

脊髄再生関連

神経幹細胞の蛍光発光標識による
イメージングと応用

脊髄損傷モデルでの移植細胞の Bioluminescence
Imaging

高橋勇一朗*¹⁾ 岡野 栄之*²⁾ 戸山 芳昭*¹⁾
中村 雅也*¹⁾

Fluorescence and Bioluminescence Imaging for Analysis of
Grafted Cells in Spinal Cord Injury Model

Yuichiro TAKAHASHI*¹⁾, Hideyuki OKANO*²⁾, Yoshiaki TOYAMA*¹⁾,
Masaya NAKAMURA*¹⁾

臨整外 47 : 7~15, 2012

Key words : 脊髄損傷 (spinal cord injury), 細胞移植 (cell transplantation), 発光イメージング (bioluminescence imaging)

われわれは独自に開発した蛍光・発光蛋白質: ffLuc を用いて神経幹細胞を標識することで、移植された細胞を長期にわたり定量的かつ経時的に評価する bioluminescence imaging の系を確立した。これを応用して、脊髄損傷に細胞移植を行ううえで最も適切な移植方法を定めるために、マウス脊髄損傷モデルに対して神経幹細胞を3通りの投与方法で移植し、定量的に移植細胞の生着と分布を評価した。移植細胞の生着と安全性の面から、脊髄損傷への神経幹細胞の移植法で最もよい方法は髄内直接投与であることが明らかとなった。蛍光・発光レポーターとその解析法を応用することで、今後さらに脊髄損傷の病態や治療法が解明されることが期待される。

はじめに

細胞移植療法は脊髄損傷に対して臨床応用が期待されている治療法である。なかでも神経幹細胞 neural stem/progenitor cells (NS/PCs) は、これまでの研究結果から最も可能性の高い細胞と考えられている^{10,14)}。臨床応用において、細胞を損傷脊髄にどのように移植するかということは重要な問題であり、過去の研究では損傷脊髄への直接投与 intralésional (IL)、経くも膜下腔内投与 intrathecal (IT)、経静脈投与 intravenous (IV)

の3つの移植方法が用いられてきた。しかし、これまでに異なる投与方法による移植細胞の定量的および経時的な比較検討は行われていなかったため、細胞生着と安全性の点から、どの方法が最適であるのかは未解決の問題であった。われわれは独自に開発した蛍光・発光蛋白質を用いて NS/PCs を標識することで、移植された細胞を長期にわたり定量的かつ経時的に評価する系を確立した。これを応用して、脊髄損傷への NS/PCs 移植を行ううえで最も適当な移植方法を定めるために、マウス脊髄損傷モデルに対して NS/PCs を IL, IT, IV の3通りの投与方法で移植し、定量的

*¹⁾ 慶應義塾大学医学部整形外科 (〒160-8582 東京都新宿区信濃町35) Department of Orthopaedics Surgery, School of Medicine, Keio University

*²⁾ 慶應義塾大学医学部生理学 Department of Physiology, School of Medicine, Keio University

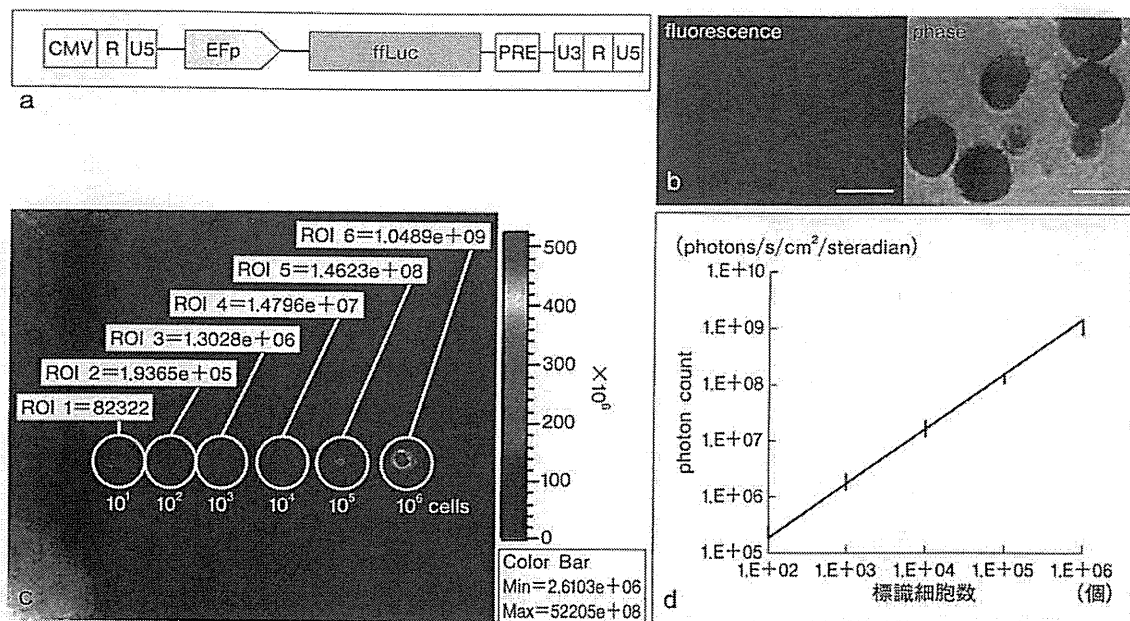


図1 蛍光・発光蛋白質 ffLuc による蛍光と発光

- a: ffLuc は elongation factor (EF)-1 α プロモーター下に発現する。
 b: ffLuc で標識された NS/PCs は蛍光(左)を発する。
 c: ffLuc で標識された NS/PCs は強い発光を生じる。
 d: *in vitro* の生体発光イメージング (BLI) で photon count (発光強度) と標識細胞数には正の相関がみられた。

に移植細胞の生着と分布を評価し、さらに細胞移植に伴う合併症(腫瘍形成や肺塞栓症)についても検討した¹⁹⁾。

蛍光発光蛋白質による NS/PCs の標識とイメージング

1. 蛍光発光レポーター

移植細胞として胎生 14 日目 C57BL/6J マウスの線系由来の NS/PCs を neurosphere 法に準じて培養して使用した。移植細胞の標識は、EF1 α プロモーター下にわれわれが独自に開発した ffLuc (投稿中) を発現する新規融合レンチウイルスベクターを用いて行った(図 1-a)。ffLuc は Venus と Luc2 から構成されており、Venus は蛍光蛋白質 yellow fluorescence protein (YFP) の一種で、Luc2 はホタル由来発光酵素 luciferase である。この発光は luciferase が ATP と酸素を介して luciferin と反応することにより生じるので、生きている細胞のみを検出できる。この遺伝子ベクターの導入により、標識細胞は ffLuc を強く安定して発現することが可能となり、

luciferase による強い発光シグナルを生体発光イメージング bioluminescence imaging (BLI) として生きたままのマウス生体内でとらえることができる。さらに組織学的にも切片状で、移植細胞を green fluorescence protein (GFP) による蛍光シグナルとしてとらえることが可能となった(図 1-b, c)。

