

生体内リアルタイム共焦点顕微鏡

松本 有^{*1-3)}, 野本貴大^{*4)}, 藤 加珠子^{*1)}, 片岡一則^{*1,4)}

IVRTCLSM : intravital real-time confocal laser scanning microscopy

DDS 開発は高分子化合物のデザインと合成・物性評価・構造解析にはじまり、培養細胞を用いた評価、さらに小動物を用いた評価へ進む。DDS は内包薬剤を保護(ステルス性・安定性)しつつ、標的に送達(選択性・集積性)させ、効率よく薬剤を

放出(徐放性・環境応答性)する必要がある。このような一連の高度な機能を空間的・時間的に評価する手法として小動物 *in vivo* イメージングが注目を浴びている。近年、小動物イメージング装置として PET、SPECT、CT、MRI、可視光、蛍光、

発光などを単独あるいは複合的に用いたさまざまな機器が各社から販売されている。これらの装置は、非侵襲的・経時的に個体全体を観察するものであり、すでに DDS 研究にとって欠かせないツールとなっているが、空間分解能が低く細胞レベル・細胞内小器官レベルの評価が困難である。

本稿では、筆者が取り組んでいる生体内リアルタイム共焦点顕微鏡 (IVRTCLSM : intravital real-time confocal laser scanning microscopy) と DDS 研究への応用、今後の展望について述べる。

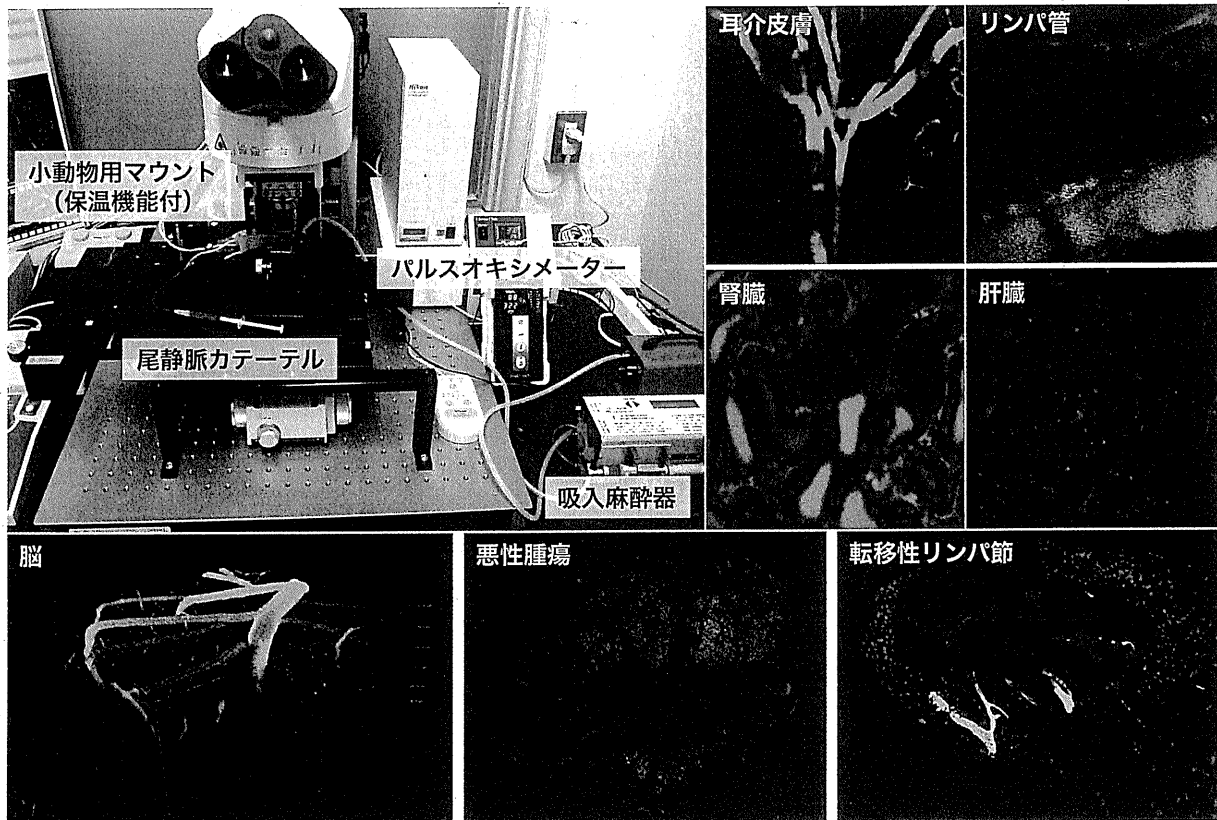


図1 生体内リアルタイム共焦点顕微鏡 (IVRTCLSM)

