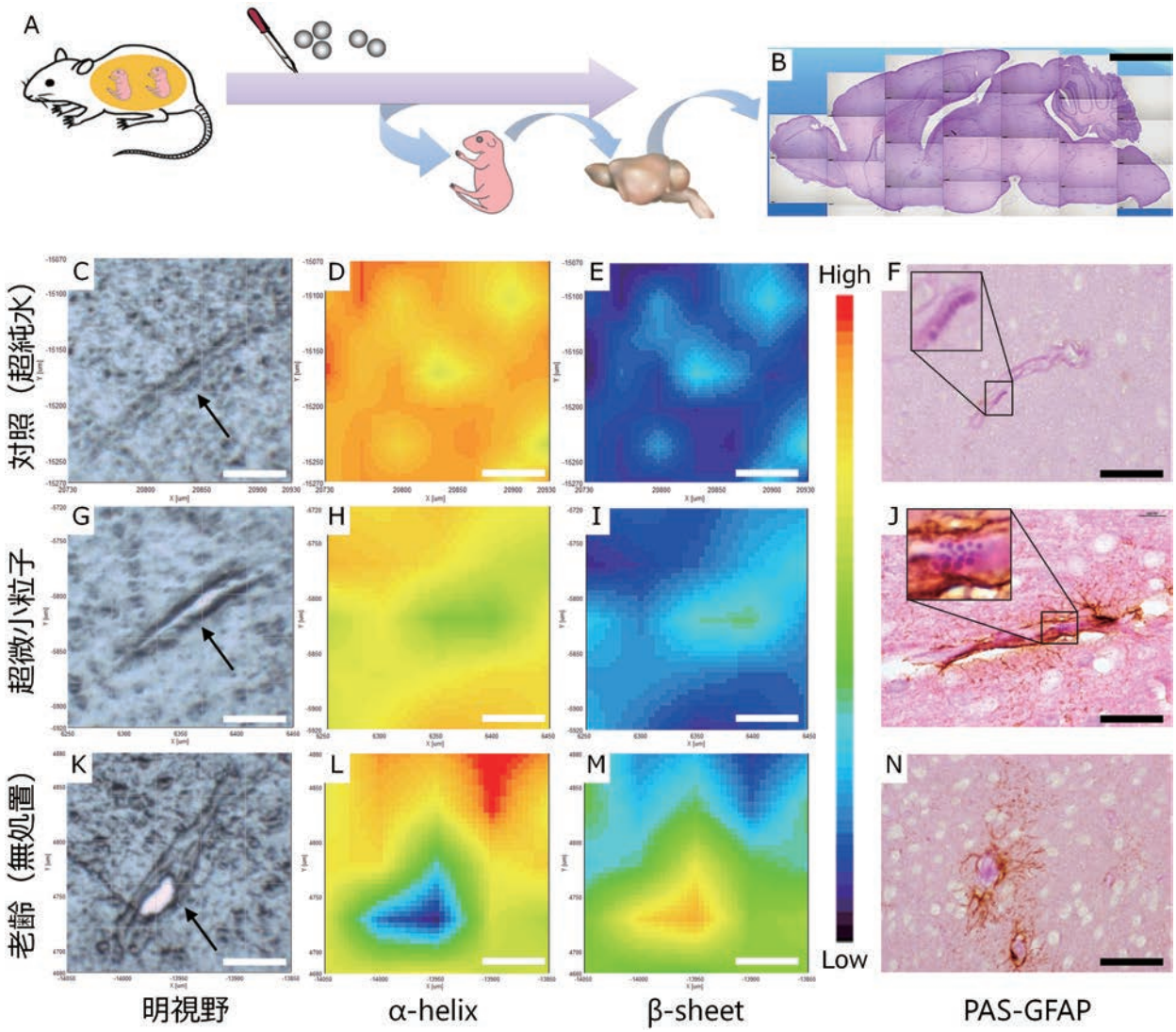
2016 年 25 巻 1 号（通巻 78 号）
ISSN 1342-2634
日本バイオイメージング学会

バイオイメージング

（第 24 回学術集会ベストイメージング賞・ニコン賞受賞）



「超微小粒子の胎児期曝露に伴う脳血管周辺異常の赤外顕微法による可視化」

表紙の図：

超微小粒子の胎児期曝露に伴う脳血管周辺異常の赤外顕微法による可視化

小野田淳人[1,2,5]、川﨑平康[3]、築山光一[3,4]、武田健[2]、梅澤雅和[2]
[1]東京理科大学院・薬学部、[2]東京理科大学・総研・環境次世代、[3]東京理科大学・総研・IR-FEL センター、
[4]東京理科大学・理学部・化学、[5]日本学術振興会特別研究員 DC

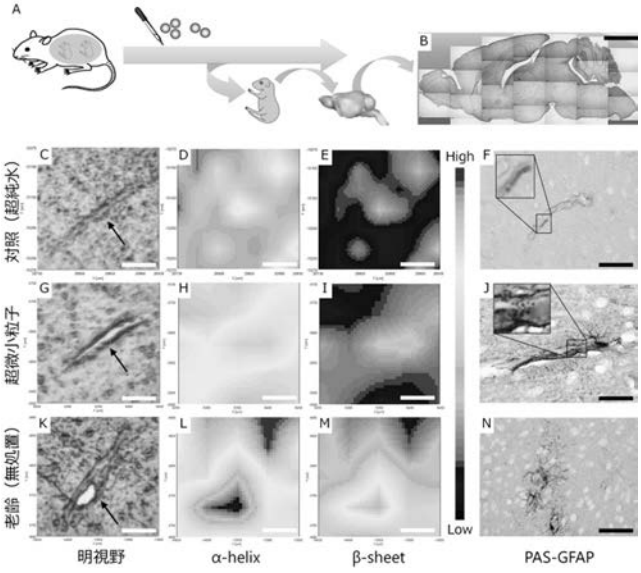
（第 24 回学術集会ベストイメージング賞・ニコン賞受賞）

大気中微小粒子 $PM_{2.5}$ は健康に対する高リスク物質として問題となっており、とくにその 1-100 nm 画分にあたる超微小粒子（ナノ粒子）が生体に及ぼす影響を解明することが求められている。表紙は、超微小粒子の胎児期曝露（妊娠期経気道投与）によって産児中枢神経系の血管周辺領域に生じる異常を、*in situ* 赤外顕微スペクトル解析を用いることで明らかにした成果である。

人々の健康を守り、QOL の向上を考える上では、成育時のみならず出生前と環境との関りを理解することが重要である。大気汚染物質として環境中に多量に存在する超微小粒子が妊娠母体に曝露されると、胎児の中枢神経系に到達し、出生後も残留し続けることが明らかになっている（Takeda et al., *J Health Sci*, 2009）。そのため、超微小粒子の胎児期曝露による産児中枢神経系への影響を解明することが求められている。先行研究により、超微小粒子の胎児期曝露は産児脳血管周辺の血管周囲マクロファージ (PVM) の消化顆粒を肥大化させ、その周囲に存在するアストロサイトのグリア線維性酸性タンパク質（GFAP）の発現亢進を脳全域にびまん性に引き起こすことが PAS-GFAP 重染色により明らかになった (Onoda et al., *PLoS One*, 2014)。本研究はとくに、超微小粒子の胎児期曝露によって引き起こされる脳血管周辺の組織学的異常を *in situ* 赤外顕微スペクトル法で分析し、その異常をタンパク質の構造変化の観点から明らかにしたものである。

具体的には、カーボンブラックナノ粒子 (CB-NP) 懸濁液を妊娠 5, 9 日目の ICR 系マウスに点鼻投与 (95 μg/kg) し、出生児 (6 週齢) から全脳を摘出した。この脳組織の連続切片を作製し、赤外顕微法、PAS 染色および免疫染色を実施した。赤外顕微法の多点測定と、アミド結合を反映する 1600 – 1700 cm^{-1} に着目したスペクトル解析の結果、CB-NP 曝露群において血管周辺に近付くほどに α-helix 構造の割合が減少し、β-sheet 構造の割合が増加することが示された。とくに、血管に隣接する区画における β-sheet 構造の割合は、対照群の 13±1%に対して曝露群では 22±1%と、有意に増加した。アルツハイマー病に代表される Conformational Disease の原因となる老廃物の多くは、β-sheet 構造を主体として構成するタンパク質であり、血管周辺に排出されることが報告されている。脳血管周辺における β-sheet 構造の割合の増加は、中枢神経系内での老廃物生成の亢進、あるいはその分解や排出が抑制され、蓄積していることを示唆している。これを裏付けるように、若齢個体よりも際立って老廃物の蓄積が認められる老齢個体 (30 ヶ月齢・無処置) の脳血管周辺においてより顕著に β-sheet 構造の割合が増加した。

本研究結果から、超微小粒子の胎児期曝露は産児脳血管周辺のタンパク質組成を変化させることが明らかになり、ここで老廃物の蓄積が誘発されている可能性が示唆された。本研究は、超微小粒子胎児期曝露が次世代の中枢神経系に及ぼす影響のメカニズム解明にむけた足がかりとなり、その影響の制御ならびにリスク回避の確立への貢献が期待される。



A) 実験デザイン。超微小粒子を胎児期に投与し、産児から脳を摘出。
B) 脳の矢状面切片の全体像。向かって左が吻側、右が尾側。
C, G, K) 明視野、D, H, L) α-helix 構造の割合、 E, I, M) β-sheet 構造の割合
F, J, N) PAS-GFAP 重染色 (Brown: GFAP、拡大: PVM 消化顆粒)
D, E), H, I), L, M) は、左端の画像 C, G, K（無染色）を測定したもの。
C-F) Control 群。組織全体において α-helix の割合が高く、β-sheet の割合が低い。GFAP 発現亢進、PVM の消化顆粒肥大化は認められない。
G-J) 超微小粒子曝露群。血管周辺の α-helix 構造の割合が減少し、β-sheet 構造の割合が増加している。血管周辺には GFAP の発現亢進および PVM 消化顆粒の肥大化が認められた。
K-N) 老齢個体。血管周辺の α-helix 構造の割合は低く、β-sheet 構造の割合が顕著に高い。GFAP の発現は血管周辺のみならず、血管から離れた組織においても発現亢進が認められる。
矢印：血管　スケールバー：B) 1.5 mm, C-N) 50 μm

第 25 回日本バイオイメージング学会学術集会
「公開講座」並びに「学術講演会」のお知らせ

第 25 回日本バイオイメージング学会学術集会　大会長　加藤晃一
自然科学研究機構　岡崎統合バイオサイエンスセンター
* E-mail: bioimaging2016@phar.nagoya-cu.ac.jp

第 25 回日本バイオイメージング学会学術集会を開催いたします。多くの方々にご参加頂きたくご案内申し上げます。プログラム等の詳細につきましては学術集会 URL：http://www.phar.nagoya-cu.ac.jp/bioimaging/をご覧ください。

会期：平成 28 年 9 月 4 日（日）～　6 日（火）
　◆公開講座：9 月 4 日（日）12:30～17:40
　◆学術講演会：9 月 5 日（月）9:00
　　～　6 日（火）18:00
会場：名古屋市立大学薬学部　宮田専治記念ホール
　（名古屋市瑞穂区田辺通３－１）
　（http://www.nagoya-cu.ac.jp/phar/access/index.html）

◎**重要事項の締切り期日、等**

◆ポスター発表受付締切り期日
　〇演題申込み・締切り　平成 28 年 6 月 30 日（木）
　〇抄録原稿・締切り　平成 28 年 6 月 30 日（木）
　〇ポスターサマリー用パワーポイントファイル
　　送付締切り　平成 28 年 8 月 22 日（月）
◆参加登録・締切り　平成 28 年 8 月 5 日（金）
◆懇親会参加登録･締切り　平成 28 年 8 月 5 日（金）

★ポスター発表の演題を募集しています。申込手順は次のようになっています。締切り日を厳守して下さい。

〇演題申込み・抄録提出　~~平成 28 年 6 月 30 日（木）~~
　⇒平成 28 年 7 月 8 日（金）に延期しました！
〇申込方法：
大会 HP（http://www.phar.nagoya-cu.ac.jp/bioimaging/）より抄録のテンプレートをダウンロードし、日本語または英語の抄録を作成してください。
事前参加登録を行った後、抄録を事務局へメール送信してください。
（この際、事前参加登録番号の入力が必須です。）

※ポスターサマリー口演用パワーポイントファイルは平成 28 年 8 月 22 日（月）までに事務局へご送付ください。

◎**事前参加登録**

演題を出される方も、参加のみの方もホームページから申込書をダウンロードして必要事項を記入の上、事務局へメール送信してください。締切りは 8 月 5 日（金）です。

◎**懇親会の参加登録**も参加登録と同時に申込みをお願いします。

◎**参加費、懇親会費と支払い方法**

事前参加登録頂きましたら、参加費と懇親会費の合計（懇親会に出席されない方は参加費のみ）を下記口座に平成 28 年 8 月 15 日（月）までにご入金ください。

領収書は、学術集会受付にてネームカードと共にお渡します。

参加費：公開講座（無料）
　　学術講演会

一般	会員・協賛会員	6,000 円
	非会員	8,000 円
院生	会員・協賛会員	1,000 円
	非会員	3,000 円
学部生	全員	無料

懇親会費：一般　5,000 円　学生　2,000 円
振込手数料は、ご負担いただきたくお願い申し上げます。
〔振込先〕
　銀行・支店名：三菱東京 UFJ 銀行
　　石川橋支店（店番号 278）
　口座番号：　００６８５１４
　口座名称：　第 25 回日本バイオイメージング学会
　　学術集会　大会長　加藤晃一