2. Bioluminescence imaging

BLI には Xenogen-IVIS 100 cooled CCD optical macroscopic imaging system (SC BioScience 社) を使用した¹⁷⁾。撮像した発光シグナルは photon count [photons/s/cm²/steradian] (あるいは photon-flux) として擬似カラーで表示される。この発光を定量的に解析するために、関心領域 (ROI) を同一部位に設定して各個体で測定した。*In vitro* での細胞数と BLI で測定された発光シグナルの関連を調べるために、標識された NS/PCs の細胞数をふって (1 \times 10²~10⁶ cells/10 μ l)、D-luciferin 投与後に発光シグナルを *in vitro* で定量的に測定した(図 1-c)。その結果、

BLIで測定可能な最小細胞数は100個であり、約1,000個の細胞のphoton countは 1×10^6 台、10,000個では 1×10^7 台、100,000個では 1×10^8 台と指数関数的に増加した(図1-d)。この結果から、BLIによる発光強度がわかれば、その細胞数を推測することが可能である。

次に、標識されたNS/PCsを成体C57BL/6Jマウスの正常脊髄へ移植して、*in vivo*でBLIを用いて細胞数と発光強度の関連を評価した。*in vivo*の撮像条件は焦点距離10cmでD-luciferin(0.3 mg/g body weight)を腹腔内投与15分後から5分間とした。その結果、細胞約10,000個を移植した時のphoton countはおおよそ 1×10^7 台で、約100,000個では 1×10^8 で正の相関がみられた(図2-a, b)。この値は*in vitro*のphoton countと比べると約10分の1であった。BLIで測定可能な最小移植細胞数は約1,000個であり(図2-c)、*in vitro*での測定可能な最小細胞数である100個では*in vivo*では測定不能であった。しかし、この場合でも、移植部直上の皮膚を切開して測定すると検出が可能であった(図2-d)。

脊髄損傷モデルにおける移植細胞の生存と分布

1. 脊髄損傷モデルとNS/PCs移植

前述した評価系を用いて、損傷脊髄に対して異なる投与方法で移植された神経幹細胞の動態を評価した。脊髄損傷モデル動物は成体メスC57BL/6Jマウスを使用した。第10胸椎を椎弓切除して硬膜を露出させ、IH impactorを用いて60 kdynの圧挫損傷モデルを作製した。標識されたNS/PCsを損傷直後にマウスへと移植した。移植方法はIL投与(IL群)、IT投与(IT群)、IV投与(IV群)のいずれかで施行した。IL群では微細ガラスピペットを損傷中心部に直接刺入して移植した。IT群では第3腰椎を椎弓切除後に、くも膜下腔内へ移植した。IV群では尾静脈あるいは大腿静脈から経静脈的に細胞移植を行った。すべての移植は同一条件で行い、移植細胞の細胞数と濃度は 5×10^6 個/2 μ l、注入速度は1 μ l/min、25 μ l Hamilton シリンジとstereotaxic microinjectorを使用した。移植直前の生きている細胞数

はTrypan blue dyeでの定量と、BLIで移植細胞の発光シグナルを測定することで確認した。各動物は移植後6週間にわたり経時的にBLIで評価し、その後に組織学的検討を行った。

2. 移植細胞の*in vivo*イメージング

IL群では、脊髄損傷部における移植細胞のphoton countは1週後に初期値の約30%、6週後には平均9.4%まで減少したが、6週間にわたり発光が確認できた(図3-a, b)。IT群では、移植直後にくも膜下腔内全体に移植細胞による発光が広がった。1週後も損傷部で移植細胞の発光は確認できたが、その後消失した。Photon countも同様に減少し、1週後には初期値の約5%、6週後には0.3%であった(図3-c, d)。IV群では、6週間にわたって損傷部においても周囲の非損傷部においても発光を検出することはできなかった(図3-e, f)。その一方で、IV群10匹全例でNS/PCs移植直後に両側胸部に強い発光を認めた(図3-g)。そのうち3匹は移植直後に呼吸抑制が起こり死亡し、これらのマウスの肺で移植細胞の強い発光が認められた(図3-h)。生存したマウスでは翌日には胸部の発光は測定できなかったが、7匹中2匹は4日以内に死亡した。残りの5匹は6週後まで生存した。

3. 免疫組織化学的解析

移植細胞の生存と分布を組織学的に調べるために、移植後6週でGFPによる免疫組織化学染色を行った(ffLuc陽性細胞はGFPにより観察可能である)。IL、IT、IVの3群間で、ffLuc陽性細胞が損傷部で最も多く生存していたのはIL群であった(図4-a, b)。IT群では、移植細胞が損傷部でわずかに存在していた(図4-c, d)。IV群では、損傷部で移植細胞を認めることができなかった(図4-e, f)。IL群では、移植細胞はニューロン(Hu陽性)、アストロサイト(GFAP陽性)、オリゴデンドロサイト(APC陽性)へと分化していた(図4-g~i)。IT群では、一部のffLuc陽性細胞塊が脊髄(図5-a, c, d)や馬尾(図5-b, e, f)の表面に存在し、ニューロン、アストロサイト、オリゴデンドロサイトへと分化していた(図5-g