Yu Matsumoto^{*1-3)}
 Takahiro Nomoto^{*4)}
 Kazuko Toh^{*1)}
 Kazunori Kataoka^{*1,4)}
^{*1)}Division of Clinical Biotechnology, Center for Disease Biology and Integrative Medicine, Graduate School of Medicine, The University of Tokyo 東京大学大学

院医学系研究科附属疾患生命工学センター臨床医工学部門
^{*2)}Department of Otorhinolaryngology and Head and Neck Surgery, Graduate School of Medicine and Faculty of Medicine, The University of Tokyo 東京大学大学院医学系研究科外科学専攻感覚運動機能講座耳鼻咽喉科学分野

^{*3)}Department of Otorhinolaryngology and Head and Neck Surgery, Mitsui Memorial Hospital 社会福祉法人三井記念病院耳鼻咽喉科

^{*4)}Department of Bioengineering, Graduate School of Engineering, The University of Tokyo 東京大学大学院工学系研究科バイオエンジニアリング専攻

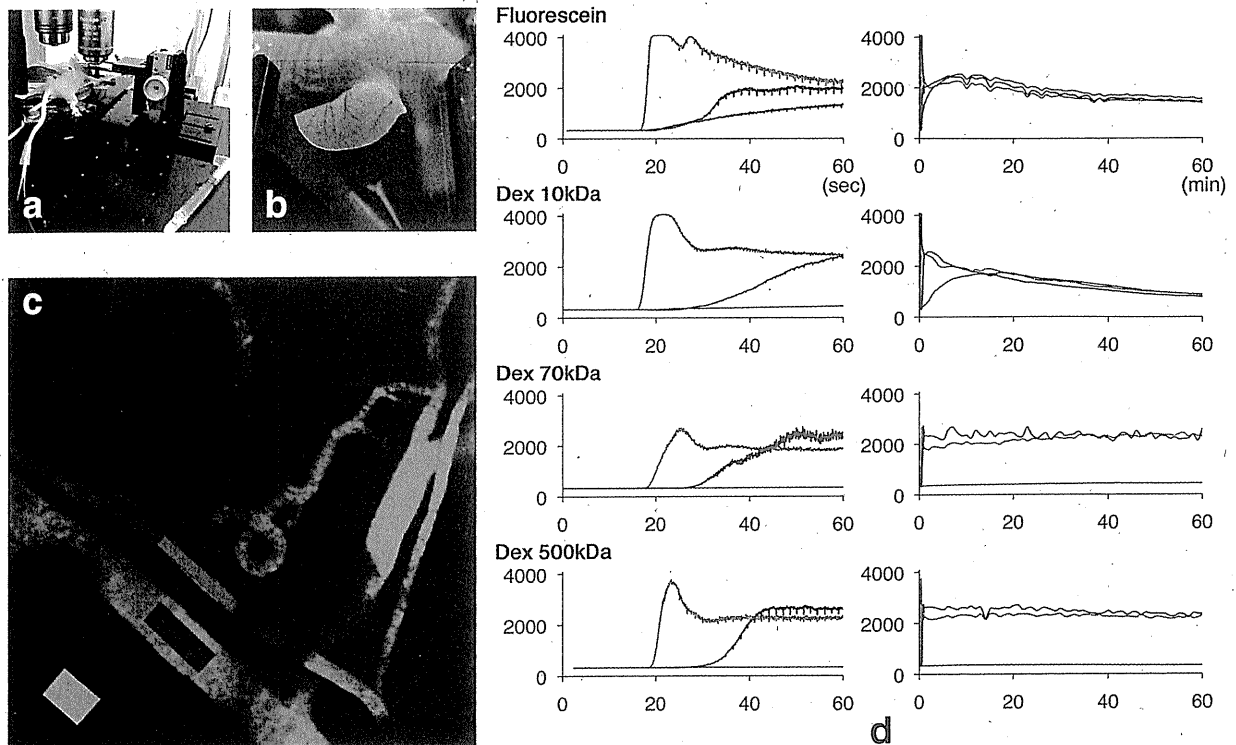


図2 血中滞留性、組織移行性のリアルタイム観察

フルオレセイン(分子量 332)またはフルオレセイン標識デキストラン(Dex: 平均分子量 10 kDa, 70 kDa, 500 kDa)を尾静脈カテーテル(a)から投与し、耳介皮膚(b)を観察した。得られた画像(c)から動脈、静脈、周囲組織に分けてROIを設定し、平均蛍光強度を経時的にプロットした(d)。フルオレセインは動脈から静脈相に移行すると同時に周囲組織に漏れ出したが、FD 10 kDaは徐々に周囲組織へ漏れ、10~15分をピークに排泄された。FD 70 kDaとFD 500 kDaは血管から漏れることなく60分滞留した。

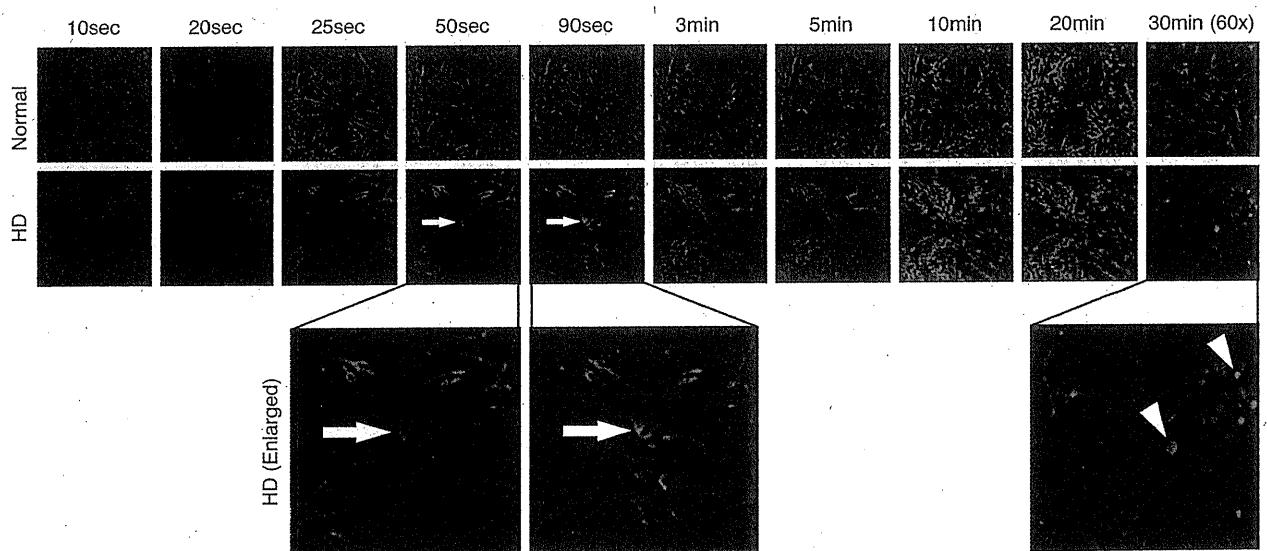


図3 ハイドロダイナミック法がマウス肝臓に及ぼすインパクトの観察

プラスミドDNAをCy5(赤)で標識し、通常法(Normal)およびハイドロダイナミック(HD)法により投与し、肝小葉を観察した。HD法では肝中心静脈からプラスミド遺伝子が逆流し(矢印)、2分間にわたり肝固有動脈と中心静脈が圧平衡を保ち続けた。投与30分後HD法ではNormalにくらべて多くのプラスミド遺伝子が肝細胞核(青)に取り込まれていた(三角)。