◎公開講座プログラム

日時：9 月 4 日（日）12:30～17:40（受付　12:00～）

会場：名古屋市立大学薬学部　宮田専治記念ホール

（名古屋市瑞穂区田辺通３－１）

テーマ「分子から心まで観るバイオイメージング」

12:30～14:25

「はじめに」川西　徹（国立医薬品食品衛生研究所）

1.「化学の力で見えないがんを見つける」

浦野泰照（東京大学大学院薬学系研究科）

2.「Life is small－スマホ顕微鏡が拓くミクロ世界」

永山國昭（総合研究大学院大学）

14:55～16:25

3.「3D プリンタが可能にする『分子を見て、触って考える』過程」

川上　勝（山形大学工学部）

4.「臓器や細胞の世界を、正しく、美しく、CG で見てみよう！」

瀬尾拡史（株式会社サイアメント）

16:45～17:30

5.「コミュニケーションの能力の神経基盤：イメージング手法によるアプローチ」

定籐規弘（自然科学研究機構　生理学研究所）

「おわりに」加藤晃一（自然科学研究機構

岡崎統合バイオサイエンスセンター）

◎学術講演会プログラム

日時：9 月 5 日（月）9:00　～　6 日（火）18:00

会場：名古屋市立大学薬学部　宮田専治記念ホール

9 月 5 日（月）

9:00　開会

9:10～11:10

シンポジウム１「細胞レベルの分子ダイナミクス」

オーガナイザー：加藤晃一（自然科学研究機構

岡崎統合バイオサイエンスセンター）

菊地和也（大阪大学大学院工学研究科）

1-1.「クロマチンイメージングより迫るリプログラミング機構」

宮成悠介（自然科学研究機構　岡崎統合バイオサイエンスセンター）

1-2.「細胞膜受容体の１分子可視化」

佐甲靖志（理化学研究所）

1-3.「新しい糖鎖プローブで追う脂質ラフトの実体」

安藤弘宗（岐阜大学応用生物科学部）

1-4.「GLUT4 の糖鎖機能を追う蛋白質履歴追跡プローブ」

菊地和也（大阪大学大学院工学研究科）

11:10～12:30

ポスターサマリー口演１

13:30～14:30

ポスター討論１

14:40～16:40

シンポジウム２「イメージング技術が明らかにする分子・細胞・組織の新たな動態」

オーガナイザー：稲垣直之（奈良先端科学技術大学院大学）

渡邊直樹（京都大学大学院医学研究科）

2-1.「高密度多重染色超解像顕微鏡 IRIS」

渡邊直樹（京都大学大学院医学研究科）

2-2.「２光子蛍光寿命イメージングによるシナプス内生化学反応の可視化と操作」

村越秀治（自然科学研究機構　生理学研究所）

2-3.「光シート顕微鏡の改良と発生学・細胞生物学への応用」

野中茂紀（自然科学研究機構　基礎生物学研究所）

2-4.「イメージングによる軸索伸長・ガイダンスの機械的制御の解析」

稲垣直之（奈良先端科学技術大学院大学）

16:50～17:50

特別講演

「生体内でシグナル伝達を可視化する蛍光タンパク質 FRET プローブの原理と応用」

松田道行（京都大学大学院医学研究科）

18:00～19:30

懇親会

9 月 6 日（火）

9:00～11:00

シンポジウム３「ナノバイオイメージング：１分子から細胞までの先端手法」

オーガナイザー：飯野亮太（自然科学研究機構

岡崎統合バイオサイエンスセンター）

内橋貴之（金沢大学自然科学研究科）

3-1.「金ナノプローブで生体分子の速いダイナミクスを観る」

飯野亮太（自然科学研究機構　岡崎統合バイオサイエンスセンター）

3-2.「電子顕微鏡による三次元バイオイメージング」

村田和義（自然科学研究機構　生理学研究所）

3-3.「高速 AFM による生体試料の動態イメージング」

内橋貴之（金沢大学自然科学研究科）

3-4.「X 線レーザーで生きた細胞を観る」

西野吉則（北海道大学電子科学研究所）

11:00～12:20

ポスターサマリー口演２

13:20～14:00

総会

14:00～15:00

ポスター討論２

15:10～17:10

シンポジウム４「薬学とバイオイメージング」

オーガナイザー：古野忠秀（愛知学院大学薬学部）

中川秀彦（名古屋市立大学大学院薬学研究科）

4-1.「金属錯体型蛍光プローブの細胞イメージング応用」

王子田彰夫（九州大学大学院薬学研究院）

4-2.「生物分子モーターの一分子蛍光イメージング」

角田　誠（東京大学大学院薬学系研究科）

4-3.「蛍光イメージングによる生体内の細胞・分子の挙動の評価」

樋口ゆり子（京都大学大学院薬学研究科）

4-4.「*in vivo* イメージングによるナノ DDS 製剤の評価」

浅井知浩（静岡県立大学薬学部）

17:20～17:50

奨励賞受賞者講演

17:50～18:00

表彰式、閉会式

◎<u>本学術集会についての問い合わせ先</u>

名古屋市立大学大学院薬学研究科

生命分子構造学分野内

第 25 回日本バイオイメージング学会学術集会事務局

加藤晃一

〒467-8603 名古屋市瑞穂区田辺通３－１

TEL:052-836-3448，FAX:052-836-3459

E-mail:bioimage2016@phar.nagoya-cu.ac.jp

◎<u>組織委員</u>

大会長　：加藤晃一

（自然科学研究機構

岡崎統合バイオサイエンスセンター）

副大会長：飯野亮太

（自然科学研究機構

岡崎統合バイオサイエンスセンター）

運営委員：稲垣直之

（奈良先端科学技術大学院大学）

佐藤匡史

（名古屋市立大学大学院薬学研究科）

中川秀彦

（名古屋市立大学大学院薬学研究科）

平嶋尚英

（名古屋市立大学大学院薬学研究科）

古野忠秀

（愛知学院大学薬学部）

矢木宏和

（名古屋市立大学大学院薬学研究科）

矢木真穂

（自然科学研究機構

岡崎統合バイオサイエンスセンター）

谷中冴子

（自然科学研究機構分子科学研究所）

2015 年度 第 24 回日本バイオイメージング学会学術集会を終えて

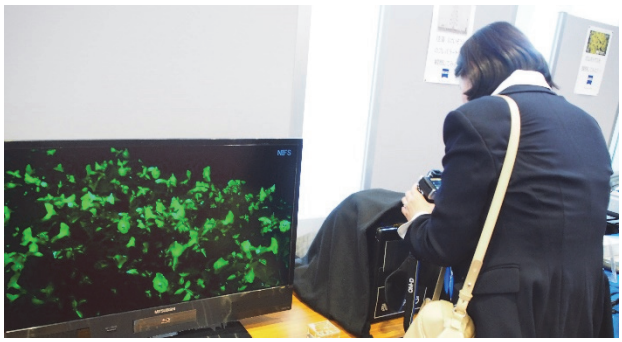
朽津 和幸 [1,2,3]

[1] 第 24 回日本バイオイメージング学会学術集会大会長; [2] 東京理科大学理工学部応用生物科学科;

[3] 東京理科大学イメージングフロンティアセンター

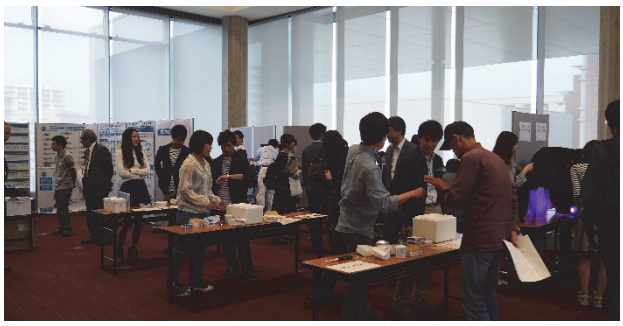
* E-mail: kuchitsu@rs.tus.ac.jp

本学会の第 24 回学術集会及び公開講座が、2015 年 9 月 26 日～28 日に、金町の東京大学葛飾キャンパス図書館大ホールで行われました。実行委員の先生方、展示･広告掲載企業、御協賛いただいた関連学会その他、とても多くの皆様方に大変お世話になりました。厚く御礼申し上げます。



9 月 26 日(土)には、文部科学省科学研究費補助金 研究成果公開促進費の補助を受け、学生や一般の方を対象とした**公開講座「私たちのくらしとバイオイメージングから見えるからわかるバイオの世界～」**を開催しました。ポスターやチラシのデザインは、自らも生物研究者で高校の教科書等でも活躍中の、イラストレーターのウチダヒロコ氏にお願いし、会員の皆様や、多くの高校や大学にお送りしました。当日は約 200 名の参加があり、東山哲也教授(名古屋大学)、横田秀夫博士(理研)、永井健治教授(大阪大学)の多彩な講演に加えて、上述のウチダ氏や、ミジンコの研究者としても高名な世界的ミュージシャン坂田明氏による講演とミジンコの映像をバックにしたサックスの生演奏で大いに盛り上がりました。会場はコンサートも行われ

るホールで、広いホワイエを使って、蛍光顕微鏡を使った実験、オワンクラゲの生体展示と GFP 蛍光の観察、遺伝子導入技術に基づく光る花や青いカーネーションの展示、画像解析技術に基づく「なかみが見える 3D 生物図鑑」、サイエンスコミュニケーション･バイオメディアアート展示などが花を添えました。実験では、東京理科大学の多くの学生が活躍し、高校生や一般の方々が興味深そうに顕微鏡を覗き込んでいました。休憩時間にはグレンデル社から



提供された美しいイメージング映像も上映されました。公開講座終了後、ホワイエで、講師の先生方を囲んで軽食をとりながら懇談しました。学生が講師の先生方に熱心に質問していた姿が印象的でした。

9 月 27 日、28 日の学術集会には、236 名が参加し、76 件ものポスター発表が行われました。**シンポジウム 1** は、2012 年と 2013 年の本学会奨励賞受賞者に企画していただきました。専門分野の異なる岡部弘基博士(東京大学)と桧垣匠博士(東京大学)が、若手の新鮮な感覚で、動植物の細胞分裂イメージング最前線に関する学際的シンポジウムを企画されました。お二人には、シンポジウムに触発された論文「生命科学分野の細分化と再編成: バイオイメージングのこれから」を本号に御寄稿いただきました。将来の本学会の担い手と期待される若手の奨励賞受賞者に大胆な企画を御提案いただくことは、今後の本学会の一つの方向性となるかも知れません。

シンポジウム 2 は、曽我公平教授(東京理科大学)らが「第 2 の生体の窓～21 世紀のバイオイメージングの窓～」を企画されました。多様な分野の研究者がパネルディスカッション

ョンを含めて討論し、盛り上がりました。その内容は、本号に掲載した特集記事に詳しく紹介されています。

上田泰己教授(東京大学・理研)による「全身・全脳透明化の先に見えるもの－生命の「時間」の理解に向けて－」と題した**特別講演**は多くの会員に感銘を与え、懇親会の席でも上田教授を囲んだ議論が盛り上がりました。

今回初めて、**トピカルセッション**と題して、一部のポスター発表者の方に、研究の背景や重要性を異分野の研究者にわかりやすいように一人 10 分間でお話しいただきました。本学会は、通常はそれぞれ異なる分野で活動している会員が年に 1 回集まり、バイオイメージングをキーワードとして学際的な討論を展開することに大きな特徴があると思います。ポスター討論の前に通常のポスターサマリー講演より詳しく背景等をお話しいただいたことは、学際的な議論を深めやすかったとの御意見をいただきました。

シンポジウム 3 として、鈴木和男教授(帝京大学)、加藤有介博士(徳島大学)が「感染症を見る」を企画されました。その内容を総括する記事を本号に掲載しました。

最後に 2015 年度日本バイオイメージング学会奨励賞を受賞された新藤豊博士(慶應義塾大学)による受賞講演が行われました。本号に総説を御寄稿いただきました。

2016 年の第 25 回日本バイオイメージング学会学術集会は、名古屋市立大学において加藤晃一大会長のもとで開催されます。皆さんの御参加をお待ちしています。

生命科学分野の細分化と再編成: バイオイメージングのこれから

～第 24 回学術集会シンポジウム「NO DIVISION, NO LIFE.～動物と植物の細胞分裂イメージング最前線～」を終えて～

桧垣 匠[1*]、岡部 弘基[2]

[1] 東京大学・大学院新領域創成科学研究科、[2] 東京大学・大学院薬学系研究科

* E-mail: higaki@k.u-tokyo.ac.jp

分子生物学の目覚ましい発展によって実現した生命科学分野の拡充は、同時に分野の細分化をもたらしました。これにより、各専門分野に所属する個々の研究者には生命科学の全体像が見えづらくなり、個別の専門研究を進めても最終的な目標である生命の謎の解明といった大問題には全くアプローチできない、という危機意識が生まれています。この問題意識を主な背景として、近年では生命を統一的あるいは俯瞰的に捉える研究アプローチが勃興し、一定の成功を収めつつあります。この状況において、数理モデルの活用や物理因子の探索といった新規バイオイメージング研究は生命の基本原理を解明するための強力な基盤技術開発を通して、断片化した知識の再編成の足場として活躍できるかも知れません。

生命科学分野の細分化

分子生物学の急速な発展と普及もあり、今日の生命科学は数ある科学技術の中でも存在感のある大きな研究分野となっています。その一方で、細分化が過度に進められているという指摘もあります。生命の謎を解くという極めて大きく難しい人類的課題の解決を実現させるにあたって、研究領域を細分化して取り組むことは正攻法であり、これはごく自然な当然の流れと思われます。むしろ、細かな各々の研究領域がそれぞれにきちんと仕事を進められるほど生命科学分野にコストを費やせている現状はむしろ歓迎すべきかも知れません。

しかしやはりその一方で、細分化された領域に身を置く個々の研究者の立場に立てば、生命科学の全体像を見る術もなく、究極の目標であったはずの生命の謎の解明にはいつまでたっても近づいている実感が持てない、といった危機感や絶望感を持つこともまた当然かもしれません。大きく気長な視点に立てば、研究者が個々の分担をきちんと進めることはもちろん大切です。しかし、大きな問題を全く考えずに狭い研究領域に閉じ籠って自分のお気に入りの小問を解くばかりでは、研究者として真摯な姿勢を示しているとは思えません。何より、研究者が寸暇を惜しんでまで求め続ける新しいものを見つけたときの驚きや興奮をマンネリ化した環境だけで得続けることができるでしょうか。細かな領域に身を置くことは意味のあることですが、領域を超えた交流は研究者の渇望を満たしながらも、大きな視点からみた分野の発展にも資すると考えられます。

異なる言語を話す私たち

植物科学を専門とする筆者が分野の細分化を肌で実感したエピソードを紹介します。動物発生の関係の学会に参加したときのことです。口頭発表のスライドの中に PCP という単語が書かれていました。何かの略語であることは当然分かりましたが、一体何のことかわかりません。初出のはずが、どこにも略さずには書いていません。発表者が話す英語を聞いても PCP、PCP...を繰り返すばかりです。つまり、その「業界」では DNA と同等のレベルで当然知っているべき略語なのだろうとわかりました。面白いことに、植物科学の研究者は必ず PCP という言葉に反応します。国内の植物科学関係の学会として最大規模を誇る日本植物生理学会が刊行する学術誌 Plant and Cell Physiology の略称が PCP なのです。ちなみに、PCP は国内で出版されている学術誌としては最高のインパクトファクターである 4.931（2014 年）を誇り、こちらの「業界」ではかなり名の知れた雑誌です。とは言え、この動物発生の発表に出ている PCP は Plant and Cell Physiology の略ではないことは明らかです。後に分かりましたが、こちらの PCP は Planar Cell Polarity（平面内細胞極性）の略でした。分かってしまえば何てことはありません。やはり、基本的な業界用語のようです。もちろん、筆者の勉強不足は否めません。しかし、敢えてその勉強不足を棚に置いて言えば、私たちはずいぶん違う言葉を使って研究しているんだな、と実感する機会になりました。生命科学分野におけるバベルの塔は，とっくの昔に壊れてしまったままのようです。

バイオイメージングのこれから

近年、生命を統一的・俯瞰的に捉える学際的な研究アプローチが注目されています。これらの研究手法はそれぞれに複雑に関連しているため、ここで美しく構造化して紹介することは困難ですが、キーワードとしては、オミクス・合成生物学・システム生物学・数理モデル・定量生物学、などが挙げられると思います。これらの領域が新たに発生した背景には、解析機器や計算機の性能向上などの技術的側面が相当にあると思いますが、細分化された生命科学に対するアンチテーゼに強い動機を感じます。実際、これらの研究分野は一過性の流行に終わらずに、既存の領域を再編成しながら生命科学の発展に寄与しています。例えば筆者らは最近、数理モデル研究者との共同研究によって、頭蓋骨の縫合線と植物細胞の形づくりが理論のレベルでは共通性があることを見出すことができました[1]。数理モデルという研究手法が、動物と植物に分かれた研究分野を繋いで両者に進捗をもたらしたという好例だろうと思います。