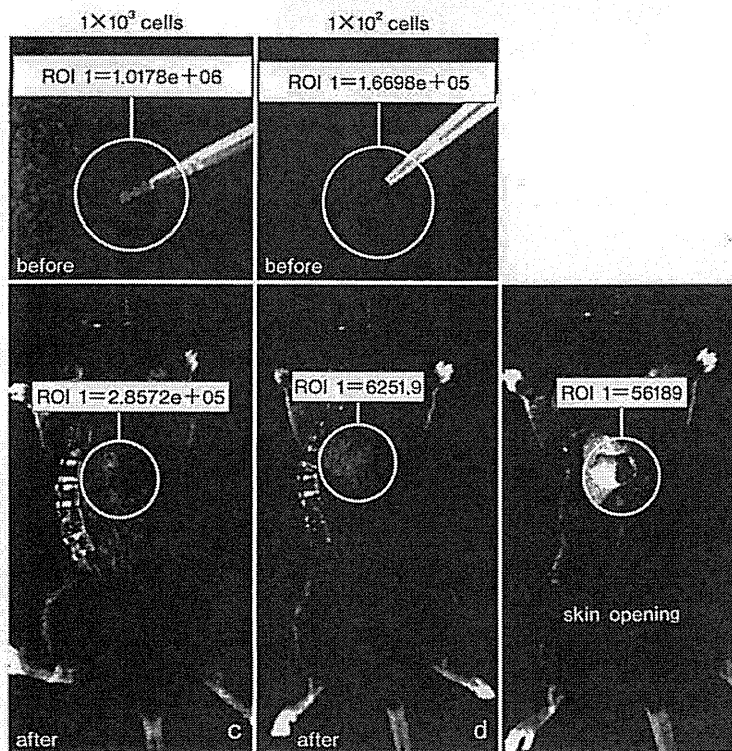
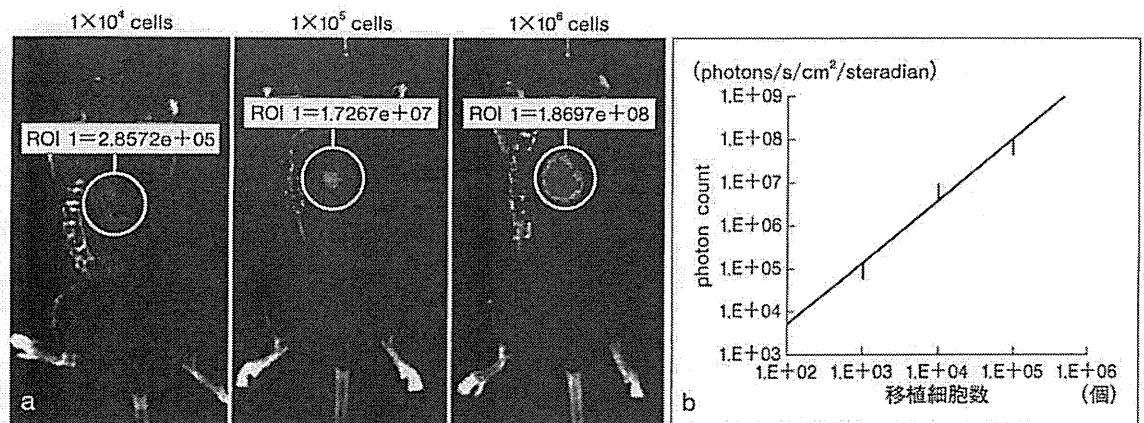


図2 ffLuc 導入神経幹細胞の *in vivo* bioluminescence imaging

- a: マウス脊椎内へ移植された移植細胞は *in vivo* の BLI で定量的に測定できる。
 b: *in vivo* においても移植細胞数と発光強度 (photon count) に正の相関がみられた。
 c: *in vitro* で測定可能な最小移植細胞数は約 1,000 個であった。
 d: *in vitro* での測定可能な最小細胞数である 100 個では *in vivo* では測定不能であった。しかし、この場合でも移植部直上の皮膚を切開すると、検出可能であった。

～i). これらの細胞は非損傷部の脊髄軟膜上に付着していて、神経組織内へは浸潤していなかった (図 5-c～f). IV 群では、ffLuc 陽性細胞が肺と脾臓で、ffLuc 陽性細胞の断片が腎臓系球体で認められた (図 6). 3 群とも明らかな腫瘍形成は認めなかった。

4. 結果

以上をまとめると、IL 投与法による NS/PCs

移植は 3 つの投与法のうちで最も移植細胞の生存率が高く、合併症も認められなかった。IT 投与法による移植では損傷部での移植細胞の生存はわずかであり、一部の移植細胞はくも膜下腔内に沿った損傷していない脊髄表面上でも認められた。つまり、損傷部への移植効率が低く、周囲の正常脊髄に細胞が生着していた。IV 投与法では、移植後に損傷部で移植細胞を認めることができず、胸部での発光を全例で認めた。これは IV 投