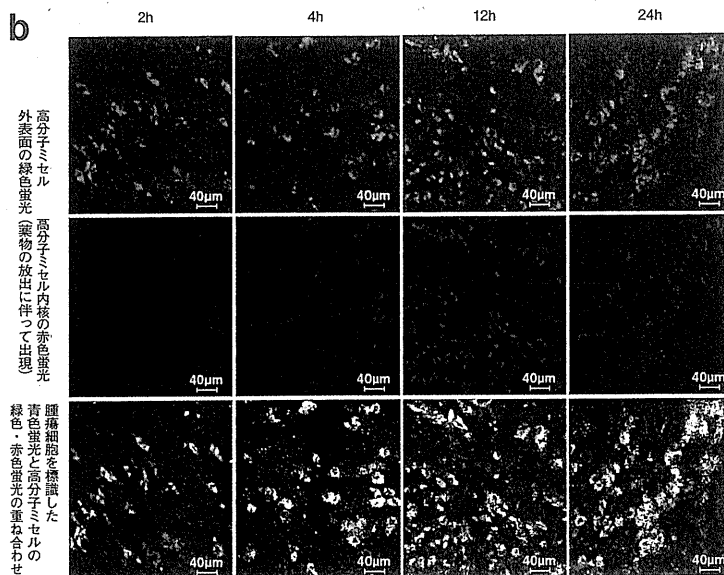
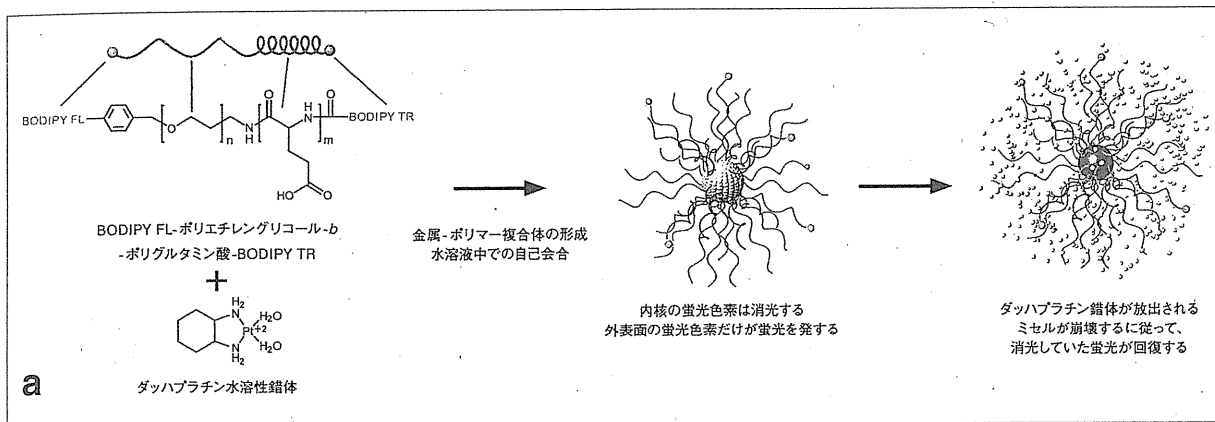


図4 ダッハプラチン内包高分子ミセルの生体内挙動の観察

高分子ミセルの外表面に BODIPY FL(緑), 内核に BODIPY TR(赤)の二つの蛍光色素で標識すると, 高分子ミセルが安定な状態では外表面の緑色蛍光のみが検出され, 内核の赤色蛍光は濃度消光を起こす。薬物放出とともに消光状態は解除され, 赤色蛍光が検出されるようになる(a)。これをヒト大腸がん由来 HT29 腫瘍モデルマウスに投与し, 経時の変化を追跡した。腫瘍細胞を CellMask(青)で標識した。投与直後は高分子ミセルが安定に血中を循環し内包薬剤を放出しなかった²⁾(Supplementary Video S2 参照)。

投与2時間後に腫瘍細胞を標識した青色蛍光とミセルの外表面を標識した緑色蛍光の重なり示されるように, 腫瘍細胞へのミセルの取り込みを認めた。投与4時間後よりミセルが取り込まれた腫瘍細胞において薬剤放出を示す赤色蛍光が経時的に増加し, 細胞内で薬剤が徐々に放出される様子が観察された(b)。

生体内リアルタイム共焦点顕微鏡 (IVRTCLSM)

IVRTCLSM では小動物に麻酔をかけて, 観察部位を手術によって露出させ, 対物レンズの前に固定し, 共焦点顕微鏡で観察する。共焦点顕微鏡は深さ方向に分解能を持ち, 組織や臓器などの厚い試料から光学的切片画像が得られる。詳しい測定原理については, 本誌 26-4号「マクロ

共焦点顕微鏡を用いた粘膜組織における細胞動態」の稿に譲る。心拍, 呼吸, 蠕動運動などによる画像のブレを最小限にするため, また血流などの速い動きを捉えるために, 高速撮影機能を搭載した装置を用いる。

高速共焦点顕微鏡は, そもそも Ca イオンや pH などの蛍光指示薬を注入した生細胞の動態観察をビデオレート(30 fps)あるいはそれ以上の速さで撮影するために設計されて

おり, マウスが試料台に載ることは考慮されていない。つまり対物レンズの上下の可動域はわずか 30 mm 程度であり, 試料台は培養皿やプレパラートを保持する一般的な物である。小動物を観察するために各研究室で改造を加えている。