このような昨今の状況を踏まえて、これからの生命科学分野に対する日本バイオイメージング学会の貢献は今後ますます大きくなっていくと考えます。まず、日本バイオイメージング学会は様々な研究領域に身を置く研究者が所属する、高い学際性に強みを持つ学会です。この体制が形成され現在も維持されている理由は定かではありませんが、バイオイメージング技術の汎用性の高さや、異分野の研究者を排除しない、いい意味でリラックスした学会の雰囲気に秘密がありそうです。異分野の研究交流に長けた私たちの優位性は疑いの余地がありません。しかし、その学際性だけでなく、バイオイメージング技術という専門性の存在感が今後さらに増していくだろうと考えています。それは、最新のバイオイメージング技術は上述した新しい研究領域と同様に、生命現象の原理に関する研究の基盤技術になるポテンシャルを持つためです。

生命科学分野において細分化が進んだ背景のひとつに、分子生物学の発展によって、似たような生命現象であっても進化的に離れた生物間ではそれを支配する遺伝子群に大きな相違がある、と判明したことがあります。そのため、生物の研究者は分子機構の研究に入った段階で、対象生物の進化的な距離に応じて離れた位置で研究をすることを余儀なくされるという事情がありました。つまり、分子生物学が牽引してきた生命科学は、遺伝子などの生物学的要因に支配された編成によって成り立っていたと捉えられます。しかし、最近の構成的アプローチによる生物学研究では、生命現象に共通する基本原理の解明が求められています。このような研究では生物学的要因に加えて物理学的要因の探究も必要です。具体的には、生体における力・温度・物性・反応などが想定されます。このような物理因子を高分解能で測定できる技術はバイオイメージングに他なりません。また、光操作に代表される生体材料への摂動を加える技術開発もイメージング分野の範疇と考えられます。こういった新しいイメージング技術の開発と普及は、一度は細分化された生命科学領域を再編成する基軸となり、生命科学の大きな問題に真正面から取り組む技術基盤になることが期待されます。

以上の考えに基づいて、筆者は 2015 年 9 月に東京理科大学葛飾キャンパスにて催された第 24 回日本バイオイメージング学会学術集会において「NO DIVISION, NO LIFE. ～動物と植物の細胞分裂イメージング最前線～」と題したシンポジウムをオーガナイズしました。細胞分裂という普遍的な生命現象をテーマに、動物分野からは名古屋大学の清光智美博士と早稲田大学の板橋岳志博士、植物分野からは基礎生物学研究所の村田隆博士と弘前大学の笹部美知子博士をお招きして、最新のイメージング研究の成果を紹介して頂くとともに、動植物研究の溝を埋めて新しい知見を拓くためのバイオイメージング技術についてのパネルディスカッションを行いました。もちろん、それぞれの生物材料による制限はあるものの、新しいイメージング技術の発展が領域横断的な新展開をもたらす可能性を再認識する機会となりました。日本バイオイメージング学会では、バイオイメージング技術を共通言語として材料を異にする研究者同士が生命現象の原理の解明に向けて忌憚なく議論できるようにすべく、今後も足場を固めていく活動を地道に続けていく必要があると考えています。

引用文献

1. Higaki T, Kutsuna N, Akita K, Takigawa-Imamura H, Yoshimura K, Miura T (2016) A theoretical model of jigsaw-puzzle pattern formation by plant leaf epidermal cells. PLOS Comput Biol 12: e1004833.

(2016 年 4 月 29 日受付; 2016 年 5 月 13 日受理)

特集「第 2 の生体の窓～21 世紀のバイオイメージングの窓～」

SBW イメージングの現状と課題

曽我 公平 [1,2]*

[1] 東京理科大学 基礎工学部 材料工学科

[2] 東京理科大学 研究推進機構 総合研究院 イメージングフロンティアセンター

* E-mail: mail@ksoga.com

要旨

1000 nm を超える近赤外波長域は「第 2 の生体の窓 Second Biological Window (SBW)」として近年世界的に話題を呼んでいる。これにはこの波長域におけるカメラなどの光学デバイスや蛍光材料などのアイテムを包括するシステムの発達が密接に関係する。本稿では、世界に先行して日本で発達しつつある SBW を含む 1000 nm を超える近赤外波長域におけるイメージングにフォーカスし、日本がこの波長域において世界をリードする地位を獲得することをめざし、SBW におけるバイオイメージングの現状と課題について議論する。

はじめに

可視光域近傍での生体における光損失は主に光散乱と種々の吸収により支配されるが、色素による吸収を除くと、主な支配要因は短波長ほど強い光散乱と、長波長ほど強い赤外吸収の裾である。光散乱が紫外・可視よりも弱いことから、近年では 800～1000 nm の first biological window が良く用いられるようになってきた。しかし、さらに光散乱が弱く、かつ赤外吸収の影響を大きく受けない波長がさらに長波長に存在することは 1980 年代からすでに知られていた[1,2]。ところが一般に用いられる半導体 Si を用いた撮像デバイスではその光学バンドギャップが 1100 nm 付近に存在することからもわかるように、1000 nm を超える近赤外(OTN-NIR: over-1000-nm near infrared)波長域での撮像はほとんど不可能である。一方 21 世紀に入り、光通信用デバイスの発達にけん引されて、InGaAs CCD カメラが市場に出回るようになり、このカメラを用いると OTN-NIR 波長域の撮像が可能である。したがって、上述の first biological window (NIR I: 800-1000 nm) に続き、second biological window (NIR II: 1000-1500 nm), third biological window (NIR III: 1500-1800 nm)などの異名を提案されつつ、さらに光損失の少ない OTN-NIR 波長域でのイメージングがにわかに注目を浴びている[3,4]。この波長域では従来数 mm と考えられていた蛍光イメージングの観察深度が数 cm におよぶことが証明され、さらにはこの波長域に特化した小動物イメージング装置が国内で市販化されるに至っている[5]。

OTN−NIR における蛍光体

indocyanine green (ICG)は 1959 年に米国 FDA に認可されて以来有名な NIR I における蛍光体であり、また種々の量子ドットも NIR I においては活用されている。一方、現在知られている OTN-NIR 波長域における蛍光プローブ用蛍光物質は、量子ドット、カーボンナノチューブ、希土類含有セラミックスナノ粒子(RED-CNP)と一部の色素である。特に RED-CNP については、新たなナノ温度イメージングや single photon emission computed tomography (SPECT)、magnetic resonance imaging (MRI)などとのマルチモーダルイメージングも提案されている。

量子ドットは可視近傍の蛍光で知られる CdS や CdSe に対し、さらにバンドギャップの狭い半導体組成を選択することにより、OTN-NIR 波長域においてイメージングが可能な PbS 系量子ドット[6,7]についてすでに報告がなされている。さらに最近になって Kameyama らは、$AgInTe_2$ ナノ結晶が OTN-NIR における良好な蛍光体となることを報告している[8]。

一方、カーボンナノチューブもバンド構造のコントロールにより高効率で OTN-NIR 波長域での蛍光を示すことが知られている [9,10] 。これについては、本誌本号におけ

る岡崎氏の総説に詳細を譲る。

RED-CNP は筆者らがこの 10 年間研究とプローブ開発を行ってきた蛍光体であり、近年では OTN-NIR ナノ温度イメージングへの応用が始まっている蛍光体である[11-20]。

OTN-NIR におけるイメージングシステム

筆者らが 2005 年に OTN-NIR 波長域における蛍光バイオイメージングにチャレンジし始めた当時、この波長域をカバーする蛍光バイオイメージング装置は市販されていなかった。顕微鏡システムについてはオリンパスに委託して OTN-NIR 蛍光顕微鏡を作製し、世界に先駆けてライブイメージングを行った[21]。一方、小動物のイメージングシステムは島津製作所と共同で開発を進め、2014 年暮れにイメージングシステムを市販するに至った[5]。

また蛍光剤の投与を行わずに高度な情報が得られるハイパースペクトルイメージングは近年特に注目を集めており、筆者が知る限りでも国内で 3 社が OTN-NIR 波長域をカバーするハイパースペクトルイメージング装置を販売している。

さらに、この波長域ではこれまでにない深い観察深度が可能になるため、computed tomography (CT)や共焦点原理に基づく小動物の三次元撮像技術の開発が待たれる。

数 cm の観察深度は、医療においては特に内視鏡診断において威力を発揮すると想定され、筆者らはこれを見据えた OTN-NIR 内視鏡の開発についても報告を行っている[22]。

むすび

SBW を含む OTN-NIR 波長域におけるイメージングは、これまで数 mm に限られてきた観察深度を数 cm まで拡大可能な革新的な技術であり、プローブからシステムに至るまで世界に先駆けて日本が先行して研究開発を進めており、我が国が世界をリードするイメージング技術として活性化することが強く望まれる。

参考文献

1. 飯沼武 他編「医用物理学」(医歯薬出版、1998) p. 162.
2. R. R. Anderson, J. A. Parrish: *J. Invest. Dermatol.*, **77**, (1981) 13.
3. A. M. Smith et al., *Nat. Nanotech.*, **4** (2009) 710.
4. L. Shi et al., *J. Biophotonics*. **9** (2016) 38-43.
5. D. Jaque et al., *Adv. Optics and Photonics*, **8** (2016) 1.
6. H. Zhao et al., *J. Mater. Chem.*, **21** (2011) 8898.
7. F. Ren et al., *Nanoscale*, **5** (2013) 7800.
8. T. Kameyama et al., *Nanoscale*, **8**,(2016)5435.
9. J. H. Kim et al., *Nature Chem.*, **1** (2009) 473.
10. Y. Iizumi et al., *ACS Appl Mater Interfaces*, **5** (2013) 7665.
11. M. Kamimura et al., *J. Photopolym. Sci. and Tech.*, **28** (2015) 711.
12. T. Zako et al., *Biomater. Sci*., **3** (2015) 59.
13. E. Hemmer et al., *MRS Bull.*, **39** (2014) 960.
14. N. Venkatachalam et al., *J. Am. Ceram. Soc.*, **96** (2013) 2759.
15. E. Hemmer et al., *Nanoscale*, **5** (2013) 11339.
16. 曽我公平, *薬学雑誌*, **133** (2013) 355.
17. E. Hemmer et al., *Acta Biomaterialia*, **9** (2013) 4734.
18. E. Hemmer et al., *J. Mater. Sci. Mater. in Med.*, **23** (2012) 2399.
19. M. Kamimura, *Nanoscale*, **3** (2011) 3705.
20. K. Soga et al. *Proc. SPIE*, **7598** (2010) 759807.
21. 曽我公平, *分析化学*, **58** (2009) 461.
22. T. Zako et al., *J. Nanomater.*, **2010** (2010) 1-8.

(2016 年 5 月 12 日受付; 2016 年 5 月 13 日受理)

特集「第 2 の生体の窓～21 世紀のバイオイメージングの窓～」

NIR-II 波長域を用いたマウス *in vivo* 蛍光イメージングの可能性

竹内 司[1]*、大谷 敬亨[2]、上村 真生[3]
[1]島津製作所・分析計測事業部、[2]片山化学工業株式会社・開発課
[3]東京理科大学・基礎工学部・イメージングフロンティアセンター
* E-mail: tkuc17@shimadzu.co.jp

要旨

生体イメージングにおける観察深度を決定する光損失は、短波長ほど強い光散乱と、可視域を中心とする色素による吸収、さらに近赤外域においては長波長ほど強くなる分子内振動に伴う赤外吸収によって主に決定づけられる。現在、蛍光イメージングにおける画像の取得波長はおおよそ 900 nm 以下に限られている。この理由として、検出に用いる CCD カメラの感度に依存するもの、および 900 nm 以上に蛍光特性をもったイメージングプローブがあまり存在しないことが大きな要因である。しかし、更に長波長である 1000 nm を超える近赤外蛍光を用いた画像の取得が可能になれば、現在の波長域に比べてより深部の観察が可能になるばかりでなく、散乱の低減により、これまでよりもはるかに鮮明な画像の取得が可能になると期待される。本稿では我々が 1000 nm 以上の波長領域に蛍光特性を持つ希土類含有セラミックナノ粒子(RED-CNP)を蛍光コアとして創製したイメージングプローブを用いて取得した画像およびイメージング解析を行ったのでこれを紹介する。

はじめに

生体内での分子の動きや状態を可視化するためのバイオイメージング技術は、診断・治療をはじめ生命現象の解明の為に不可欠な要素技術である。既に、NIR-I と区別されうる 900 nm 以下の近赤外蛍光色素を利用した蛍光イメージングは、PET、CT、MRI など他のイメージングと比べると安価で、利便性が良く、時間および空間分解能に長けている半面、画像の解像度が劣る。そのため、複数のイメージング手法を組み合わせること（マルチモーダルイメージング）により、情報の高度化、分析精度の向上が試みられている。

従来、蛍光イメージングにおける画像の取得波長はおおよそ 800 nm 以下に限られているが、生体における光損失は、短波長ほど強い光散乱と、可視域を中心とする色素による吸収、さらには近赤外域においては長波長ほど強くなる分子内振動に伴う赤外吸収によって主に決定づけられる。最大の障壁となる光散乱は可視光域および近傍で強く、より高解像、高深度のイメージングを達成するためには可視光を越える長波長の OTN-NIR（over-1000-nm near-infrared）蛍光を用いることが望ましい。また励起波長も 900～1200 nm の近赤外光を利用することにより、外部からの励起光がより高深度に到達できる。1200 nm を超える近赤外を蛍光画像の取得に活用すれば、現在の波長域に比べてより深部の観察が可能になるばかりでなく、散乱の低減により、図 1 に示すように、これまでよりもはるかに鮮明な画像の取得が可能になると期待されるため、従来の近赤外蛍光波長領域より長い NIR-II 蛍光イメージングが近年着目されてきている。

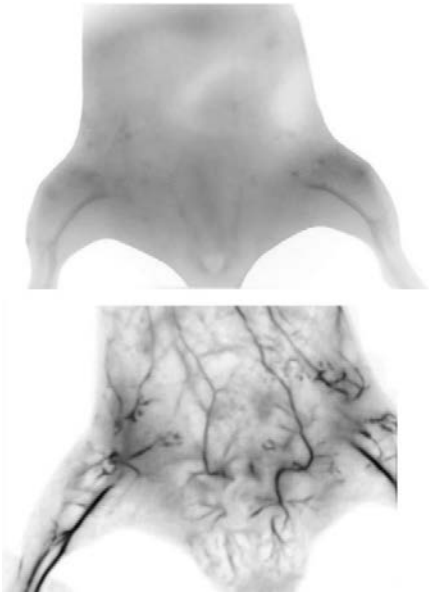


図 1. NIR-I(上図)と NIR-II(下図)のイメージング画像比較

NIR-Ⅱ 蛍光イメージング領域における蛍光プローブ

近年、この NIR-II の波長域で蛍光を示すプローブとして、様々なナノ蛍光体が報告されている。蛍光イメージングの世界で既に一般的に用いられている蛍光プローブである量子ドット(QD)は、半導体のナノ粒子であり、量子サイズ効果によって蛍光波長を粒径で制御できるという特徴を有している。NIR-II 波長域で蛍光を示す代表的な QD として、Ag_2S や PbS などが報告されており、コアシェル構造の形成による発光特性の制御なども可能なことから、その材料研究が盛んに行われている[1-5]。一般的に QD は、生体に対する毒性が懸念されているが、生体機能性高分子と QD を複合化することで、細胞毒性を大幅に低減することができる。そのため、高い量子効率を有し、強い NIR-II 蛍光を発する QD は、NIR-II 波長域における蛍光プローブとして有用であると期待されている。