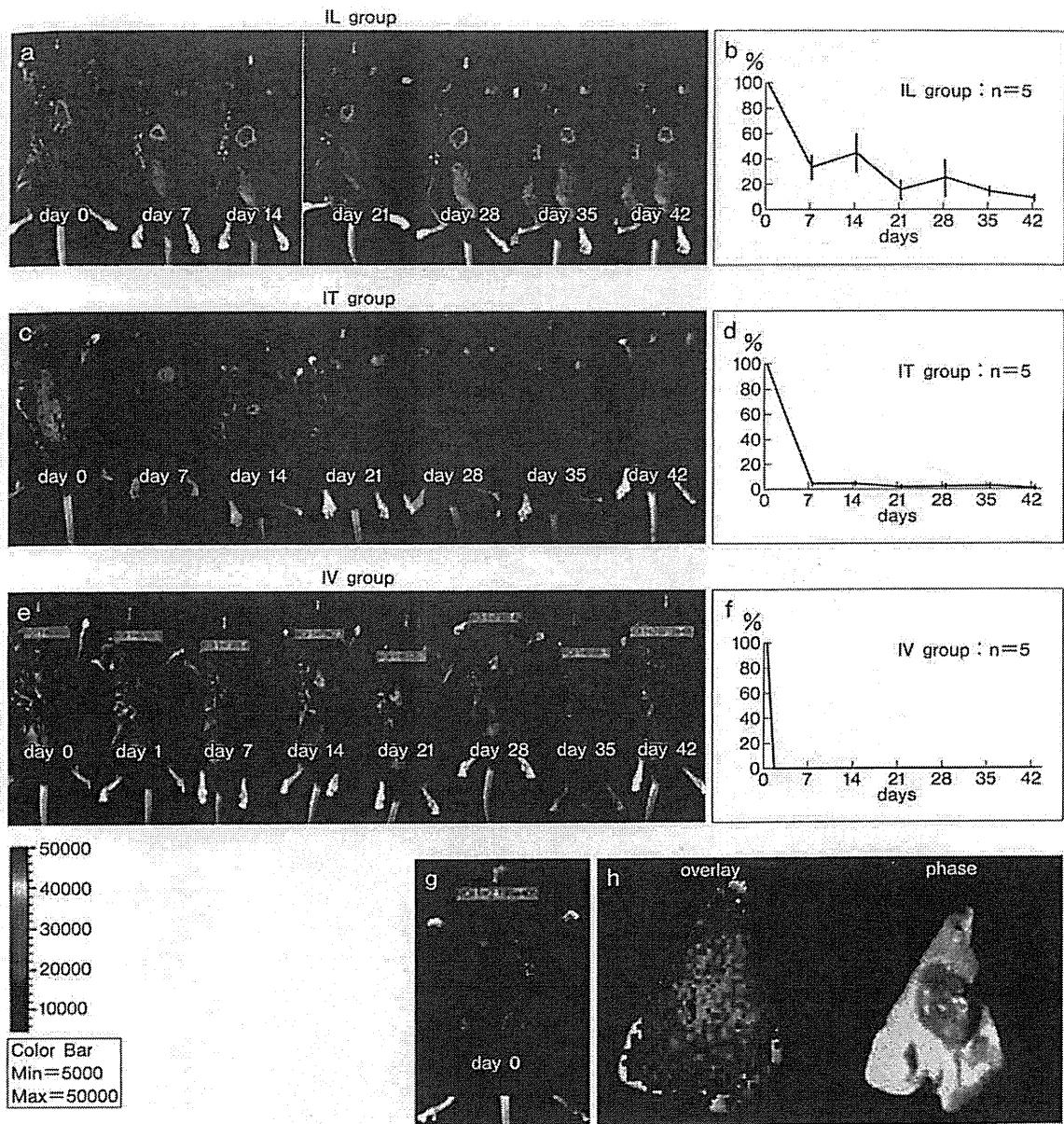


図3 脊髄損傷モデルでの移植細胞の *in vivo* bioluminescence imaging

- a, b: 直接投与(IL)群では移植細胞の発光が6週間目まで継続した。
 c, d: 経くも膜下腔内投与(IT)群では移植直後にくも膜下腔内全体へ広がり、その後、損傷部では徐々に減少した。
 e, f: 経静脈投与(IV)群では損傷部で発光を認めることができなかったが、全例で胸部の発光を認めた(g)。IV移植した10例中3例は移植直後に呼吸抑制が起こり死亡した。
 h: IV群の肺を取り出してBLIで測定すると強い発光が観察された。

与直後に移植細胞による肺梗塞が生じていることを示唆しており、約1/3の例では移植直後に死亡していることから、安全面での課題もある投与方法と考えられた。したがって、移植細胞の生着と安全性の面から、脊髄損傷へのNS/PCsの移植法で最もよい方法はIL投与方法であると考えられた。