筆者の構築した IVRTCLSM は Nikon A1R スキャンユニットと正立顕微鏡 ECLIPSE FN1 の組み合わせを採用している(図1)。鏡基 FN1

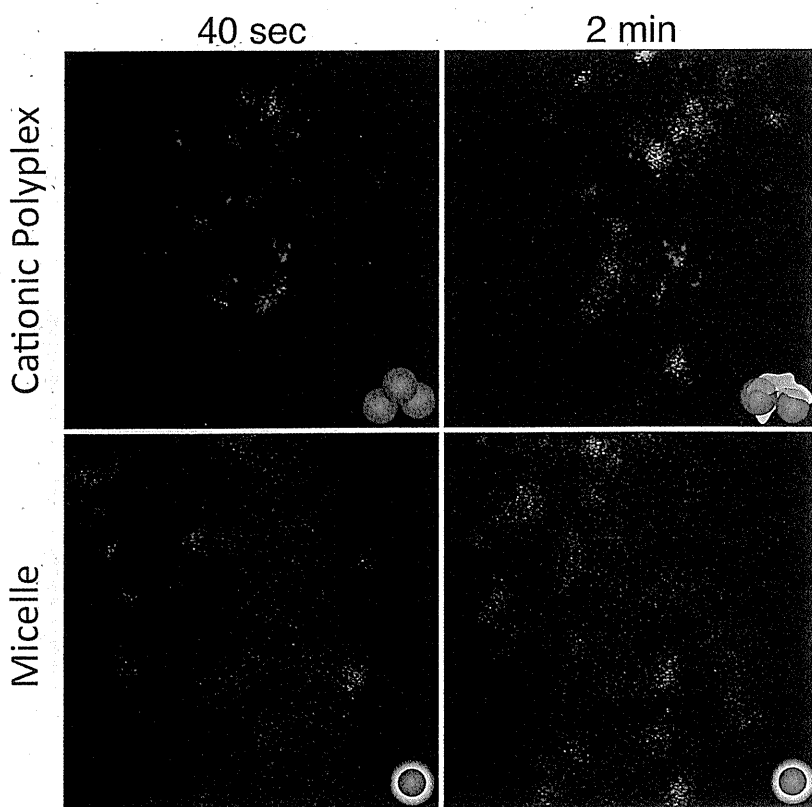


図5 ポリプレックスと高分子ミセルの生体適合性評価

DyLight 488(緑)標識抗 GPIIb/IIIa 抗体を静脈投与し血小板を標識した。Cy5(赤)標識プラスミド DNA を用いてポリプレックスと高分子ミセルを調製し、耳介皮膚血管を観察しながら尾静脈カテーテルから投与した。ポリプレックスは投与直後から血中に凝集塊を形成し、数分後にはその凝集塊に血小板が接着した。高分子ミセルは血中に一様に存在し凝集塊形成と血小板との相互作用を認めなかった。

の透過光ユニットを取り外し電動 XY ステージをできるだけ下方に設置することによって小動物を固定する空間を確保した。長時間安定した麻酔を維持するために周辺機器として吸入麻酔器、保温機能付きマウント、パルスオキシメーターなどを揃えている。尾静脈カテーテルを留置すると撮影しながらでも、観察視野を動かすことなく各種試薬の投与が可能である。

応用例

① マウス耳介の真皮深層にある血管を観察しつつ、フルオレセインおよび様々な分子量のフルオレセイン標識デキストランを投与した(図

2)。血中滞留性、組織移行性をリアルタイムに追跡し、分子量の違いが薬物動態に及ぼす影響を明確にした¹⁾。

② マウス肝臓への遺伝子導入として一般的に用いられるハイドロダイナミック法(大量急速静注)のインバクトを肝小葉レベルで観察した(図3)。ハイドロダイナミック法では肝中心静脈からプラスミド遺伝子が逆流し、2分間にわたり肝固有動脈と中心静脈が圧平衡を保ちつづけた。ハイドロダイナミック法では急速な右心房圧上昇により下大静脈の鬱血、肝静脈への逆流が起こり、投与されたプラスミド遺伝子溶液が血液と混合されないまま肝細胞核に送達される様子を確認した¹⁾。