バイオ分野以外にも様々な応用が期待されているカーボンナノチューブ(CNT)も、NIR-II 蛍光を示すナノ材料として知られている[6-9]。しかしながら、21 世紀初頭にその毒性問題が懸念され、バイオ分野ではやや敬遠される材料であった。さらにその疎水性の性質やサイズの小ささからも、生体内で利用することが困難とされてきた。ところが近年、CNT を生体機能性高分子と複合化することで、これらの問題を回避することができ、実際に *in vivo* における NIR-II 蛍光イメージングに利用する研究が報告されている。

また NIR-II 領域の蛍光を示すレーザー色素である IR-1061 等を蛍光プローブに用いることも提案されている[10]。低分子有機化合物であるレーザー色素は、分子サイズが小さいため、最終的に体外へ腎排出されることが可能であり、*in vivo* イメージングのプローブとして極めて有用であると考えられている。しかしながら、これらのレーザー色素も CNT と同様に疎水性の材料であるため、そのままでは水中に分散することができず、蛍光プローブとして使用することは困難である。また一般的に、*in vivo* において長時間の血中滞留性を確保するためには、プローブを適切なサイズ(10 - 200 nm)にすることが求められるため、ナノ粒子化することでこれらの問題を解決することが、レーザー色素を NIR-II 蛍光イメージング用プローブに応用するために求められている。

このように NIR-II 蛍光イメージングのプローブとしては、単純に NIR-II 蛍光を示すだけでなく、安定に血中滞留が可能なナノ粒子のサイズであることと、生体に対して毒性が低いという性質が求められる。これらの条件を満たす有力な材料として、希土類含有セラミックスナノ粒子(RED-CNP)がある[11-14]。希土類イオンを含有したセラミックスナノ粒子である RED-CNP は、近赤外光を励起光として高効率に近赤外蛍光を得ることができる。さらにドープする希土類イオンの種類とドープ量によって、様々な波長の NIR-II 蛍光を得ることができる。一方で、ホスト材料となるセラミックスナノ粒子には、主にフォノンエネルギーを考慮した組成の選定が必要であり、Y_2O_3, Gd_2O_3, LaF_3, $NaYF_4$, $NaGdF_4$ 等の希土類フッ化物や希土類酸化物を用いる。RED-CNP はこれまでに様々なナノ粒子合成法が確立されており、使用目的に応じたサイズのナノ粒子を、10～500 nm 程度の範囲で精密に粒径を制御して合成することが可能である。さらに、これらの RED-CNP を生体機能性高分子と複合化させることで、生体内環境で優れた分散安定性を有し、強い NIR-II 蛍光を発する蛍光プローブの開発が報告されている。また一般的に、重金属から構成される QD と比較して、セラミックスナノ粒子である RED-CNP は生体への毒性が極めて低いという特徴も有しており、*in vivo* における NIR-II 蛍光イメージングプローブとして極めて有力な材料であると考えられている。

RED-CNP の調製方法

本研究では、図 2 に概要を示した Yanchun Wei らならびに Soga らの方法を用いて、水熱合成により調製したポリエチレンイミン（PEI）被覆 $NaYF_4$ (PEI-$NaYF_4$) 粒子に、poly(ethylene glycol) (PEG) の側鎖に poly(acrylic acid) (PAAc)のブロック構造を有するポリマー(PEG-*b*-PAAc)を静電的に被覆することで、水溶液中で非常に高い分散性を有する RED-CNP の調製に成功した[15-17]。

まず、PEI-$NaYF_4$ 粒子(Er:2 mol%,Yb:18 mol%)を水熱合成により調製した。ポリビーカーにエチレングリコール、10% PEI 水溶液、0.2M NaCl 水溶液を混合し、攪拌した。混合液に希土類硝酸水溶液（1.3 M $Y(NO_3)_3$、0.29 M $Er(NO_3)_3$, 0.29 M $Yb(NO_3)_3$)を加え、1 時間攪拌した後、0.8 M NH_4F 水溶液を加え、撹拌を行った。混合液を水熱合成容器のテフロンインライナーに移し、水熱合成 (180ºC,

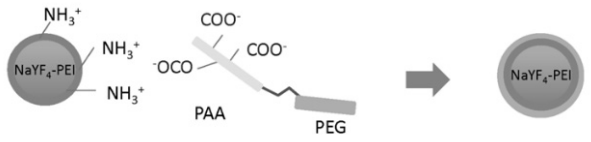


図 2. RED-CNP プローブの概要図

表 1. RED-CNP プローブの平均粒子径および表面電位

Sample Name	平均粒子径	Zeta Potential
	d.nm	mV
NaYF4-PEI	74.07	50.6
NaYF4-PEI-PEG	70.47	-20.5

6 時間)を行った。反応終了後、反応液を遠沈管に回収し、エタノールを用いて高速遠心機により洗浄(20,000×g)を繰り返した。洗浄終了後、調製した PEI-$NaYF_4$ 粒子は、超純水で回収し動的光散乱法による粒度分布測定および粒子表面のゼータ電位を測定した。この結果、調製した粒子は、平均粒子径が 74 nm、ゼータ電位が+50.6 mV であり、正電荷を帯びる粒子特性を示した。表 1 にこれらの結果をまとめる。

次に、調製したカチオン性粒子である PEI-$NaYF_4$ 粒子に PEG-*b*-PAAc を更に被覆した。調製した PEI-$NaYF_4$ 溶液をフラスコに移し、50ºC のウォーターバスで加温しながら 10 分間程度撹拌した。この溶液に PEG-*b*-PAAc 溶液(10 mg/mL)を撹拌しながら添加し、50ºC のウォーターバスで一晩撹拌した。撹拌終了後、溶液を遠沈管に回収し、超純水を用いて高速遠心機により洗浄（20,000×g）を繰り返した。調製した粒子(PEI-$NaYF_4$ –PEG 粒子)は、洗浄終了後、上清を除き、HEPES 緩衝液に分散させた。調製した PEI-$NaYF_4$ -PEG 粒子について、動的光散乱法による粒度分布の測定と粒子表面のゼータ電位を測定した。この結果、調製した粒子は、平均粒子径が 70 nm であり、ゼータ電位が -20.5mV と負電荷を帯びる粒子特性を示した。さらに、ICP 発光分光分析法により元素分析を行い、各希土類元素濃度を測定し、目的通りの粒子構成になっていることを確認した。また、図 3 に示すように、走査型電子顕微鏡を用いて直径約 30 nm の均一なセラミック粒子が形成されていることを確認した。

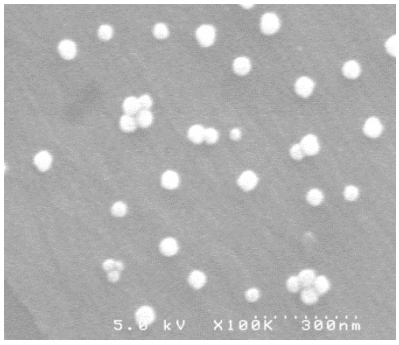


図 3. RED-CNP プローブの走査型電子顕微鏡画像

調製した RED−CNP の水溶液中における安定性

調製した RED-CNP の生理的環境下における安定性について生理食塩水を用いて分散液の吸光度変化および粒度分布により評価した。まず、生理食塩水（pH7.4）に PEI-$NaYF_4$ 粒子もしくは PEI-$NaYF_4$-PEG 粒子を添加し、粒子の分散安定性を分散液の吸光度変化を調べた。その結果、表面に PEG を被覆した PEI-$NaYF_4$-PEG 粒子の分散液では、大きな吸光度の変化が見られなかったが、PEI-$NaYF_4$ 粒子の分散液では、添加直後より吸光度が変化し、凝集体の形成が示唆された。次に、同サンプルについて、動的光散乱法により粒度分布を調べた。その結果、吸光度変化と同様に、PEI-$NaYF_4$-PEG 粒子の分散液では、添加 72 時間後においても、大きな粒度分布の変化は見られなかった。一方、PEI-$NaYF_4$ 粒子の分散液では、添加 10 分後に粒度分布に変化が見られ、添加 20 分後には大きく変化し、凝集体と考えられる粒度分布を示した。これらの結果より、カチオン性の PEI-$NaYF_4$ 粒子に、静電的に PEG-*b*-PAAc を被覆することで生理的水溶液において、非常に高い分散安定性を示すことを確認した。

NIR−II 蛍光イメージングシステムの概要

装置光学系は大きく分けて、照明系 (近赤外励起光および可視光)、結像光学系 (近赤外蛍光および可視光)、検出系 (近赤外蛍光および可視光)の 3 項目により構成される。励起光照明には半導体レーザー光を用いており、当該波長において効率良く高い照射密度が得られている。照明光の出射部は複数あり、それぞれにビーム成形素子を伴った拡散光学系が設けられているため、均一かつ多方向からの安定した照明が実現される。また結像～検出光学系においては、試料からの光を途中で近赤外蛍光像成分と可視光像成分に分離し、それぞれを別系統の検出器で撮影している。

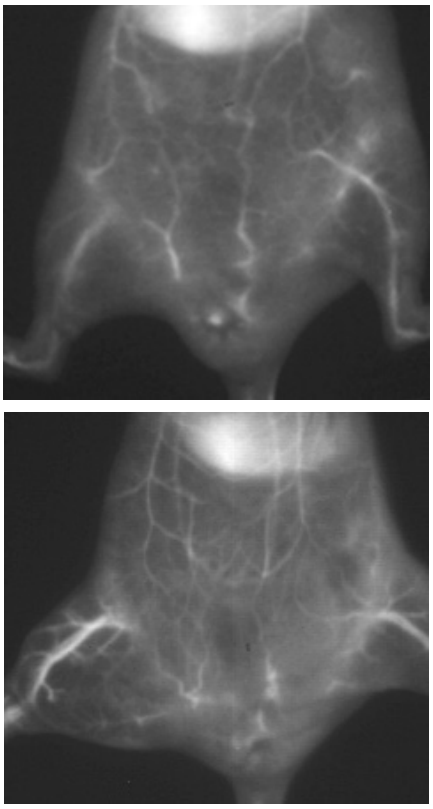


図 4. 腫瘍移植モデルマウスを用いた血管造影。（上図）移植 10 日後の様子、（下図）移植 20 日後の様子

得られたそれぞれの画像データは制御 PC 上で必要に応じて重ねあわせ表示が施される。試料体内からの近赤外蛍光は一般に微弱であり、これを感度よく撮影するために、冷却機構を備えた InGaAs(インジウムガリウムヒ素)カメラが用いられている。

RED-CNP プローブを用いた血管造影イメージング

下肢大腿部にマウス腹水癌細胞を移植した担がんマウスに、尾静脈より PEI-$NaYF_4$-PEG 粒子を投与し、観察を行った。図 4 に示すように従来用いられている波長領域（900 nm 以下）においては可視化することが難しい高精細な血管造影画像の取得に成功した。

腫瘍細胞移植 10 日後、および 20 日後の担がんマウスに PEI-$NaYF_4$-PEG 粒子を尾静脈投与したところ、腫瘍近傍の新生血管と思われる血管が造影され、腫瘍の成長と共に、付近の血管の成長が確認された。しかし、投与後 4 日目で、RED-CNP プローブを投与したマウスの死亡が確認されたため、正常マウスを用いて、急性毒性試験を行った。この結果、解剖所見、病理所見および血液生化学検査において、顕著な肝機能障害が確認され、死亡原因は、劇症肝炎によるものであることが示唆された。この現象はセラミック粒子表面に被覆されているカチオン性ポリマーである PEI が細胞毒性を示すため、この影響である可能性が高いと考えられる。本検討において調製を行った粒子は、PEG の側鎖の PAAc とセラミック粒子表面に被覆している PEI との静電的相互作用によって修飾を行っている為、血中投与後、PEG-*b*-PAAc が粒子表面から剥離し、PEI の露出が経時的に増えたため、その経時的な肝臓への蓄積により、結果的に死亡したと考えられる。

従って、今後は、静電的相互作用による修飾ではなく、化学結合により、より安定的に表面を修飾することで、体内において PEI の露出を回避させ、毒性を低減したプローブの作製を検討している。

まとめと展望

RED-CNP プローブを用いた *in vivo* 蛍光イメージングにおいて、従来用いられている可視および NIR-I 波長域における蛍光イメージング画像と比較して極めて高精細な画像を取得することが可能となった。しかしながら蛍光プローブの送達や生体への影響など、まだ改善が必要な課題は多く存在する。今後は、これら問題の解決および既存に用いられている手法を NIR-II 波長域で実現し、創薬およびライフサイエンス研究の発展に寄与できる技術として確立していくことを目指して研究開発を続けていく。

引用文献

1. Takashi Jin, Yukio Imamura, Applications of Highly Bright PbS Quantum Dots to Non-Invasive Near-Infrared Fluorescence Imaging in the Second Optical Window, ECS Journal of Solid State Science and Technology, 2016, 5(1) R3138-R3145.
2. Guosong Hong, Joshua T. Robinson, Yejun Zhang, Shuo Diao, Alexander L. Antaris, Qiangbin Wang, Hongjie Dai, In Vivo Fluorescence Imaging with Ag2S Quantum Dots in the Second Near-Infrared Region, Angew. Chem. Int. Ed. 2012, 51, 9818–9821.
3. Guangcun Chen, Fei Tian, Yan Zhang, Yejun Zhang, Chunyan Li, Qiangbin Wang, Tracking of Transplanted Human Mesenchymal Stem Cells in Living Mice using

