反応して、酸素とアデノシン三リン酸 (ATP) の存在下でオキシルシフェリンを生成する。ルシフェラーゼの種類によって、それぞれ異なったオキシルシフェリンを生成し、各々の波長の光を発する。とくにホタル、ウミシイタケ、細菌由来のルシフェラーゼ発光は 600 nm 以上の光を含み、組織透過性に富み、バックグラウンドも低いことから *in vivo* イメージングに適している。北アメリカ産ホタル (Firefly; *Photinus pyralis*) から、クローニングされた D-firefly ルシフェリンはルシフェリン-ルシフェラーゼ反応により発光し、水溶性で動物実験において扱いやすい³⁾。Firefly ルシフェラーゼの

波長は数 cm の組織深度まで透過性があり、マウスやラットなどの小動物実験において広く用いられている。また、Bacterial ルシフェラーゼは、基質のルシフェリンを必要とせず、酸素と ATP の存在下で生きている細胞のみで発光するという特徴を持つ (図 3)。

当初 BLI は、乳癌細胞¹⁶⁾ など oncology の分野で発展してきたが、近年では細胞・組織移植学、細菌・ウイルス感染学、毒物学、遺伝子治療など数多くの分野に応用されている^{1,2,4,5,13,18,20)}。具体的な使用例は、①細胞や細菌の存在、分布、増減および定量化、②疾病などに関連する特定な遺伝子の発現、局在、増減および定量化などである。BLI の特徴として、①簡便、②装置が比較的小さく設置が容易、③生きた動物でリアルタイム

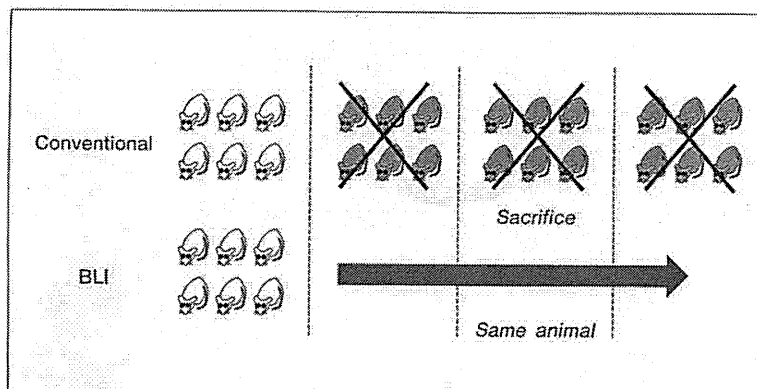


図4 分子画像診断法の最大の特徴
同一個体の生きた動物での遺伝子発現
や細胞動態などが非侵襲的にリアルタイムに観察可能である。

ムな観察(可視化)が可能, ④高感度で定量化が可能, ⑤多重イメージングが可能(発光と各種蛍光), ⑥同一個体動物で経時的評価が可能, ⑦発光が酸素やATPに依存するため生きている細胞(細菌)のみ観察可能(live cell imaging), ⑧実験動物の低減化および時間の短縮化によるコスト削減が可能であること, などが挙げられる。すなわち, BLIは同一個体で動物を暗殺することなく定量的かつ経時的に観察可能であり(図4), 疾病の病態解明, 各種細胞移植, また各種治療薬の開発などに役立つ優れた技術と考えられる。

BLIの感度には, ルシフェラーゼの発現性, 組織深度, 光をcaptureする機器の精度などが関与する²⁴⁾。Caliper社のIVIS[®]は, 生体内から発する組織透過性の光を超高感度CCDカメラでcaptureし, これをコンピューターで光の発光強度を擬似カラーで画像化し定量化できるシステムである(図2-b)。IVIS[®]装置は, 観察のための暗箱, -80°Cに冷却したCCDカメラ(あるいは光電子増倍管)および光をデジタル処理するためのPCとソフトウェアからなる。さらに蛍光観察のため, 励起光源(ハロゲンランプまたはレーザー)が搭載されている。フォトン(photon)が光源から等方向性に発散する割合は光束(flux)と呼ばれ, total fluxの単位はphotons/secを用いる。組織表面からの発光はradiance(放射輝度)と呼ばれ, 単位はphotons/sec/cm²/srを用いる(sr=steradian, Ω)。“Radiometric quantification”を応用した定量化を行っており, radiometric quantificationは表面における全光束(total flux)の定量と等しい。