③ 当研究室で開発したグッハプラチン内包高分子ミセルの生体内挙動について評価した(図4)。投与直後は高分子ミセルが安定に血中を循環し、内包された薬剤を放出しなかった。約12時間後に一部の高分子ミセルは血中から腫瘍細胞に取り込まれ、細胞内で薬剤を放出した。高分子ミセルの腫瘍内取り込みだけでなく腫瘍細胞内での薬剤放出まで経時的に評価することができた²⁾。

④ ポリエチレングリコール(PEG)修飾高分子ミセルとPEGの無いポリプレックスの血中滞留性、生体適合性を検討した(図5)。ポリプレックスは投与直後から凝集塊を形成し数分後にはその凝集塊に血小板が接着した。高分子ミセルは凝集塊形成および血小板との相互作用を認めず、血中滞留性が向上した³⁾。

DDS 研究・開発での意義と今後の展望

IVRTCLSM は、薬物動態の解析や DDS に付与した高度な機能を評価する手法として有用である。DDS 研究では内包する薬剤を蛍光標識したり、キャリアの高分子側を蛍光標識したり、あるいは標的(がん)細胞に蛍光蛋白質恒常発現株を用いたり、と自由度が高く IVRTCLSM と相性がよい。

DDS は主に癌治療、遺伝子治療を目的としたものであるが、別の観点から考えると蛍光プローブを送達するナノキャリアとしても応用可能である。それまでは培養細胞や組織切片にしかローディング出来なかった蛍光プローブを DDS 技術によって生体の標的細胞で機能させたり、さまざまな蛍光蛋白質を発現せたりすることが出来れば、IVRTCLSM による解析との組み合わせによって生命現象の解析、病態

の解明, 多くの疾患診断法の開発などに貢献できる.

機器導入に関連する付帯事項

IVRTCLSM の導入は機器の購入だけでは成しえない. 鏡基の改造, 小動物用マウントなど特注品の設計と改良, 麻酔器などの周辺機器の整備, 消耗品の整備に加えて, 麻酔科および外科領域の知識と技術が必要である.

日本で購入できる機器メーカーのリスト

高速撮影機能を搭載した市販の共焦点顕微鏡を以下に列挙した. スキャン方式, 時間分解能, 同時検出可能なチャンネル数などが異なる.

- ・ Nikon 社製 A1R
(<http://www.nikon-instruments.jp/>)
- ・ Leica Microsystems 社製 TCS SP5 II (<http://www.leica->

microsystems.com/jp/)

- ・ Carl Zeiss 社製 LSM 7 LIVE (<http://www.microimaging.zeiss.co.jp/>)
- ・ Yokogawa Electric 社製 CSU-X1 (<http://www.yokogawa.co.jp/>)
- ・ Olympus 社製 DSU (<http://www.olympus.co.jp/>)

最後に共焦点内視鏡型顕微鏡について紹介する. 小孔から細径プローブを挿入し低侵襲で観察ができる. 取り扱いが簡便であるが, 感度・撮影速度・チャンネル数に制約がある.

- ・ OptiScan 社製 FIVE1 (<http://www.optiscan.com/Products/FIVE1.asp>)
- ・ VisualSonics 社製 Cellvisio LAB (<http://www.visualsonics.com/cellviziolab>)

本研究は科学技術振興財団 (JST) の戦略的基礎研究推進事業 (CREST) および日本学術振興会 (JSPS) の最先端研究開発支援プロ

グラム (FIRST) の支援により行った. 顕微鏡の改造に御尽力いただいた株式会社ニコンインステックに深謝する.

文献

- 1) Matsumoto Y, Nomoto T, Cabral H, Matsumoto Y, Watanabe S, Christie RJ, Miyata K, Oba M, Ogura T, Yamasaki Y, Nishiyama N, Yamasoba T, Kataoka K: Direct and instantaneous observation of intravenously injected substances using intravital confocal micro-videography. *Biomed Opt Express* 1: 1209-1216, 2010.
- 2) Murakami M, Cabral H, Matsumoto Y, Wu S, Kano MR, Yamori T, Nishiyama N, Kataoka K: Improving drug potency and efficacy by nano-carrier-mediated subcellular targeting. *Science Translational Medicine* 3: 64ra2, 2011.
- 3) Nomoto T, Matsumoto Y, Miyata K, Oba M, Fukushima S, Nishiyama N, Yamasoba T, Kataoka K: In situ quantitative monitoring of polyplexes and polyplex micelles in the blood circulation using intravital real-time confocal laser scanning microscopy. *Journal of controlled release* 151: 104-109, 2011.