Near-Infrared Ag2S Quantum Dots, Adv. Funct. Mater. 2014, 24, 2481–2488,

4. Yuko Nakane, Yoshikazu Tsukasaki, Takao Sakata, Hidehiro Yasuda, Takashi Jin, Aqueous synthesis of glutathione-coated PbS quantum dots with tunable emission for non-invasive fluorescence imaging in the second near-infrared biological window (1000–1400 nm), Chem. Commun., 2013, 49, 7584—7586.
5. Akira Sasaki, Yoshikazu Tsukasaki, Akihito Komatsuzaki, Takao Sakata, Hidehiro Yasuda, Takashi Jin, Recombinant protein (EGFP-Protein G)-coated PbS quantum dots for in vitro and in vivo dual fluorescence (visible and second-NIR) imaging of breast tumors, Nanoscale, 2015, 7, 5115–5119.
6. Guosong Hong, Shuo Diao, Alexander L. Antaris, Hongjie Dai, Carbon Nanomaterials for Biological Imaging and Nanomedicinal Therapy, Chem. Rev., 2015, 115, 10816–10906.
7. Yoko Iizumi, Toshiya Okazaki, Yuzuru Ikehara, Mutsuo Ogura, Shinsuke Fukata, Masako Yudasaka, Immunoassay with Single-Walled Carbon Nanotubes as Near-Infrared Fluorescent Labels, ACS Appl. Mater. Interfaces 2013, 5, 7665−7670.
8. Kevin Welsher, Sarah P. Sherlock, Hongjie Dai, Deep-tissue anatomical imaging of mice using carbon nanotube fluorophores in the second near-infrared window Proc. Natl. Acad. Sci. USA., 2011, 108, 8943–8948.
9. Guosong Hong, Jerry C. Lee, Joshua T. Robinson, Uwe Raaz, Liming Xie, Ngan F. Huang, John P. Cooke, Hongjie Dai, Multifunctional in vivo vascular imaging using near-infrared II fluorescence, Nature Medicine, 2012, 18, 1841–1846.
10. Zhimin Tao, Guosong Hong, Chihiro Shinji, Changxin Chen, Shuo Diao, Alexander L. Antaris, Bo Zhang, Yingping Zou, Hongjie Dai, Biological Imaging Using Nanoparticles of Small Organic Molecules with Fluorescence Emission at Wavelengths Longer than 1000 nm, Angew. Chem. 2013, 125, 13240 –13244
11. Eva Hemmer, Nallusamy Venkatachalam, Hiroshi Hyodo, Akito Hattori, Yoshie Ebina, Hidehiro Kishimoto, Kohei Soga, Upconverting and NIR emitting rare earth based nanostructures for NIR-bioimaging, Nanoscale, 2013, 5, 11339-11361.
12. Masao Kamimura, Naoki Kanayama, Kimikazu Tokuzen, Kohei Soga, Yukio Nagasaki, Near-infrared (1550 nm) in vivo bioimaging based on rare-earth doped ceramic nanophosphors modified with PEG-b-poly(4-vinylbenzylphosphonate), Nanoscale, 2011, 3, 3705–3713.
13. Tamotsu Zako, Miya Yoshimoto, Hiroshi Hyodo, Hidehiro Kishimoto, Masaaki Ito, Kazuhiro Kaneko, Kohei Soga, Mizuo Maeda, Cancer-targeted near infrared imaging using rare earth ion-doped ceramic nanoparticles, Biomater. Sci., 2015, 3, 59–64.
14. Masao Kamimura, Satoru Suyari, Taiki Matsumoto, Kohei Soga, Surface modification on rare-earth doped ceramic nanophosphors via ligand exchange method, Journal of Photopolymer Science and Technology, 2015, 28, 711-713.
15. Nallusamy Venkatachalam, Tomoyoshi Yamano, Eva Hemmer, Hiroshi Hyodo, Hidehiro Kishimoto, Kohei Soga Er3+-Doped Y2O3 Nanophosphors for Near-Infrared Fluorescence Bioimaging Applications Journal of the American Ceramic Society Volume 96, Issue 9, 2759–2765, September 2013
16. Yanchun Wei, Qun Chen, Baoyan Wu, Aiguo Zhou and Da Xing High-sensitivity in vivo imaging for tumors using a spectral up-conversion nanoparticle NaYF4: Yb3+, Er3+ in cooperation with a microtubulin inhibitor Nanoscale, 2012, 4, 3901
17. Biomedical imaging with near infrared excitation: fundamental and applications Kohei Soga Biomaterial 2011.2, 95-103

(2016 年 3 月 17 日受付; 2016 年 5 月 12 日受理)

特集「第 2 の生体の窓～21 世紀のバイオイメージングの窓～」

希土類ナノ粒子 OTN 近赤外蛍光プローブによるマウス *in vivo* イメージングの応用

岸本 英博 [1]*、福田 啓介 [1]、竹下 寛之 [2]、曽我 公平 [3]

[1] 琉球大学大学院 医学研究科 寄生虫・免疫病因病態学講座、[2] 東京理科大学大学院 薬学研究科 薬科学専攻

[3] 東京理科大学 基礎工学部 材料工学科

* E-mail: hidek@med.u-ryukyu.ac.jp

要旨

生きたままの動物で、深部の蛍光イメージングを可能にする OTN（OTN: over 1000 nm）近赤外蛍光イメージングが近年注目を集めている。本稿では希土類含有ナノ粒子近赤外（RED-CNP）蛍光プローブを用いた OTN 近赤外におけるマウス *in vivo* イメージングの応用例を紹介するとともに、蛍光を示すイオンとして Ho^{3+}(1200nm 蛍光)と Er^{3+}(1550nm 蛍光)を用いることによる多色化イメージングについて報告する。

はじめに

ES 細胞や iPS 細胞の発生・再生研究に代表される生命科学分野の発展は著しいものがあるが、これらの研究を強力に支えてきたのはバイオイメージング技術の開発である。現在、生命科学分野の研究で求められている技術は、①生きたまま、②３次元または深部画像を、③経時的に可視化することである。本稿では、「第 2 の生体の窓」と呼ばれ、深い観察深度が得られる波長域として、近年にわかに注目を浴びている 1000 nm を超える波長域（OTN: over 1000 nm）において、希土類含有ナノ粒子近赤外（RED-CNP）蛍光プローブを用いたマウス *in vivo* イメージングの応用例を紹介する。

RED-CNP を用いた消化管ポリープの検出

励起光の長波長化として近年注目を集めているのが近赤外 (NIR) 蛍光バイオイメージング (NIR-FBI) である。これは分子振動に基づく赤外吸収の少ない「生体の窓」(Biological window) として知られている波長域である[1-3]。NIR-FBI では「生体の窓」に属する光を用いることで励起光に起因する従来の問題を軽減でき、さらに光散乱の影響を少なくできることから生体深部のイメージングが可能になると予想されている。特に「第2の生体の窓」と呼ばれている 1000 nm を超える波長域は、現在用いられているインドシアニングリーン（ICG）[4]や量子ドット[5]による 900 nm 程度の NIR 光よりもさらに光散乱の影響が少ないため、OTN-NIR-FBI では観察深度を現在の数 mm から数 cm とすることが可能になると期待されている。

当研究グループではすでに、1000 nm を超える波長域を利用し、希土類含有ナノ粒子近赤外蛍光プローブ（RED-CNP-NIR 蛍光プローブ）を餌に混ぜることにより、マウスの消化管を生きたまま観察することが可能であることを報告している[6]。OTN-NIR-FBI によりマウスの消化管は消化管の辺縁がスムーズにかつ明確にイメージングされていることが特徴である（図1A）。すなわちマウスを解剖することなく、生きた状態で消化管の異常をヒトの X 線バリウム検査のように検出することが可能になる。そこで我々は、家族性大腸腺腫症（家族性大腸ポリポーシス）のモデルマウスである APCmin マウスを用いてこのマウスの小腸に多発するポリープを可視化することを試みた[7]。RED-CNP-NIR 蛍光プローブを混合した餌を APCmin マウスに与えることにより、APCmin マウスの消化管の内壁にポリープが発生していれば、ポリープ部が黒く抜けた画像（ブラックスポット）として識別できると仮定した（図1B）。図1C に示すように OTN-NIR-FBI を利用することで APCmin マウスを解剖することなく、外部から小腸内に形成されたポリープを検出することに成功した。マウスを OTN-NIR-FBI にて観察後、安楽死させ解剖し、ポリープの位置を確認したところ OTN-NIR-FBI で認められたものと一致していた（図1C）。この実験では、用いたプローブにターゲットに対する特異性がなく、ターゲットに集積するブライトスポットとしての可視化には至っていない。しかし、画像はライブイメージとして得ることが可能である。マウスに RED-CNP-NIR 蛍光プローブ混合した餌を与え、消化管を可視化し、消化管の蠕動運動を制御する薬剤を

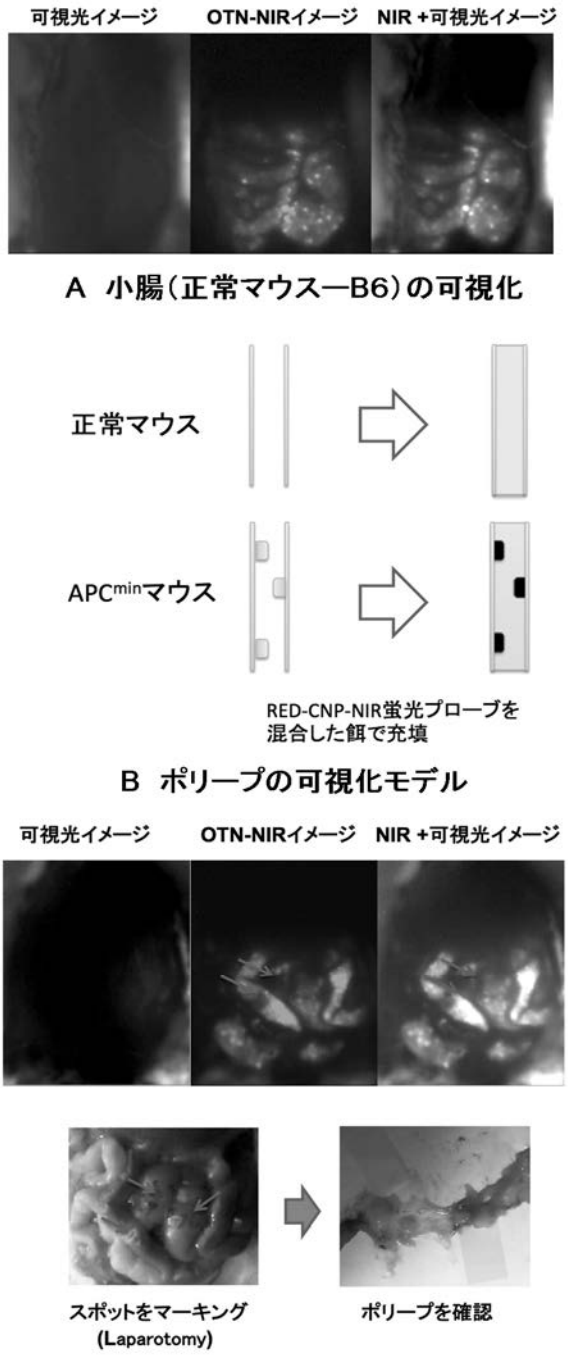


図１　OTN-NIR における小腸のイメージングとその応用

投与すれば、薬効を可視化することもできる等の有用な応用方法があり、すでにOTN-NIR-FBIシステムに対する期待は大きいと考える。

RED-CNP を用いた多色化

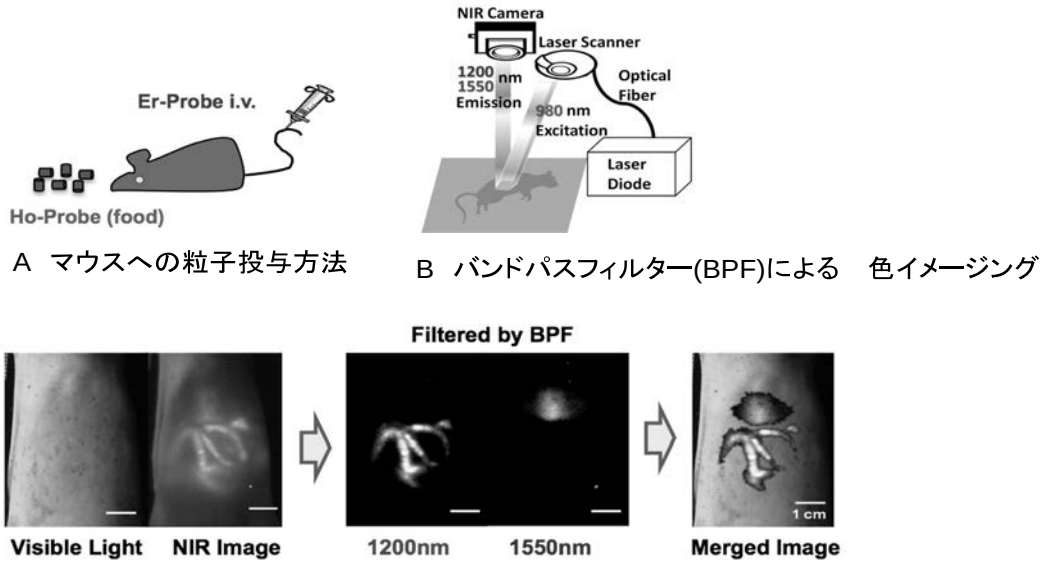
先述したように、当研究グループでは希土類含有セラミックスナノ粒子を用いた NIR-FBI に取り組んできたが、現在使用している蛍光体は Y_2O_3: Yb^{3+}, Er^{3+}をはじめとする 1550 nm 蛍光を示す粒子のみであり、イメージング画像は単色 (単一波長) 蛍光に限られている。多波長の画像に基づく多色イメージングは他のイメージング技術に対する FBI の大きなメリットとなるため、蛍光波長の異なる数種類の蛍光体を使用した NIR-FBI が望まれている。一方で、先行研究では LaOCl:Er^{3+}を中心にナノ粒子の作製が行われてきた[8] 。その中でも、Y_2O_3:Ho^{3+}, Yb^{3+}粒子は既往の蛍光体と同波長の 980 nm 励起光で 1200 nm 蛍光を示し、また 1200 nm 付近の波長域は生体の主な構成成分である水の吸収波長と重ならないため、この粒子を NIR-FBI に用いることで多色イメージングが可能となるばかりでなく、さらに深度の深い生体観察が期待できる。そこで、Y_2O_3: Yb^{3+}, Ho^{3+}粒子による 1200 nm 蛍光の生体透過性の評価及び既往の蛍光体との併用による OTN-NIR 波長域における二色化 FBI を試みた。

前述のようにマウスに対して 1200 nm の励起光を持つ Y_2O_3:Yb^{3+}, Ho^{3+}粒子 (Ho プローブ) を混合した飼料を経口投与した。5時間後、HEPES バッファー中に分散させた PEG 修飾 Y_2O_3:Yb^{3+}, Er^{3+}粒子 (Er プローブ) を尾静脈注射により血中投与した (図2A) 。各マーカーの蛍光は特定波長域の光のみを透過するバンドパスフィルター（BP フィルター）を用いて識別した(図2B)。

図2Cは、実際にこの実験から得られたマウスの消化官及び肝臓のイメージング像である。なお、各蛍光による観察像は撮影後に画像編集を行い、疑似カラーで着色している。通常の観察で、NIR 像で示すように、近赤外蛍光像はグレースケールで表現されるため、経口投与により消化器官に集積した Ho プローブの蛍光と血中投与にり肝臓に集積した Er プローブの蛍光を識別することはできない。しかしながら、特定波長域の光 (1200 nm あるいは 1550 nm 蛍光) のみを透過する BP フィルターを用いることで各マーカーの蛍光を識別し、図2C に示すように 1200 nm、1550 nm OTN-NIR 像のように対象とする臓器を区別し明確に可視化することが可能であることが示された。

まとめと将来展望

現在、著しい発展を認める生命科学研究分野で切望されている技術革新の一つは、小動物のライブイメージング（四次元解析）である。それも生体深部の可視化、毒性の少なさ、高感



A　マウスへの粒子投与方法　　B　バンドパスフィルター(BPF)による　色イメージング

C　マウスの消化官及び肝臓の同時イメージング

図 2.　Er プローブ（1550nm）と Ho(1200nm)プローブによるマウスの二色イメージング

度が求められている。良い研究結果を発表するためには、分子が生体の何処でどのくらいの時間発現しているか、細胞は何処に移動し、どのくらい存在するか、投与した薬は何処に集積し、半減期はどれくらいか等を計測することが必須となってきている。すでに医療の現場では、乳がんの転移先リンパ節候補を検査するための放射性同位元素によるセンチネルリンパ節検査が ICG 色素＋近赤外光を用いた検査に置き換わろうとしている。これは低毒性な（体に優しい）ことと検査薬や機器のハンドリングの優しさが大きな理由となっている。このように生命科学研究の分野で求められている技術である生体深部のライブイメージングは、即、医療現場の応用へと繋がることが予想される。