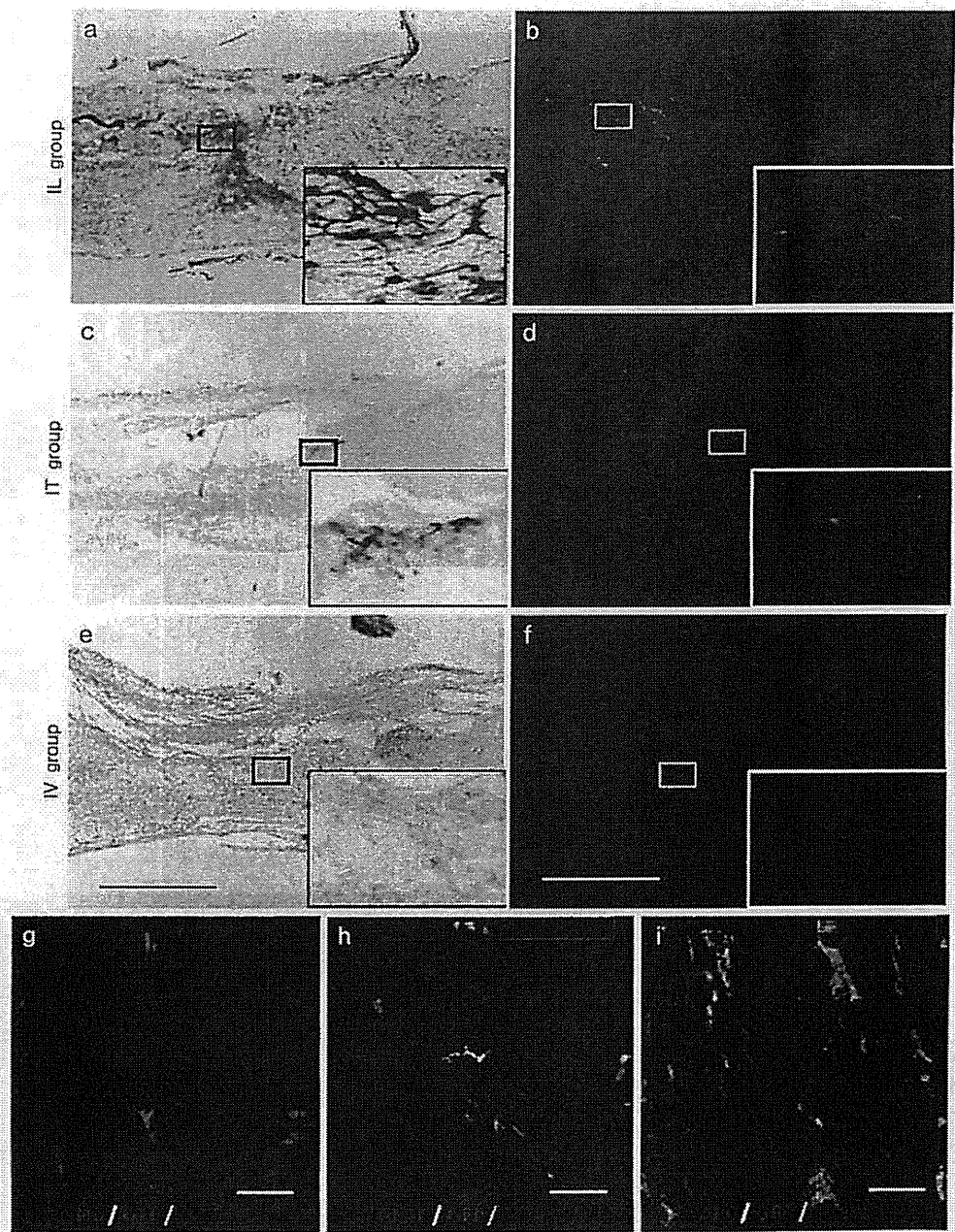


図4 免疫組織化学染色による損傷部での移植細胞生着の比較

a, b: 損傷部ではIL群で最も多くのffLuc陽性細胞が認められた。

c, d: IT群で認められた移植細胞はわずかであった。

e, f: IV群では移植細胞が認められなかった。

IL群で移植細胞はHu陽性ニューロン(g), GFAP陽性アストロサイト(h), APC陽性オリゴデンドロサイト(i)へと分化していた。

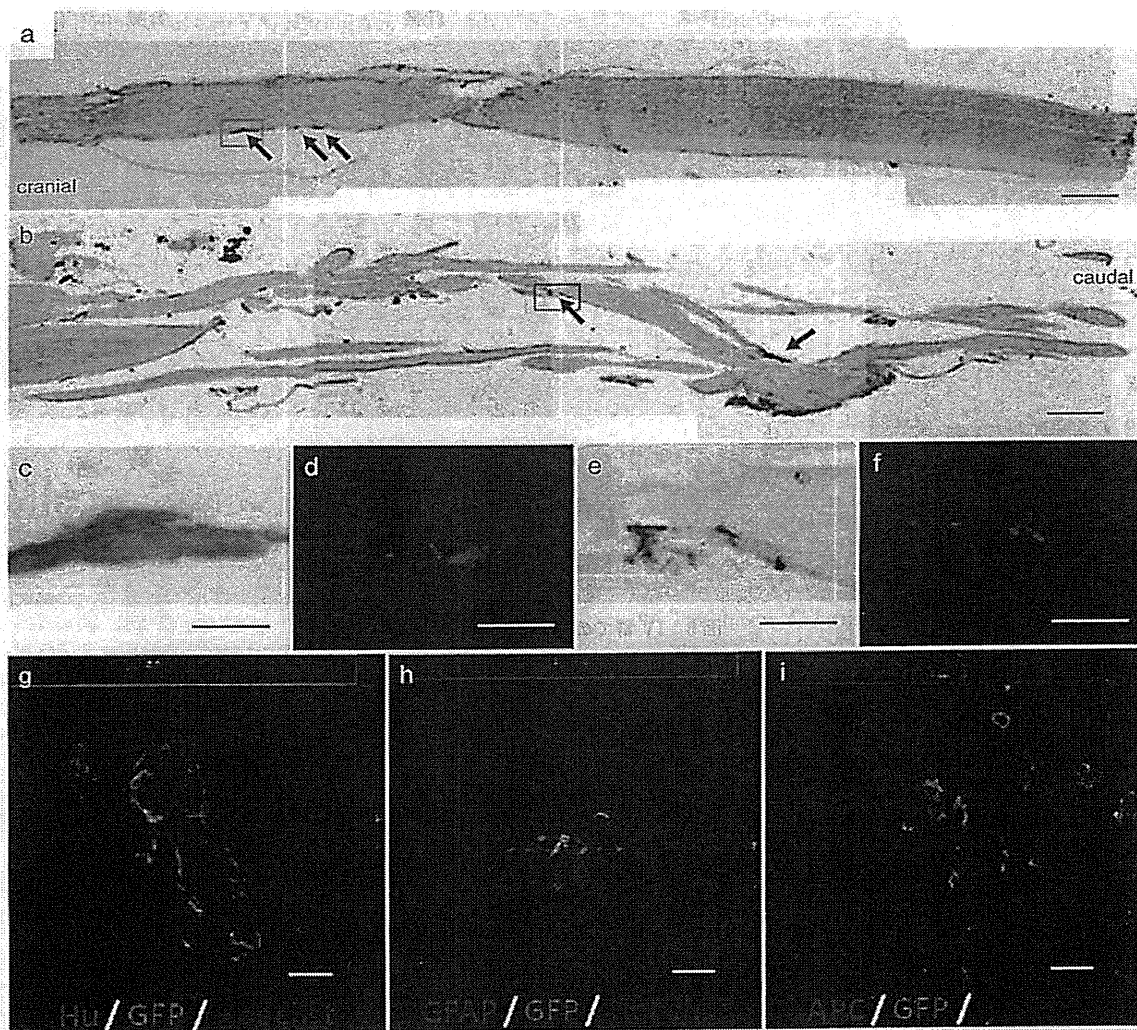


図5 IT群での移植細胞の分布

- a, b: IT群では損傷部以外の脊髄(a)・馬尾(b)神経表面でffLuc陽性細胞が認められた(矢印).
 c, d: a枠内高倍率
 e, f: b枠内高倍率
 g : Hu陽性ニューロン
 h : GFAP陽性アストロサイト
 i : APC陽性オリゴデンドロサイト

生体内での 移植細胞解析について

損傷脊髄に移植された細胞の動態を解析するために、これまでに報告されている方法は免疫組織化学的手法、シンチグラフィ^{1,3,5,7)}、MRI^{2,9,11,16)}などである。しかし、これらの方法はいずれも移植細胞を定量的かつ継続的に評価することはでき

ない。免疫組織化学的解析は動物を移植後に屠殺しなければならないので、同一動物を経時的に観察することができない。シンチグラフィは放射線性トレーサーで移植細胞を標識して、*in vivo*でその存在を調べられるが、観察期間は放射線の半減期と細胞分裂による希釈の影響により短期間に限られる。MRIは高感度に移植細胞の分布を調べることができるが、死んでいる細胞と生きてい