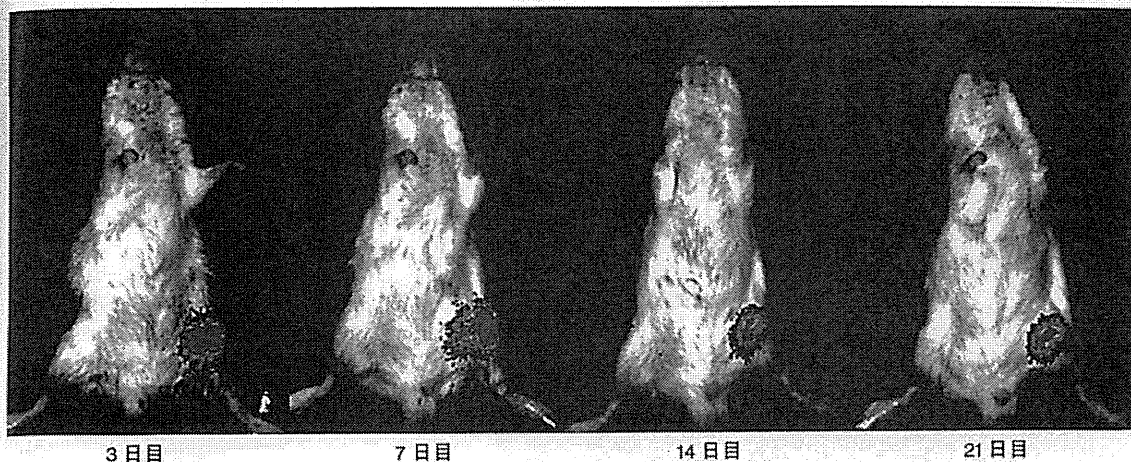
2. 蛍光イメージング(fluorescence reflectance imaging : FRI) :

蛍光による *in vivo* イメージング

イメージングに用いられる蛍光物質は, 遺伝子のリポーターとして用いる蛍光蛋白質と, 抗体や薬物のラベルに用いる蛍光試薬に分けられる。Green fluorescence protein(GFP)は, 1992年にShimomuraら²⁵⁾によりオワンクラゲから遺伝子クローニングされ, リポーターとして広く用いられている蛍光蛋白質である。*In vitro*では有用であるが, *in vivo*では励起・蛍光ともに波長が600 nm以下(励起:488 nm, 蛍光:510 nm)であり組織を透過しづらい。最近, 遺伝子の改変によって励起・蛍光ともに長波長の蛍光蛋白質が作られている。抗体や薬物をラベルし, 臓器や組織内での分布を観察する場合には, Cy5.5などの600 nm以上の蛍光を発するものが望ましい。蛍光イメージングでは, 動物皮膚表面の自家蛍光と, 飼料に含まれる葉緑素(クロロフィル)誘導体による消化管の蛍光が留意事項として挙げられる。後者に対しては, アルファルファを含まない飼料を用いるといった対応策がある。また, FRIとBLIを同時に併用することにより多重イメージングが可能となり, 1個体の動物で複数の現象が観察可能である。

骨軟部組織感染症モデル(慢性骨髓炎モデル・浅殿筋感染症モデル)