本稿では、「第 2 の生体の窓」と呼ばれ OTN において、RED-CNP 蛍光プローブを用いたマウスの深部の in vivo ライブイメージングを紹介した。現在市販されているシリコン CCD カメラを用いた in vivo イメージングシステムと比べ、レーザーと近赤外カメラの光学系の洗練もされていない単純で粗野なシステムでもマウスの深部を明確に可視化できていることが理解できると考える。特に OTN-NIR 波長域における多色化の可能性は、複数のターゲットを同時に検査可能にするため、生体での実験の応用の幅を非常に増やすものとして大きな期待を持ちたい。

現時点での OTN-NIR-FBI に用いることのできるプローブは、本稿で紹介した RED-CNP 蛍光プローブの他に、カーボンナノチューブや量子ドットがある。これら全てのプローブは、数十～数百 nm の大きさを持っており、生体の中で組織の中、隅々までは浸透されない。やはり有機色素のような低分子のプローブ開発が切望される。またプローブの表面を抗原特異的な抗体やペプチドなどで修飾し、特異的なイメージングが可能になれば、胃や消化管の外側などの医療現場で非常に見え難かった膵臓などの検査等、医療分野での応用も大きな可能性を持っていると考える。

謝辞

本研究の実験は、実験を行った当時曽我研究室に所属していた助教の兵頭宏氏、大学院生の林彰吾氏の補助により行われました。この場を借りてお礼申し上げます。

参考文献

1. A. M. Smith et al., *Nat. Nanotech.*, **4** (2009) 710.
2. R. R. Anderson et al., *J. Invest. Dermatol*, **77** (1981) 13 .
3. A. M. Smith et al., Nat. Nanotechnol. **11** (2009)710
4. Y. Yoshioka et al., Int. J. Mol. Sci, **9** (2008) 2044 .
5. M. Detmar et al., Cncer Res, **70** (2010) 7053 .
6. K. Soga et al, Proc. SPIE, **7598** (2010) 759807-1.
7. A. R. Moser et al., Proc Natl Acad Sci U S A, **90** (1993) 8977.
8. T. Konishi et al., J. Mater. Mater. Sci. Mater. Electron., **18** (2007) S183.

(2016 年 4 月 25 日受付; 2016 年 5 月 13 日受理)

特集「第 2 の生体の窓～21 世紀のバイオイメージングの窓～」

「第２の生体の窓」におけるカーボンナノチューブの発光

岡﨑 俊也*
産業技術総合研究所ナノチューブ実用化研究センター
* E-mail: toshi.okazaki@aist.go.jp

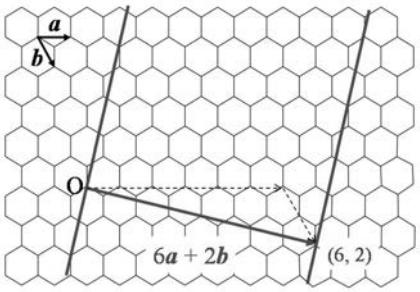
カーボンナノチューブの近赤外発光

最近、医療診断の分野において、自家蛍光によるバックグラウンドが低く抑えられることや生体透過性がよいなどの利点を有することから、近赤外領域の利用が大変注目されている。実際、酵素アッセイ[1]、DNA シークエンシング[2]、キャピラリー電気泳動[3]、イムノアッセイ[4-6]などにおいて、いくつかの近赤外蛍光分子が試みられている。例えば、近赤外蛍光ナノ粒子を使うことによって、腫瘍マーカーである α―フェトプロテインが全血試料においても首尾よく検出することができる[5]。この結果は、臨床検査における近赤外蛍光標識の大きな利点を示すものである。これらの状況の下、これまでにバイオ用標識のための数々の近赤外蛍光分子が合成されている[7-10]。

カーボンナノチューブ（CNT）は半金属であるグラファイトを筒状に巻いた構造をしており、この巻き方によって、半導体にも金属にもなる[11]。CNT の分子構造はカイラル指数と呼ばれる 2 つの整数の組(n,m)によって一義的に定義することができる。例えば、図 1(a)において、原点 O と図中に(6, 2)で示されている点が重なるようにチューブを作るとする。この点の位置ベクトル（カイラルベクトル）は 2 つの基本並進ベクトル a, b をもちいて 6a+2b と表せるので、この CNT のカイラル指数は(6, 2)となる。また、カイラルベクトルと a とのなす角をカイラル角と呼ぶ。

CNT の電子状態を特徴づけるのは、その低次元性である。1 次元的な CNT の電子状態はグラフェンの電子状態に円周方向の周期境界条件を適用することで記述できる。その結果、カイラル指数の差が 3 の倍数になれば、その CNT は金属であり、3 の倍数でなければ半導体となる。また、低次元性物質の特徴としてあるエネルギーにおいて状態密度が発散する（van Hove 特異点）。その状態間の遷移は通常の分子と同様に共鳴効果を引き起こす。励起/発光(PLE)法はこの共鳴効果をうまく利用した方法である[12]。

(a)



(b)

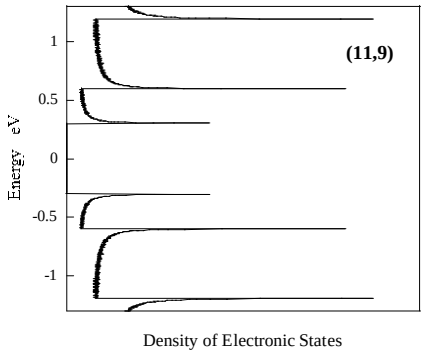


図 1. (a) CNT のカイラル指数。***a, b*** は 2 次元六角格子の基本並進ベクトル。(b) 半導体(11, 9)CNT の状態密度。

例として図 1(b)にカイラル指数(11, 9)の半導体 CNT の状態密度を示す。縦軸がエネルギー、横軸が状態密度を表している。通常、可視から近赤外領域にある半導体 CNT の第 2 バンド間を光励起すると、エネルギー緩和後、近赤外域に位置する第 1 バンド間で発光が起こる。ただし、正しく光学的遷移エネルギーを再現するには、バンドギャップに相当するエネルギーに加え、励起子による効果を考慮する必要がある[13]。CNT の電子構造はカイラル指数に依存するため、PLE スペクトルを 2 次元的に等高線プロットすると各カイラル指数をもった CNT 由来のピークが独立

に現れる。図 2 には CVD 法の一種である CoMoCAT 法によって合成された CNT（直径約 0.7 nm~0.9 nm）から得られた PLE マップを示す。縦軸は励起波長、横軸は検出波長を示している。すでに共鳴ラマンスペクトルや理論計算などとの比較研究があり、現在、各 PLE ピークの帰属についてはほぼ確立している[14]。例えば、図 2 上で最も発光強度が強いピークはカイラル指数（6, 5）の SWCNT に帰属できる。

実験的には、CNT はバンドル状態では発光しないので、1 本 1 本の孤立したチューブに分散させる必要がある。このためドデシル硫酸ナトリウム（SDS）やドデシルベンゼンスルホン酸ナトリウム（SDBS）などの界面活性剤やポリエチレングリコールなどの高分子を用い、水（重水）中に分散させるという手法が通常用いられる。また、ピラー間などに架橋された孤立 CNT も発光する。発光量子収率については、ミセル水溶液中で~10^{-4}、架橋 CNT で数％オーダーと見積もられている[15]。金属的 CNT については フェルミ面近傍にも状態密度が存在するため発光は観測されない。

CNT 近赤外蛍光標識をもちいたイムノアッセイ[16]

この近赤外で発光する性質を生かした応用の一つとして、CNT 近赤外蛍光標識をもちいた免疫沈降反応（IP）を紹介する（図 3）。まず、リン脂質－ポリエチレングリコール（PEG）を分散剤として CoMoCAT 法で合成した CNT（図 2 参照）をリン酸緩衝液中に分散する。そこにイムノグロブリン G（IgG）を加え、PEG 末端の N-ヒドロキシスクシンイミド（NHS）基と反応させ、CNT-PEG-IgG 複合体を得た。

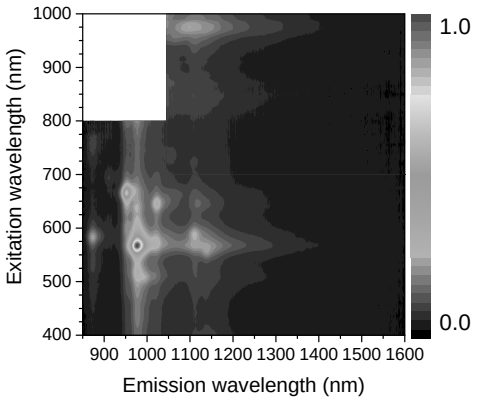


図 2. CoMoCAT 法で合成された CNT から得られた PLE マップ。

この、CNT-PEG-IgG 溶液に磁気ビーズ付き G タンパク(PrG-beads)を混合した。よく知られているように G タンパクは IgG と特異的に反応する。混合後、永久磁石を用いて PrG-beads を回収した。回収した溶液から得られた発光スペクトルを図 4(a)に示す。励起波長は 660 nm である。実際に CNT 由来の PL 信号が 1045 nm および 1145 nm に明瞭に観測されており、免疫沈降反応に成功していることが分かる。ちなみにこの二つのピークは、それぞれ(7, 5), (7, 6)のカイラル指数を有する CNT からの発光である。

さらに、CNT 近赤外蛍光標識の有効性を確認するために、CNT-PEG-IgG を CNT-PEG-IgG/PrG-beads 複合体より抽出した（図 3）。抽出液から得られた PL スペクトルを図 4(b)に示す。CNT に特徴的な PL スペクトルが得られていることが分かる。一方、抽出後の PrG-beads 残留液の PL スペクトルには CNT 由来の信号が全く観測されなかった（図 4(c)）。つまり、ほぼすべての CNT は PrG-beads から抽出されており、CNT 蛍光標識をもちいた定量評価が可

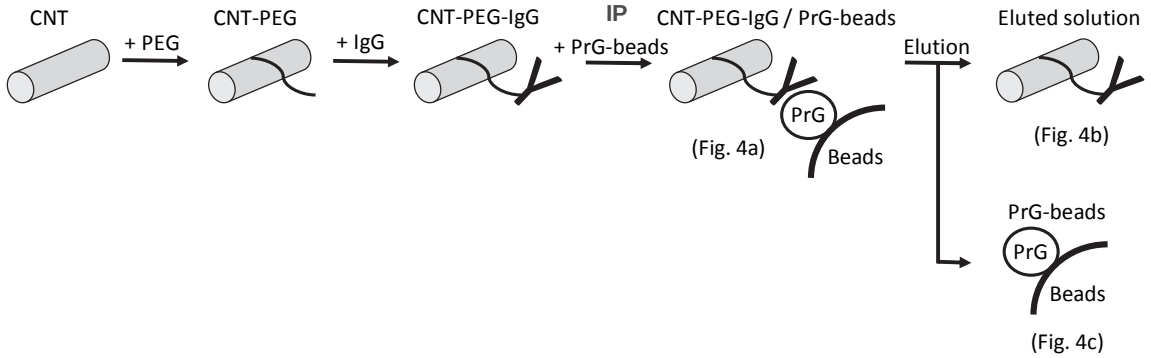
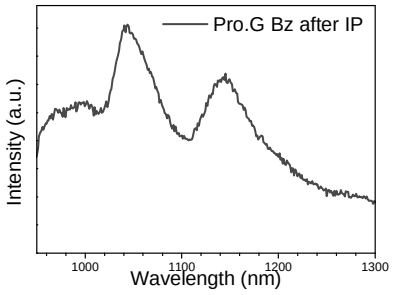
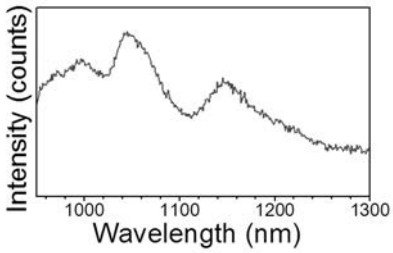


図 3. CNT 蛍光標識をもちいた免疫沈降反応のフローチャート。

(a)



(b)



(c)

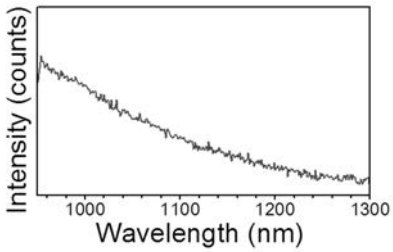


図 4. (a) CNT-PEG-IgG/PrG-beads、(b)CNT-PEG-IgG 抽出液、(c)抽出後の PrG-beads から得られた PL スペクトル。励起波長は 660 nm。

能であることが分かる。

まとめ

CNT は光耐久性が高い、比較的安全である、生体透過性の高い第 2 生体の窓領域（1000 nm-1400nm）で発光することなど、数々の利点を有することから、次世代の近赤外蛍光標識として非常に有望視されている。すでに細胞および動物実験における分子プローブとしても大変有用であることが示されており、さらなる機能化など、今後の発展が大いに期待される。

引用文献

1. Imasaka, T.; Okazaki, T.; Ishibashi, N. Anal. Chim. Acta, 1988, 208, 325-329.
2. Owens, C. V.; Davidson, Y. Y.; Kar, S.; Soper, S. A. Anal. Chem., 1997, 69, 1256-1261.
3. Baars, M. J.; Patonay, G. Anal. Chem., 1999, 71, 667-671.
4. Ohnmacht, C. M.; Schiel, J. E.; Hage, D. S.　Anal. Chem., 2006, 78, 7547-7556.
5. Deng, T.; Li, J.-S.; Jiang, J.-H.; Shen, G.-L.; Yu, R.-Q. Adv. Func. Mater., 2006, 16, 2147-2155.
6. Liang, G.; Liu, S.; Zou, G.; Zhang, X. Anal. Chem., 2012, 84, 10645-10649.
7. Thomas, J.; Sherman, D. B.; Amiss, T. J.; Andaluz, S. A.; Pitner, J. B. Bioconjugate Chem., 2007, 18, 1841-1846.
8. Li, Y.; Patrick, B. O.; Dolphin, D. J. Org. Chem., 2009, 74, 5237-5243.
9. Zhao, W. L.; Carreira, E. M. Angew. Chem. Int. Ed., 2005, 44, 1677-1679.
10. Zhao, W.; Carreira, E. M. Chem. Eur. J., 2006, 12, 7254-7263.
11. 安藤恒也，中西毅：“カーボンナノチューブと量子効果”(岩波書店，2007).
12. R. B. Weisman in Applied Physics of Carbon Nanotubes: Fundamentals of Theory, Optics and Transport Devices, S. V. Rotkin, S. Subramoney Eds. (Springer: Berlin, 2005), pp. 183-202.
13. F. Wang, G. Dukovic, L. E. Brus, T. F. Heinz, Science, 308, 838 (2005).
14. R. B. Weisman, S. M. Bachilo, Nano Lett. 3, 1235 (2003).
15. J. Lefebvre, D. G. Austing, J. Bond, P. Finnie, Nano Lett., 6, 1603 (2006).
16. Y. Iizumi, T. Okazaki, Y. Ikehara, M. Ogura, S. Fukata and M. Yudasaka, ACS Appl. Mater. Interfaces, 5, 7665−7670 (2013).