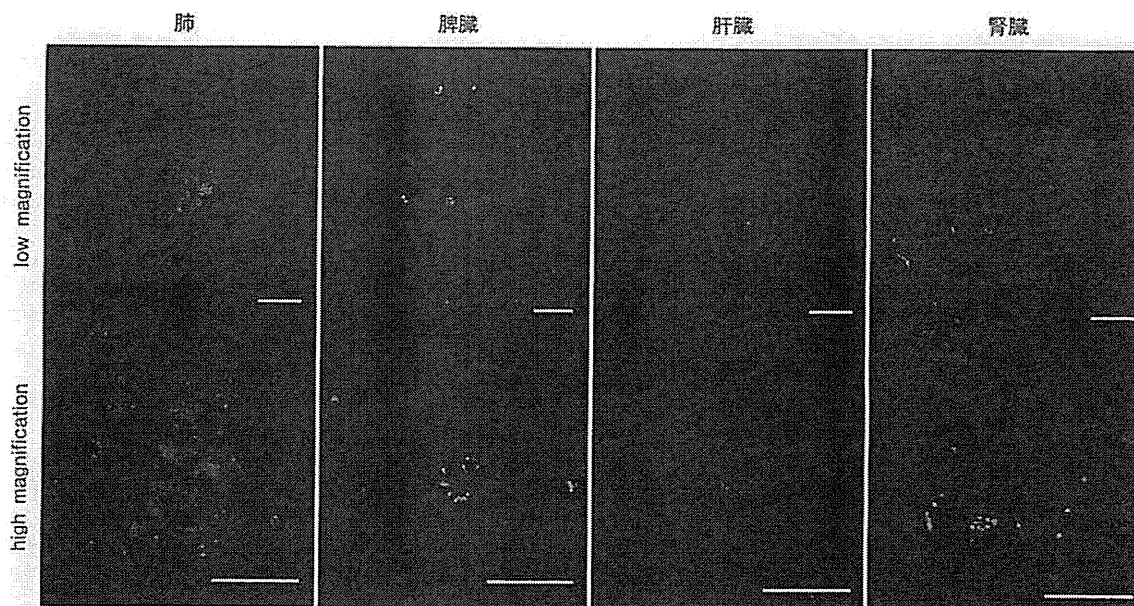


図6 IV群での移植細胞の分布
IV群では肺, 脾臓, 腎臓内でffLuc陽性細胞が認められた。

る細胞のシグナルを区別することができないので、定量的評価をすることは困難である。これらの問題を克服するために、われわれはBLIを用いて、同一動物で経時的に追跡し生きている移植細胞からの発光をphoton countとして定量化することを可能にした。BLIを移植細胞の追跡に利用した研究は様々な分野で開始されている^{4,5,8,13,17,18,21}。われわれも過去に脊髄損傷モデルの移植細胞追跡に応用しているが^{12,15,20}、ffLucを発現するNS/PCsの発光シグナルは従来のものよりも約10倍強力であるため、移植細胞が少数であっても、マウスのより深い体内に存在していても、発光シグナルをとらえることが可能となった。また、ffLucはレンチウイルスによって遺伝子導入されているので、NS/PCsにおける発現は永久的で、移植後長期間にわたり正確に移植細胞を追跡することができた。

おわりに

新しい蛍光・発光レポーターであるffLucとBLIシステムを用いて、標識された移植細胞を*in vivo*で経時的かつ定量的に評価することが可能となった。これを利用することで、移植された

NS/PCsの脊髄損傷モデル内での分布や生着を定量的に評価することが可能となった。今後も様々な蛍光・発光レポーターを用いた解析方法が開発応用されることで、移植細胞による機能回復メカニズムや、さらには脊髄損傷の病態まで細胞・分子レベルで解明されるであろう。

文 献

- 1) Aicher A, Brenner W, Zuhayra M, et al: Assessment of the tissue distribution of transplanted human endothelial progenitor cells by radioactive labeling. *Circulation* 107:2134-2139, 2003
- 2) Arbab AS, Yocum GT, Kalish H, et al: Efficient magnetic cell labeling with protamine sulfate complexed to ferumoxides for cellular MRI. *Blood* 104:1217-1223, 2004
- 3) Brenner W, Aicher A, Eckey T, et al: ¹¹¹In-labeled CD34+ hematopoietic progenitor cells in a rat myocardial infarction model. *J Nucl Med* 45:512-518, 2004
- 4) Contag CH, Bachmann MH: Advances in *in vivo* bioluminescence imaging of gene expression. *Annu Rev Biomed Eng* 4:235-260, 2002
- 5) de Haro J, Zurita M, Ayllon L, et al: Detection of ¹¹¹In-oxine-labeled bone marrow stromal cells after intravenous or intralésional administration in chronic paraplegic rats. *Neurosci Lett* 377:7-11, 2005

- 6) 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
- 7) Gao J, Dennis JE, Muzic RF, et al: The dynamic *in vivo* distribution of bone marrow-derived mesenchymal stem cells after infusion. *Cells Tissues Organs* 169: 12-20, 2001
- 8) Hara M, Murakami T, Kobayashi E: *In vivo* bioimaging using photogenic rats: fate of injected bone marrow-derived mesenchymal stromal cells. *J Autoimmun* 30: 163-171, 2008
- 9) Hoehn M, Kustermann E, Blunk J, et al: Monitoring of implanted stem cell migration *in vivo*: a highly resolved *in vivo* magnetic resonance imaging investigation of experimental stroke in rat. *Proc Natl Acad Sci USA* 99: 16267-16272, 2002
- 10) Iwanami A, Kaneko S, Nakamura M, et al: Transplantation of human neural stem cells for spinal cord injury in primates. *J Neurosci Res* 80: 182-190, 2005
- 11) Jendelova P, Herynek V, Urdzikova L, et al: Magnetic resonance tracking of transplanted bone marrow and embryonic stem cells labeled by iron oxide nanoparticles in rat brain and spinal cord. *J Neurosci Res* 76: 232-243, 2004
- 12) Kumagai G, Okada Y, Yamane J, et al: Roles of ES cell-derived gliogenic neural stem/progenitor cells in functional recovery after spinal cord injury. *PLoS ONE* 4: e7706, 2009
- 13) Lee Z, Dennis JE, Gerson SL: Imaging stem cell implant for cellular-based therapies. *Exp Biol Med (Maywood)* 233: 930-940, 2008
- 14) Ogawa Y, Sawamoto K, Miyata T, et al: Transplantation of *in vitro*-expanded fetal neural progenitor cells results in neurogenesis and functional recovery after spinal cord contusion injury in adult rats. *J Neurosci Res* 69: 925-933, 2002
- 15) 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
- 16) Partlow KC, Chen J, Brant JA, et al: 19F magnetic resonance imaging for stem/progenitor cell tracking with multiple unique perfluorocarbon nanobeacons. *FASEB J* 21: 1647-1654, 2007
- 17) Rice BW, Cable MD, Nelson MB: *In vivo* imaging of light-emitting probes. *J Biomed Opt* 6: 432-440, 2001
- 18) Sher F, van Dam G, Boddeke E, et al: Bioluminescence imaging of Olig2-neural stem cells reveals improved engraftment in a demyelination mouse model. *Stem Cells* 27: 1582-1591, 2009
- 19) Takahashi Y, Tsuji O, Kumagai G, et al: Comparative study of methods for administering neural stem/progenitor cells to treat spinal cord injury in mice. *Cell Transplant* 20: 727-739, 2011
- 20) Tsuji O, Miura K, Okada Y, et al: Therapeutic potential of appropriately evaluated safe-induced pluripotent stem cells for spinal cord injury. *Proc Natl Acad Sci USA* 107: 12704-12709, 2010
- 21) Togel F, Yang Y, Zhang P, et al: Bioluminescence imaging to monitor the *in vivo* distribution of administered mesenchymal stem cells in acute kidney injury. *Am J Physiol Renal Physiol* 295: F315-321, 2008