われわれは, このBLIの技術をとくに感染症領域に応用し研究を進めている^{6,7,14,19)}。骨軟部組織感染症の病態はいまだ不明な点も多く, 診断や



3日目 7日目 14日目 21日目

図5 BLIによるマウス慢性骨髄炎モデルの細菌の経時的動態

細菌の発光は3日目をピークに上昇し、その後は宿主の免疫獲得とともに下降して、やがてプラトーとなる。細菌は3カ月以上の長期にわたり生存し、安定した発光を維持する。

治療に難渋することが少なくない。近年の高齢化社会を背景にインプラント手術が広く普及してきた反面、手術部位感染(surgical site infection)も増加し、MRSAなど多剤耐性菌感染なども問題となっている。過去の動物モデルは、組織を培養して細菌数を観察するもので、感染部位ならびに周辺組織への波及の評価も病理組織切片に基づいていた。すなわち、同一個体における細菌感染動態の空間的・時間的な把握が困難であったと言える。少なくとも組織作製やデータ解析に数日程度の時間がかかり、生体内のリアルタイムな観察は不可能であった。さらに、各操作におけるテクニカルエラー、感染のbeginning pointでの評価が困難といった問題点も挙げられる。BLIを用いた肺、尿路、腸管、心内膜などの感染モデル^{5,11,22,23)}の報告では、同一個体におけるリアルタイムかつ定量的な観察がその利点として強調されている。一方、われわれが涉猟し得た限りBLIを用いた骨感染モデルの報告は極めて少なく、インプラントなどを使用しない純粋な慢性骨髄炎モデルの報告は過去になかった。そこで、われわれは同一個体でリアルタイムに経時的かつ定量的に評価が可能な慢性骨髄炎モデルの作製を試みた(図5)。

まず、bacterialルシフェラーゼを発現する黄色ブドウ球菌(*S. aureus*)をクローニングし、均

一な細菌活性状態の細菌株を作製した。次にマウスの大腿骨髄腔内に細菌を注入し、骨髄炎モデルを作製した。光の強度が細菌数に相関するか否かを確認するために、細菌数と発光強度の関係を*in vitro*と*in vivo*で評価し、高い正の相関を有することを確認した。また、BLIで大腿骨内の細菌動態を経時的に観察したところ、マウスの自然免疫獲得により発光のピークは一過性に下降するが、3カ月の長期にわたり安定して細菌が消滅することなく感染が慢性化することが明らかになった。興味深いことに亜急性期から慢性期ではバクテリア発光量とCRP値が高い正の相関を示した。

さらに、われわれは軟部組織感染モデルとしてマウスの浅殿筋内にBacterialルシフェラーゼを有する*S. aureus*を注入したマウス浅殿筋感染症モデルの作製にも成功した(図6)。このモデルにおいても2カ月以上の長期にわたり細菌が生存し、安定した細菌発光が確認できた。

以上の骨軟部組織感染症モデルは、再現性が高く、その簡便性から感染症の病態解明や新たな抗生剤^{14,15)}や抗菌素材⁷⁾などの開発・治療効果判定に極めて有用であると考えられた。次に、炎症の可視化を行う目的で感染巣周囲に強力に発現する分子をターゲットとしたCy5.5蛍光プローブを利用した実験を行った。浅殿筋感染症モデルにお

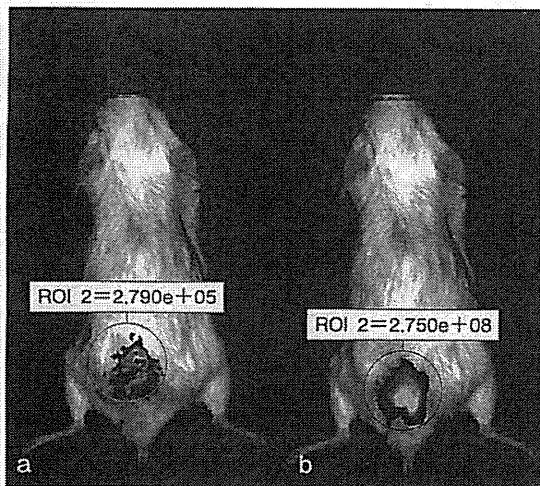


図6 浅殿筋感染症モデル(同一動物)における多重イメージング(BLIとFRI)画像

浅殿筋感染症モデルにおける bacterial ルシフェラーゼを発光する黄色ブドウ球菌(a: レインボー)の周囲に一致して Cy5.5 蛍光プローブ(b: ファイヤーカー)が集積している。