(2016 年 5 月 3 日受付; 2016 年 5 月 5 日受理)

特集「第 2 の生体の窓～21 世紀のバイオイメージングの窓～」

動物体内におけるナノ粒子の未知なる動態メカニズムと検出技術改善のニーズ

梅澤 雅和[1,3]*、新海 雄介[1]、小野田 淳人[1,4,5]、武田 健[1]、上村 真生[2,3]、曽我 公平[2,3]
[1]東京理科大学 研究推進機構 総合研究院 戦略的環境次世代健康科学研究基盤センター
[2]東京理科大学 基礎工学部 材料工学科、[3]東京理科大学 研究推進機構 総合研究院 イメージングフロンティアセンター
[4]東京理科大学大学院 薬学研究科 衛生化学研究室、[5]日本学術振興会 特別研究員（DC）
* E-mail: masa-ume@rs.noda.tus.ac.jp

要旨

ナノ粒子は現代の産業活動の結果として環境放出が増え、人の触れる（曝露を受ける）機会が増えたものの一つである。人がその曝露を受けた場合に起こる生体影響を予防すべく、その詳細を明らかにするために、環境衛生学的視点からナノ粒子の動物体内における動態が研究されてきた。環境衛生学において大気中浮遊粒子の研究は、1950 年台から活発に行われてきた。その中で特に、直径（動力学的粒子径）10 μm 以下の粒子（PM_{10}）、2.5 μm 以下の粒子（$PM_{2.5}$）と小さな画分に焦点が移り、2000 年頃からさらに小さいナノ粒子の研究が世界的に進んだという歴史がある。また、ナノマテリアルの医薬応用の観点からも、ナノ粒子の体内動態の検証技術の改善が求められる。これまでに、ナノ粒子は吸入すると呼吸器の深部に沈着しやすいこと、鼻腔から脳神経系に輸送されること、胎盤を通過すること、妊娠母体から胎児に移行し、成長後の次世代個体からも検出されることが明らかにされてきた。一方で、ナノ粒子の検出技術には改善の余地が大きく残っており、特に高感度かつ定量的な検出技術の確立が課題である。また、ナノ粒子の体内動態をクリアランスの過程まで簡便にスクリーニングするために、生体内分布のライブイメージングを可能にする非侵襲的検出技術の改善が望まれる。本論文では、ナノ粒子の体内動態に関する知見と課題を概説し、その分析技術の改善の必要性を提示する。

はじめに

ナノ粒子の体内動態（吸収、分布、蓄積、排出）を捉え、制御する技術が、工学（産業応用）、薬学・医学（医療応用）、環境衛生学などの分野から期待されている。ナノ粒子は独特の体内分布や高い比活性を発揮し、近未来の産業発展を担うナノテクノロジーを支える基盤材料である。このナノテクノロジーは人類に多くの恩恵をもたらす一方で、これまで天然に存在し得なかった単分散状態のナノ粒子を次々と生み出してもいる。ナノ粒子は大きな比表面積に伴う界面エネルギーをキャンセルするために凝集しやすく、天然に多くは安定に存在しなかった。数少ない天然のナノ粒子として、ススの中に含まれるカーボンのナノ粒子があるが、これも 18 世紀後半の産業革命以降に、便利さの代償として地球環境中に大量に放出されている。これが、社会から高い関心を集める大気中微小粒子 $PM_{2.5}$ 問題の元にもなっている。革新的で有用（Innovative）かつ持続可能な（Sustainable）ナノ粒子の開発には、物理化学的性状をはじめとするナノ粒子の性質と体内動態との関連を比較検証可能にすることが重要である。工学・衛生学両面の観点から、微小な粒子の簡便かつ確度の高い定量技術が求められており、特に超微小なナノ粒子の体内分布の測定については、感度、可視性、定量性のいずれもが解決すべき課題である。

本論文では、ナノ粒子の体内動態に関する知見と課題を概説し、その分析技術の改善の必要性を提示する。

吸入したナノ粒子の動態

環境衛生学の観点では、吸入がナノ粒子の主要な曝露経路である。ナノ粒子の形状や凝集状態は一様でないが、その環境中ならびに体内動態はほぼ凝集体の動力学的粒径（二次粒子径）に依存すると言える。吸入したナノ粒子の沈着や排出については、2005 年頃から包括的な解説がされてきた。まず、吸入したナノ粒子は大気分子と衝突しながら拡散し、呼吸器に沈着する。また、ナノ粒子が電荷を

持っている場合には、静電気力もナノ粒子の沈着の促進因子になる。より大きな粒子では慣性衝突、重力沈降によっても呼吸器への沈着が促されるが、ナノ粒子にはこれらの力が働きづらい。その結果、直径が 1000 nm 以上の粒子は大部分が鼻腔や咽頭に捕捉されるのに対し、直径 1～10 nm の粒子は気管支領域に、直径 10～1000 nm の粒子は特に肺胞領域に沈着する割合が高くなる。直径 5 nm の粒子は鼻腔・咽頭領域、気管支領域、肺胞領域にほぼ等量ずつ沈着するのに対し、直径 20 nm の粒子は肺胞領域への到達・沈着率が最も高く、50%程度になるというシミュレーション解析の報告もある[1]。

呼吸器に沈着したナノ粒子は粘膜表面に留まった後、一部は粘膜線毛運動やマクロファージの貪食により排出されるが、一部は気道上皮細胞のトランスサイトーシスを介して間質に移行し、血液やリンパ液中に到達する。また、気道上皮に存在する感覚神経終末により取り込まれ、中枢神経系に到達する経路の可能性も指摘されている[2,3]。ナノ粒子の体内動態メカニズムを考える上で、肺胞に到達したときに起こる肺サーファクタント分子との相互作用も重要であると言われている[4]。吸入したナノ粒子の肺外移行については、炭素 (^{13}C) [2,5] やイリジウム (^{192}Ir) [6,7] などの放射性同位体から成る粒子を用いた放射線定量により証明されている。

他の経路で投与したナノ粒子の体内動態

その後、動物体内でのナノ粒子の動態を包括的に検証する研究が複数進められてきた。例えばカドミウム (Cd) 元素を内包した量子ドット（直径 13 nm、40 pmol）をマウスの静脈内に投与（尾静注）し、主要臓器ならびに血漿中濃度を高周波誘導結合プラズマ質量分析法 (ICP-MS) で定量した研究では、（1）量子ドットが投与後 24 時間以内に脾臓および肝臓に分布すること、（2）7 日以内に血漿中から検出されなくなること、（3）脾臓および肝臓中の分布量は投与後 4 週目から 24 週目の間に半分以下（組織重量あたりの Cd 検出量として）になる一方で、（4）腎臓中の分布量は投与後 24 週目にも比較的高値であったことが示されている[8,9]。蛍光物質を内包させた量子ドットを用いて、ナノ粒子の体内動態を非侵襲的にを検証した例もある。量子ドット［直径 6.5 nm、メトキシポリエチレングリコール (mPEG) で表面修飾］をマウスに静脈内投与した際の体内動態については、体外からの紫外線照射による非侵襲的検出に成功している。この量子ドットは早い段階（投与 0.17 時間後）で皮膚に蓄積したが、時間経過とともに蓄積量が減少した。主要臓器を摘出し組織学的解析に供した結果、皮膚から消失した量子ドットは投与 72 時間後には、腋窩、顎下ならびに鼠径リンパ節に移行したと示されている[10]。二酸化チタンナノ粒子（PBS 中に調製した二次粒子径 500 nm 以上の凝集体の懸濁液）をマウスの皮下もしくは静脈内に投与し、主要臓器への分布を検証した研究では、腎臓や肺への粒子の検出は静脈内投与後でのみ認められ、皮下投与後の粒子は脾臓と肝臓でしか検出されなかったと報告している[11]。

言うまでもなく、ナノ粒子の体内動態は懸濁液中での凝集状態などの物理化学的性状に依存する。しかし、ナノ粒子の表面性状を変化させるとともに、凝集状態を制御しながら体内動態を比較検証したデータは乏しい。体内動態のメカニズムに関して、特に（1）ナノ粒子の動態を制御する生体分子と（2）感覚神経細胞を介した中枢神経系への詳細な輸送経路が未解決の課題である。

胎児・次世代への移行と蓄積

著者らはこれまでに、ナノ粒子の妊娠期曝露による胎児・次世代への移行と蓄積に注目し、詳細を検証してきた。ナノ粒子の次世代移行に注目するきっかけになったのは、ディーゼル排ガスを吸入した妊娠マウスからの産仔の脳の電子顕微鏡病理解析の結果である。ディーゼル排ガスは現代の大気汚染の主要因の一つであり、多量のナノ粒子を含む。これをエンジンから発生させ、希釈トンネルを通して小動物用の曝露チャンバーに導入することにより、ナノ粒子を吸入したマウスで認められる所見を検証できた。電顕病理像では、産仔自身は出生後にナノ粒子を吸入していないにも関わらず、妊娠中に母マウスがこれを吸入すると（1）産仔の脳血管周囲マクロファージの消化顆粒にディーゼル排気微粒子様の物質が蓄積すること、（2）この蓄積が出生後 3 ヶ月間以上経った後で認められること、（3）血管周囲のアストロサイト末端足の膨潤化が起こり、微小血管の閉塞が引き起こされることが明らかになった[12]。すなわち、ナノ粒子が妊娠中の母体から産仔に移行し、それが成長後にも残存すること、ならびにその粒子が体内で不活性でなく生体影響を及ぼすことが示唆されたのであ

る。なお、脳血管周囲マクロファージならびに隣接するアストロサイトがナノ粒子の胎児期曝露に鋭敏に応答することは、他のナノ粒子（カーボンブラックなど）でも認められている[13,14]。この脳血管周囲の異常所見は脳の様々な領域にわたって認められ、ナノ粒子という環境要因の出生前曝露による脳への影響が、特定の脳領域に限局しないことを示唆している。

ただし、ディーゼル排ガスを用いた研究では産仔の脳に認められた粒子様物質の組成を同定できなかった。後に、二酸化チタンナノ粒子を妊娠マウスの背部皮下に投与した場合にも、ナノ粒子が産仔の脳に移行することが判った。この研究では、二酸化チタンナノ粒子のチタン原子を走査型電子顕微鏡下でエネルギー分散型 X 線スペクトル解析により同定することにより、ナノ粒子の次世代移行がより確かに検証された[15]。ナノ粒子の次世代移行はこの後、妊娠中母体に静脈内投与したときの胎児においても観察され、支持されている[16]。また、ヒト胎盤 *ex vivo* 還流モデルを用いた研究で、直径 240 nm 以下のポリスチレン粒子の胎盤通過能も証明されている[17]。ナノ粒子の次世代移行は電顕観察が必要であるため、定量的検証が極めて困難であるが、妊娠マウスに投与した二酸化チタンナノ粒子の次世代雄性生殖器への移行については、多数の超薄切片を電顕観察することで移行量の用量依存性が検証・報告されている[18]。

体内動態検証に資する定量分析技術は未解決

ナノ粒子の体内動態は、ここまで述べたような知見が蓄積されてきた。しかし、物理化学的性状の様々なナノ粒子の動態の比較検証を可能にする、高感度かつ簡便なナノ粒子の定量分析技術は欠如しているのが現状である。環境衛生分野からは、環境放出され得るナノ粒子のより安全な設計を実現するために、様々なナノ粒子の動態比較を可能にする技術を求められる。新しいナノ粒子が設計されるたびに、その体内動態を電子顕微鏡下で定量分析するのは必要な労力が甚大になってしまうことは言うまでもない。ここで、ナノ粒子が小さいこと、また、ナノ粒子は反応性を規定する表面積に比して質量が小さいという二つの特徴が、その定量分析の困難さの原因になっている。

また、一般的には高感度に元素の定量分析が可能であるとされる ICP-MS や ICP 発光分光分析（図 1）も、ナノ粒子の定量には感度が十分であるか疑問がある。ナノ粒子で注目される活性・反応性や毒性は表面で起こる反応によるものであるが、ナノ粒子では比表面積、すなわち質量あたりの表面積が大きいため、逆に表面積が大きくても質量は相対的に小さい。しかし、上記の元素定量はあくまで質量基準であるために、ナノ粒子の定量の感度については注意が必要であろう。

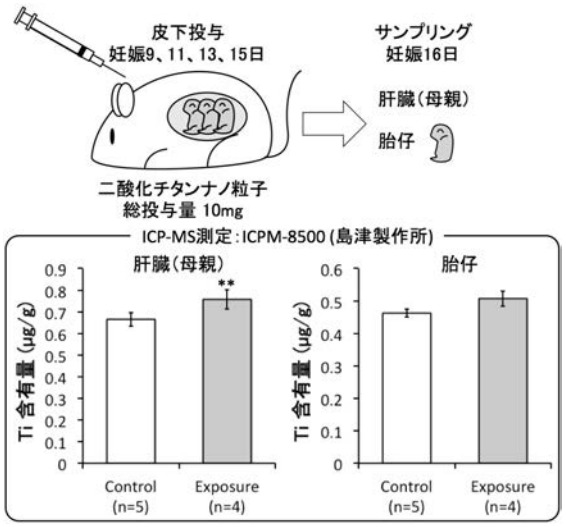


図 1、妊娠マウスに投与した二酸化チタンナノ粒子の胎児移行量の定量（ICP-MS）

ICR 系妊娠マウスに、生理食塩水中に懸濁させた二酸化チタンナノ粒子を皮下投与（妊娠 9～15 日目に計 10 mg）し、最終投与翌日に母体の肝臓ならびに胎仔を摘出し、解析に供した。定量値（組織重量あたりの Ti 含有量）の解析ごとの誤差が大きいこと (data not shown)、また、Ti の例のように生体組織中に一定量存在する元素ではバックグラウンドシグナルが高くなってしまうことも、ナノ粒子の体内分布を ICP-MS により定量することを困難にする。

そもそも電顕下でも、広視野（低倍率）観察下で視認できるのは凝集体が主であり、臓器試料中に単分散で存在するナノ粒子を広範囲にわたって観察するにはやはり甚大な労力を要する。蛍光標識したナノ粒子の蛍光顕微鏡での検出も、生体組織に単分散で分布した粒子の検出には限界がある（図 2）。ナノ粒子の体内動態検証に資する定量分析技術の向上は、環境衛生学的視点だけでなく、ナノマテリアルの医薬応用（ナノメディシン）発展のためにも重要である。