MEDICAL BOOK INFORMATION

医学書院

問題解決型救急初期診療 第2版

田中和豊

●B6変型 頁608 2011年
 定価5,040円(本体4,800円+税5%)
 [ISBN978-4-260-01391-8]

救急患者の診断からマネジメントまで、フローチャートなどを用いて優先順位をつけ、考えること・すべきことの流れを理解し、初期診療につなげる。特に基本的症候へのアプローチに重点を置き、単に手順を示すのではなく、真に理解しながら学べるよう問題解決のプロセスに焦点を当てた。最新のエビデンスとガイドラインに基づいた内容を盛り込み、マイナー系救急の内容も加わり、ますます充実した研修医必携の待望の改訂版。

炎症・感染症

整形外科の基礎研究における
蛍光・バイオイメージング法
感染症領域への応用船尾 陽生* 石井 賢* 蔵本 哲也*
塩野 雄太* 吉岡 研之* 石濱 寛子*
中村 雅也* 戸山 芳昭* 千葉 一裕*
松本 守雄*Establishment of Real-time and Quantitative Mouse Model of
Musculoskeletal Infections Using Bio-imaging TechniquesHaruki FUNAO, Ken ISHII, Tetsuya KURAMOTO, Yuta SHIONO,
Kenji YOSHIOKA, Hiroko ISHIHAMA, Masaya NAKAMURA,
Yoshiaki TOYAMA, Kazuhiro CHIBA, Morio MATSUMOTO

臨整外 47 : 43~49, 2012

Key words : バイオイメージング (bio-imaging), バイオルミネッセンスイメージング (bioluminescence imaging : BLI), 蛍光イメージング (fluorescence reflectance imaging : FRI)

われわれは、バイオイメージングの手法を用い、とくに感染症領域での研究を進めている。骨軟部組織感染症の病態はいまだ不明な点も多く、診断や治療に難渋することが少なくない。過去の動物モデルは、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。本稿で紹介する骨軟部組織感染症モデルは、同一個体におけるリアルタイムな細菌感染動態の可視化が可能であり、病態解明や新たな抗生剤・抗菌素材などの開発、また治療効果判定にも極めて有用であると考えられる。バイオイメージングは今後さらなる他分野への応用が期待される技術である。

はじめに

近年、臨床現場における各種画像診断法の急速な進歩により、非侵襲的で迅速かつ正確な診断や治療が可能となった。しかし、整形外科領域の疾患や外傷では時に身体・画像所見に乏しく、器質的異常の有無の診断に苦慮することも少なくない。画像診断が困難な理由として、①加齢現象がもたらす組織の退行変性所見の存在、②微小病変が描出されない限界例が存在すること、などが考

えられる。生体内における遺伝子発現や細胞動態などの分子・細胞レベルでの変化や異常を描出することができれば、診断精度はさらに向上し、組織診断も可能になると思われる。

一方、基礎研究分野においては分子画像診断法が古くから導入され、今日では必要不可欠なツールとなっている。われわれは過去10年にわたり、*in vivo* イメージング法(表1)であるバイオルミネッセンスイメージング (bioluminescence imaging : BLI) と蛍光イメージング (fluorescence reflectance imaging : FRI) の手法を基礎研究領域

* 慶應義塾大学医学部整形外科 (〒160-8582 東京都新宿区信濃町35) Department of Orthopaedic Surgery, School of Medicine, Keio University

表1 基礎研究に用いられている *in vivo* イメージングシステム

	解像度	深度	時間	薬剤	利点	欠点
超音波	50 μ m	mm-cm	Min	microbubbles	マウスの表面に近い組織形態と生理機能	骨または肺のイメージでは能力が限られる
CT	50 μ m	無制限	Min	ヨード	解剖学的検出に優れる	軟部組織のコントラストが低い
PET	1-2 mm	無制限	Min	プローブまたは基質	高感度 細胞代謝を定量化 プローブの多様性	低解像度 非結合プローブによるノイズ
MRI	10-100 μ m	無制限	Min-Hours	常磁性体陽イオンプローブ	高空間解像度 解剖学的・機能的検出に優れる	低感度 撮像時間が長い
BLI	1-3 mm	cm	Min	ルシフェラーゼおよび基質	高感度 細胞の生存・機能を定量化 ハイスループット 遺伝子導入可能	解剖学的解像度低い 組織深度に依存
FRI	1-3 mm	<1 cm	Sec-Min	蛍光蛋白, 蛍光色素	多重イメージング ハイスループット 遺伝子導入可能	600 nm 以下は組織深度に依存 自家蛍光によるノイズ



図1 ジョルジュ・ド・ラ・トゥール (1593-1652)

Secure data storage: Louvre, Paris

へ導入し、動物生体内での各種遺伝子発現⁹、再生医療の移植細胞動態^{9,16,12,17}、感染症の細菌動態や各種治療効果判定などに利用してきた。本稿では蛍光・バイオイメージングの基礎と、整形外科の感染症研究領域でわれわれが行ってきた研究

成果の一部を紹介する。

分子画像診断法とは？

400年以上前のフランスの画家ラ・トゥールの作品(図1)では、ろうそくの光が女の子の手を透過している画が描かれている。これは、驚くことに400年以上前から一部の波長の光は組織透過性を有していることが知られていたことを意味する。特に赤い光は、緑の光よりも透過性が高いことが知られている。分子画像診断法とは、これらの光の組織透過性の性質を応用し、生体内での発光や蛍光を生体外から捉えることにより、遺伝子発現や特定の分子、細胞を非侵襲的かつリアルタイムに描出する *in vivo* イメージング法である(図2)。

1. 発光による *in vivo* イメージング:

バイオルミネッセンスイメージング

(bioluminescence imaging: BLI)

ホタル、ウミシイタケ(*Renilla*)、コメツキムシ(*Pyrophorus plagiophthalmus*)や細菌類(*Vibrio fischeri*, *V. harveyi*)などは、発光酵素であるルシフェラーゼを有している。発光による *in*

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)