いて細菌動態を BLI で、炎症部位を FRI で観察した(多重イメージング)。蛍光プローブ投与直後より感染巣周囲に蛍光物質 Cy5.5 が集積し、発光する細菌周囲に蛍光シグナルを観察できた(図6)。このように同一個体動物においてリアルタイムに異なる現象の可視化が可能となり、今後さらなる他分野への応用が期待される。

まとめ

発光および蛍光を用いた *in vivo* イメージング法の有用性と、われわれの取り組んでいる感染症研究の成果の一部を紹介した。現在われわれはこの技術を用いて、臨床応用を目指し、各種抗菌生体材料の開発、感染症の病態解明、新規ドラッグデリバリーシステム(DDS)の開発などに取り組んでいる。*in vivo* イメージング法はその簡便性、汎用性、定量性により医学・生物学全般における動物実験に応用可能であり、今後必要不可欠なツールであるといえる。

参考文献

1) Contag CH, Spilman SD, Contag PR, et al: Visualizing gene expression in living mammals using a bioluminescent reporter. *Photochem-*

Photobiol 66: 523-531, 1997

- 2) Contag CH, Contag PR, Mullins JI, et al: Photonic detection of bacterial pathogens in living hosts. *Mol Microbiol* 18: 593-603, 1995
- 3) de Wet JR, Wood KV, Helinski DR, et al: Cloning of firefly luciferase cDNA and the expression of active luciferase in *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci USA* 82: 7870-7873, 1985
- 4) Edinger M, Cao YA, Hornig YS, et al: Advancing animal models of neoplasia through *in vivo* bioluminescence imaging. *Eur J Cancer* 38: 2128-2136, 2002
- 5) Francis KP, Yu J, Bellinger-Kawahara C, et al: Visualizing pneumococcal infections in the lungs of live mice using bioluminescent *Streptococcus pneumoniae* transformed with a novel gram-positive lux transposon. *Infect Immun* 69: 3350-3358, 2001
- 6) 船尾陽生, 石井 賢, 永井重徳・他: *In vivo* imaging を用いた定量的マウス慢性骨髄炎モデルの確立. *日整会誌* 84: S1157, 2010
- 7) 船尾陽生, 石井 賢, 永井重徳・他: 生体内で優れた抗菌活性を有するインプラントの開発. *日整会誌* 84: S1157, 2010
- 8) 石井 賢, Qi Xin, 中村雅也・他: 末梢神経損傷後の再髄鞘化における GFAP 陽性細胞の意義. *日整会誌* 80: 831, 2006
- 9) 石井 賢, 中村雅也, Kim DE・他: Bioluminescent technique を用いた移植神経幹細胞の *in vivo* imaging. *移植* 40: 76, 2005
- 10) 石井 賢, Kim DE, Schellingerhout D・他: Bioluminescence を用いた脳虚血モデルにおける移植神経幹細胞の *in vivo* imaging 法. *炎症・再生* 24: 433, 2004
- 11) Kadurugamuwa JL, Modi K, Yu J, et al: Noninvasive biophotonic imaging for monitoring of catheter-associated urinary tract infections and therapy in mice. *Infect Immun* 73: 3878-3887, 2005
- 12) Kim D E, Schellingerhout D, Ishii K, et al: Imaging of stem cell recruitment to ischemic infarcts in a murine model. *Stroke* 35: 952-957, 2004
- 13) Koransky ML, Ip TK, Wu S, et al: *in vivo* monitoring of myoblast transplantation into rat myocardium. *J Heart Lung Transplant* 20: 188-189, 2001
- 14) 蔵本哲也, 石井 賢, 平井政彦・他: 骨軟部組織感染症における抗生物質ターゲティング療法の確立へ向けて—抗生剤含有・炎症プローブの開発. *日整会誌* 85: S1277, 2011
- 15) 蔵本哲也, 石井 賢, 永井重徳・他: 整形外科領域耐性菌感染症に対する新規治療法の開発—抗生物質ターゲティング療法. *日整会誌* 85: S

- 1276, 2011
- 16) Nguyen VT, Morange M, Bensaude O: Firefly luciferase luminescence assays using scintillation counters for quantitation in transfected mammalian cells. *Anal Biochem* 171: 404-408, 1988
 - 17) Okada S, Ishii K, Yamane J, et al: *In vivo* imaging of engrafted neural stem cells: its application in evaluating the optimal timing of transplantation for spinal cord injury. *Faseb J* 19: 1839-1841, 2005
 - 18) Rehemtulla A, Stegman LD, Cardozo SJ, et al: Rapid and quantitative assessment of cancer treatment response using *in vivo* bioluminescence imaging. *Neoplasia* 2: 491-495, 2000
 - 19) Rice BW, Cable MD, Nelson MB: *In vivo* imaging of light-emitting probes. *J Biomed Opt* 6: 432-440, 2001
 - 20) Sadikot RT, Jansen ED, Blackwell TR, et al: High-dose dexamethasone accentuates nuclear factor-kappa b activation in endotoxin-treated mice. *Am J Respir Crit Care Med* 164: 873-878, 2001
 - 21) Shimomura O, Johnson FH, Saiga Y: Extraction, purification and properties of aequorin, a bioluminescent protein from the luminous hydromedusa, *Aequorea*. *J Cell Comp Physiol* 59: 223-239, 1962
 - 22) Xiong YQ, Willard J, Kadurugamuwa JL, et al: Real-time *in vivo* bioluminescent imaging for evaluating the efficacy of antibiotics in a rat *Staphylococcus aureus* endocarditis model. *Antimicrob Agents Chemother* 49: 380-387, 2005
 - 23) Wiles S, Pickard KM, Peng K, et al: *In vivo* bioluminescence imaging of the murine pathogen *Citrobacter rodentium*. *Infect Immun* 74: 5391-5396, 2006
 - 24) Wilson T, Hastings JW: Bioluminescence. *Annu Rev Cell Dev Biol* 14: 197-230, 1998



日本整形外科学会 診療ガイドライン

エビデンスに基づいた診断・治療、
患者さんへの説明のよりどころとなる、
整形外科医必携のシリーズ。
文献アブストラクトを収録したCD-ROM付き。



頸椎後縦靭帯骨化症 診療ガイドライン 2011 改訂第2版

■監修 日本整形外科学会 / 日本脊椎骨髄病学会
■編集 日本整形外科学会診療ガイドライン委員会 頸椎後縦靭帯骨化症診療ガイドライン策定委員会

■B5判・182頁 2011.11. ISBN978-4-524-26922-8 定価 3,990円 (税込)

最新刊



新登場

腰部脊柱管狭窄症 診療ガイドライン 2011

■監修 日本整形外科学会 / 日本脊椎骨髄病学会
■編集 日本整形外科学会診療ガイドライン委員会 腰部脊柱管狭窄症診療ガイドライン策定委員会

■B5判・78頁 2011.11. ISBN978-4-524-26438-4 定価 2,310円 (税込)

10,000例に及ぶ著者の症例経験を基軸に、手の外科のすべてを詳解。

最新刊

手の外科の実際 改訂第7版

■著 津下建哉 (広島大学名誉教授)

手の外科の診療にあたっての諸注意、基本原則を具体的に記述し、著者の基本姿勢である atraumatic な操作、すなわちより完全な解剖学的修復、瘢痕の少ない修復操作で全章が貫かれている。手の外科の治療原則から後療法まで、個々の症例ごとに臨床応用できるよう解説した。

■A4変型判・734頁 2011.12. ISBN978-4-524-26217-5 定価 26,250円 (税込)



南江堂 〒113-8410 東京都文京区本郷三丁目42-6 (営業) TEL 03-3811-7239 FAX 03-3811-7230

20111114tsu