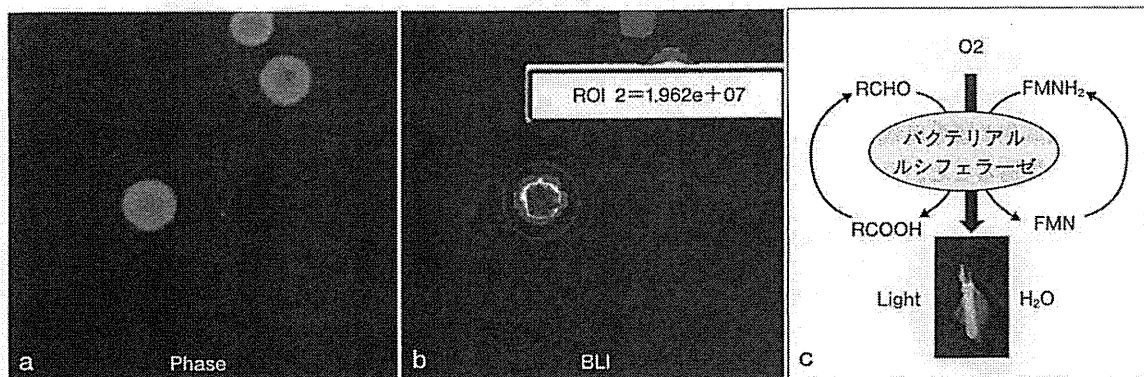
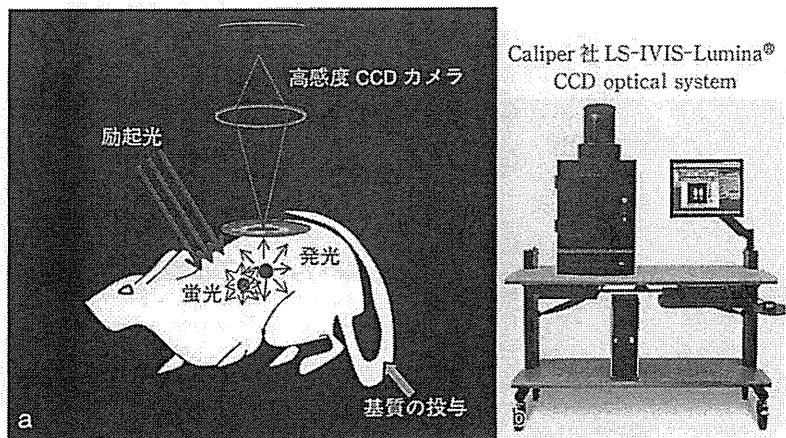


図3 Bacterial ルシフェラーゼを遺伝子導入された細菌と発光原理

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の遺伝子の発現、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

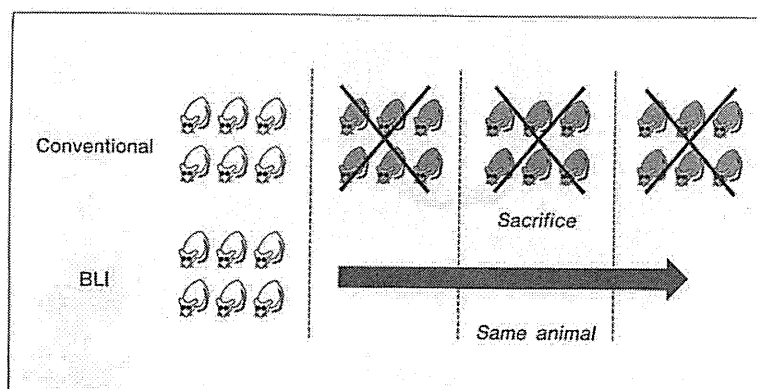


図4 分子画像診断法の最大の特徴
同一個体の生きた動物での遺伝子発現
や細胞動態などが非侵襲的にリアルタイムに観察可能である。

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(慢性骨髄炎モデル・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^{6,7,14,15)}。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

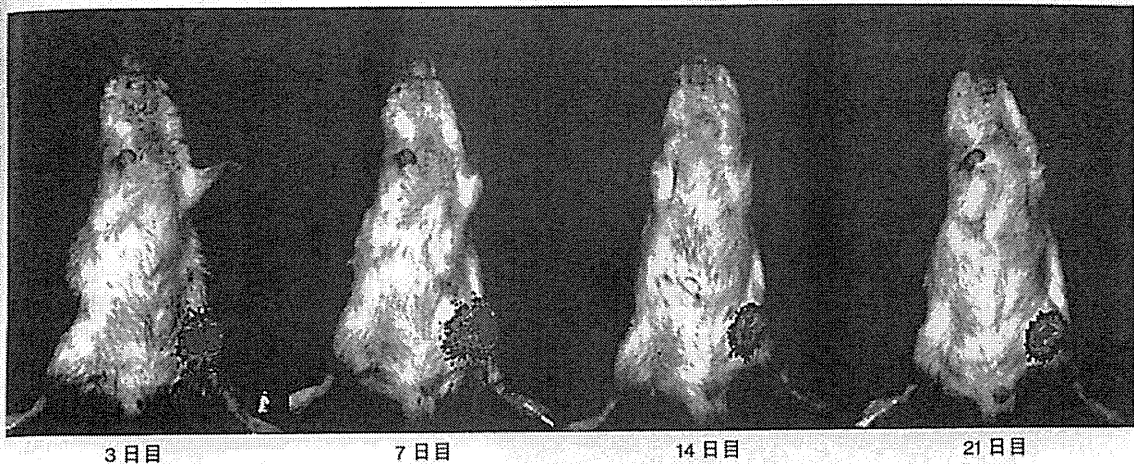


図5 BLIによるマウス慢性骨髓炎モデルの細菌の経時的動態
細菌の発光は3日目をピークに上昇し、その後は宿主の免疫獲得とともに下降して、やがてプラトーとなる。細菌は3カ月以上の長期にわたり生存し、安定した発光を維持する。

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髓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髓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髓腔内に細菌を注入し、骨髓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^{14,19)}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

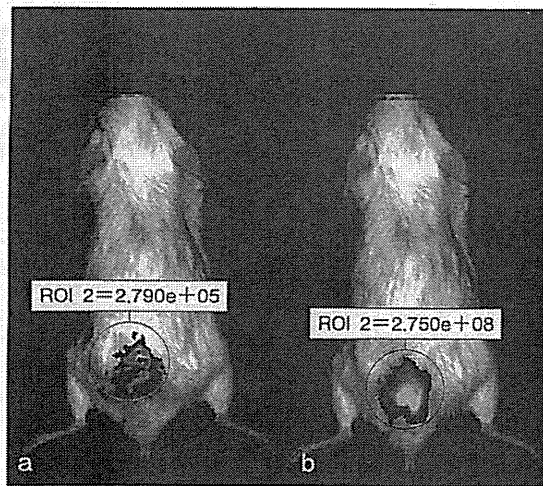


図6 浅殿筋感染症モデル(同一動物)における多重イメージング(BLIとFRI)画像

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

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)




新登場

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。

手の外科の実際 改訂第7版

■著 津下健哉 (広島大学名誉教授)

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



最新刊

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