非侵襲的検出技術への期待

ナノ粒子の体内動態をクリアランスの過程まで簡便に

スクリーニング可能とするためには、ナノ粒子の生体内分布のライブイメーシングを可能にする非侵襲的検出技術の向上が望まれる。生体内に投与した物質の非侵襲的検出

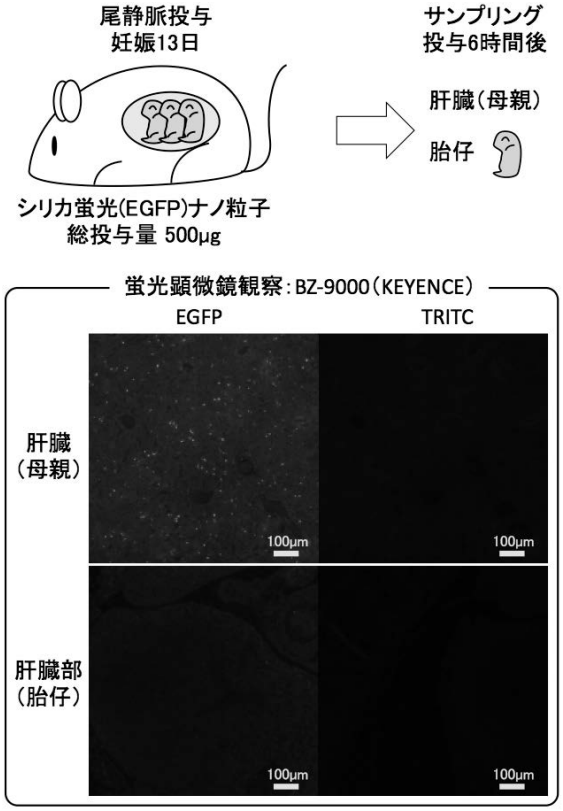


図 2、妊娠マウスに静脈内投与した蛍光標識シリカナノ粒子の胎児移行検出（蛍光顕微鏡下）

ICR 系妊娠マウスに、生理食塩水中に懸濁させた蛍光標識シリカナノ粒子を静脈内投与（妊娠 13 日目に計 500 μg）し、投与 6 時間後に母体の肝臓ならびに胎仔を摘出し、蛍光顕微鏡観察に供した。母体の肝臓中に多量に移行したナノ粒子は観察される一方で、蛍光顕微鏡では、胎仔へのシリカナノ粒子移行［先行研究 (Yamashita et al. 2011) において電子顕微鏡下では観察されている］を捉えることはできていない。

技術というと、X 線 CT (Computed Tomography)、核磁気共鳴画像解析 (MRI: magnetic resonance imaging)、陽電子放射断層撮影 (PET: Positron Emission Tomography) が挙げられるが、それぞれ頭蓋骨のある頭部に実験レベルでも適用できない、長いスキャン時間を要する、放射性核種をプローブとして要するという限界がある。そこで、これらにない利点をもつ高深度イメージングを実現すべく、「第 2 の生体の窓 (Second Biological Window (SBW))」と呼ばれる、近赤外波長域の光を用いるイメージング技術の活用が期待されている[19,20]。従来から *in vivo* 蛍光イメージングでは、近赤外波長域 (700 – 1800 nm) が、生体内物質や

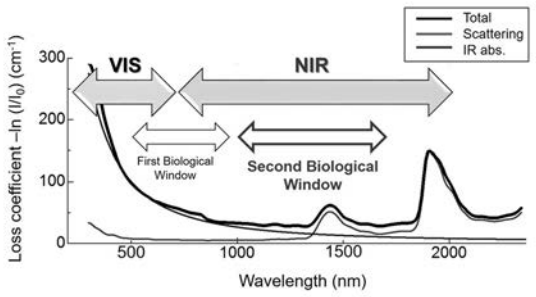


図 3、ヒトの皮膚の光損失スペクトル[19]

近赤外波長域は生体内物質や水の吸収が少ない「生体の窓」と呼ばれる波長域であり、光が生体深部まで透過できる。

水の吸収の少ない「生体の窓 (Biological Window)」と呼ばれ、この波長域の光を用いることで生体深部のイメージングが可能になることが知られている（図 3）。現在報告されている近赤外蛍光イメージングのほとんどは、「第 1 の生体の窓 (First Biological Window (FBW))」と呼ばれる 1000 nm 以下の波長域の光を用いているが、光散乱の観点からはさらに長波長域でのイメージングが望ましい。従来の FBW 波長域における *in vivo* 蛍光イメージングの観察深度は数 mm が限界であったのに対して、SBW 波長域を用いることでその観察深度を数 cm まで拡張することが可能になる[21]。

SBW 波長域の蛍光を発する材料のひとつとして、希土類含有セラミックスナノ粒子 (RED-CNPs) がある[22]。この RED-CNPs の蛍光は、狭いスペクトル幅と長い励起状態寿命を特徴とし、レーザーや光増幅の材料として実用されている。さらにドープする希土類イオンの種類を選択することで、様々な SBW 波長域における蛍光を得ることができる。またホスト材料としてのセラミックスは、主にフォノンエネルギーを考慮した組成の選定が必要であり、また比較的高濃度で希土類イオンを均質にドープできるという観点からも、$NaYF_4$ や $NaGdF_4$、Y_2O_3 といった希土類フッ化物や希土類酸化物を用いる。SBW 波長域の蛍光を示す RED-CNPs の設計の詳細については紙面の都合で割愛するので参考文献を参照されたい[23,24]。

著者らはこれまでに、RED-CNPs を用いて生きたマウスの *in vivo* イメージングに取り組んでおり、経口投与により消化器官に集積した RED-CNPs や、尾静脈投与後に肝臓や脾臓等の臓器に集積した RED-CNPs の発する SBW 波長域の蛍光を、マウスを解剖することなく、リアルタイム

観察することに成功している[25,26]。この RED-CNPs を用いた SBW 波長域における近赤外蛍光イメージング技術を利用することで、様々な経路で取り込まれたナノ粒子の体内動態を、体内深部においてでも、リアルタイムに検出することが可能になると期待される。

求められるナノ粒子の体内動態分析技術

以上、本論文では動物体内におけるナノ粒子の動態に関わる知見と未解決の課題を述べた。求められるのは、物理化学的性状の様々なナノ粒子の動態を同じ分析系で比較検証できる技術である。従来のように FITC や Rhodamine などの蛍光色素で標識し、これを蛍光の検出系の供するというシステム以上に、高感度のプローブやトレーサーと、その検出系の開発・導入が必要である。また、体内動態解析の重要な要素であるクリアランス評価も容易にするために、ナノ粒子の生体内分布のライブイメージングを可能にする非侵襲的検出技術の向上が望まれる。その実現が、ナノ粒子による生体影響機序解明という環境衛生分野からの要請と、ナノマテリアルの医薬応用発展の両方に貢献すると期待される。

謝辞

ナノ粒子の次世代移行・影響に関する研究成果は、菅又昌雄氏・井原智美氏（栃木臨床病理研究所）、立花研氏（日本薬科大学）、入江美代子氏、鈴木健一郎氏、二木力夫氏、沼崎理英氏（東京理科大学 戦略的環境次世代健康科学研究基盤センター）ならびに多くの大学院生（東京理科大学薬学部 衛生化学研究室）との共同研究から得られました。共同研究者に深く御礼申し上げます。研究推進にあたっては、文部科学省私立大学戦略的研究基盤形成支援事業（S1101015、2011～15 年度「環境と次世代健康科学―疾患原因解明と予防に向けた先進的研究」）、厚生労働科研費・化学物質リスク研究事業（12103301、2012～14 年度）、JSPS 科研費・基盤研究 B（24390033、2012～14 年度）・若手研究 B（24790130、2012～13 年度）・特別研究員奨励費（15J05718、2015 年度～）の助成を受けました。

参考文献

1. Oberdörster G, Oberdörster E, Oberdörster J (2005) Nanotoxicology: an emerging discipline evolving from studies of ultrafine particles. Environ Health Perspect 113: 823-839.
2. Oberdörster G, Sharp Z, Atudorei V, Elder A, Gelein R, Kreyling W, Cox C (2004) Translocation of inhaled ultrafine particles to the brain. Inhal Toxicol 16: 437-445.
3. Zhuang X, Xiang X, Grizzle W, Sun D, Zhang S, Axtell RC, Ju S, Mu J, Zhang L, Steinman L, Miller D, Zhang HG (2011) Treatment of brain inflammatory diseases by delivering exosome encapsulated anti-inflammatory drugs from the nasal region to the brain. Mol Ther 19: 1769-79.
4. Hu G, Jiao B, Shi X, Valle RP, Fan Q, Zuo YY (2013) Physicochemical properties of nanoparticles regulate translocation across pulmonary surfactant monolayer and formation of lipoprotein corona. ACS Nano 7: 10525-10533.
5. Oberdörster G, Sharp Z, Atudorei V, Elder A, Gelein R, Lunts A, Kreyling W, Cox C (2002) Extrapulmonary translocation of ultrafine carbon particles following whole-body inhalation exposure of rats. J Toxicol Environ Health A 65: 1531-1543.
6. Kreyling WG, Semmler M, Erbe F, Mayer P, Takenaka S, Schulz H, Oberdörster G, Ziesenis A (2002) Translocation of ultrafine insoluble iridium particles from lung epithelium to extrapulmonary organs is size dependent but very low. J Toxicol Environ Health A 65: 1513-1530.
7. Semmler M, Seitz J, Erbe F, Mayer P, Heyder J, Oberdörster G, Kreyling WG (2004) Long-term clearance kinetics of inhaled ultrafine insoluble iridium particles from the rat lung, including transient translocation into secondary organs. Inhal Toxicol 16: 453-459.
8. Yang RS, Chang LW, Wu JP, Tsai MH, Wang HJ, Kuo YC, Yeh TK, Yang CS, Lin P (2007) Persistent tissue kinetics and redistribution of nanoparticles, quantum dot 705, in mice: ICP-MS quantitative assessment. Environ Health Perspect 115: 1339-43.
9. Lin P, Chen JW, Chang LW, Wu JP, Redding L, Chang H, Yeh TK, Yang CS, Tsai MH, Wang HJ, Kuo YC, Yang RS (2008) Computational and ultrastructural toxicology of a nanoparticle, Quantum Dot 705, in mice. Environ Sci Technol 42: 6264-6270.

10. Sykes EA, Dai Q, Tsoi KM, Hwang DM, Chan WC (2014) Nanoparticle exposure in animals can be visualized in the skin and analysed via skin biopsy. Nat Commun 5: 3796.
11. Patri A, Umbreit T, Zheng J, Nagashima K, Goering P, Francke-Carroll S, Gordon E, Weaver J, Miller T, Sadrieh N, McNeil S, Stratmeyer M (2009) Energy dispersive X-ray analysis of titanium dioxide nanoparticle distribution after intravenous and subcutaneous injection in mice. J Appl Toxicol 29: 662-672.
12. Sugamata M, Ihara T, Takano H, Oshio S, Takeda K (2006) Maternal diesel exhaust exposure damages newborn urine brains. J Health Sci 52: 82-84.
13. Onoda A, Umezawa M, Takeda K, Ihara T, Sugamata M (2014) Effects of maternal exposure to ultrafine carbon black on brain perivascular macrophages and surrounding astrocytes in offspring mice. PLoS One 9: e94336.
14. Umezawa M, Onoda A, Takeda K (2015) Findings regarding the hazard assessment of nanoparticles and their effects on the next generation. In: Li YJ et al., editors "PM2.5 -Role of Oxidative Stress in Health Effects and Prevention Strategy-" (Nova Science Publishers, Inc., NY, USA), Chapter 13, pp.159-175.
15. Takeda K, Suzuki K, Ishihara A, Kubo-Irie M, Fujimoto R, Tabata M, Oshio S, Nihei Y, Ihara T, Sugamata M (2009) Nanoparticles transferred from pregnant mice to their offspring can damage the genital and cranial nerve systems. J Health Sci 55: 95-102.
16. Yamashita K, Yoshioka Y, Higashisaka K, Mimura K, Morishita Y, Nozaki M, Yoshida T, Ogura T, Nabeshi H, Nagano K, Abe Y, Kamada H, Monobe Y, Imazawa T, Aoshima H, Shishido K, Kawai Y, Mayumi T, Tsunoda S, Itoh N, Yoshikawa T, Yanagihara I, Saito S, Tsutsumi Y (2011) Silica and titanium dioxide nanoparticles cause pregnancy complications in mice. Nat Nanotechnol 6: 321-28.
17. Wick P, Malek A, Manser P, Meili D, Maeder-Althaus X, Diener L, Diener PA, Zisch A, Krug HF, von Mandach U (2010) Barrier capacity of human placenta for nanosized materials. Environ Health Perspect 118: 432-436.
18. Kubo-Irie M, Uchida H, Mastuzawa S, Yoshida Y, Shinkai Y, Suzuki K, Yokota S, Oshio S, Takeda K (2014) Dose-dependent biodistribution of prenatal exposure to rutile-type titanium dioxide nanoparticles on mouse testis. J Nanopart Res 16: 2284.
19. Anderson RR, Parrish JA (1982) The optics of human skin. J Invest Dermatol 77: 13-19.
20. Smith AM, Mancini MC, Nie S (2009) Second window for in vivo imaging. Nat Nanotechnol 4: 710-1.
21. Zako T, Yoshimoto M, Hyodo H, Kishimoto H, Ito M, Kaneko K, Soga K, Maeda M (2015) Cancer-targeted near infrared imaging using rare earth ion-doped ceramic nanoparticles. Biomater Sci 3: 59-64.
22. Hemmer E, Venkatachalam N, Hyodo H, Hattori A, Ebina Y, Kishimoto H, Soga K (2013) Upconverting and NIR emitting rare earth based nanostructures for NIR-bioimaging. Nanoscale 5: 11339-61.
23. Soga K (2009) ポリスケールテクノロジーによる近赤外励起蛍光バイオイメージングシステムの開発．分析化学 58: 461-71.
24. Soga K (2009) Nanostructured Materials for Biomedical Applications. Transworld Research Network. pp.223-41.
25. Soga K (2010) Application of ceramic phosphors for near infrared biomedical imaging technologies. Proc SPIE 7598: 759807-1.
26. Kamimura M, Kanayama N, Tokuzen K, Soga K, Nagasaki Y (2010) Near-infrared (1550 nm) in vivo bioimaging based on rare-earth doped ceramic nanophosphors modified with PEG-b-poly(4-vinylbenzylphosphonate). Nanoscale 3: 3705-13.

(2016 年 4 月 26 日受付; 2016 年 5 月 3 日受理)

特集「感染症を見る」

第 24 回日本バイオイメージング学会学術集会シンポジウム「感染症を見る」を総括する意味で、各講演者に御寄稿いただいた。なお、シンポジウムでは下記以外に、藤芳 暁 博士 (東京工業大学 大学院理工学研究科 物性物理学専攻)による講演「クライオ蛍光顕微鏡で見る数ケルビンの世界」が行われた。

オーガナイザー 鈴木 和男 (帝京大学アジア国際感染症制御研究所)

加藤 有介 (徳島大学疾患酵素学研究センター)

オーバービュー：「感染症を見る」を開催するにあたって

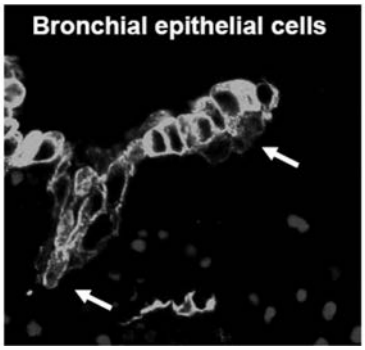
鈴木 和男*

帝京大学 アジア国際感染症制御研究所

*E-mail: suzuki-k@med.teikyo-u.ac.jp

地球上に生きているバクテリアも含めすべての生き物は他の生物が感染している。感染症とは、感染源がホスト側との“仲の良い”関係がくずれホスト側の正常機能をおびやかして病的な状態を誘発し、それがひどくなれば死にいたらすことである。動植物界での両者の良い関係を保っているのは生体防御機能によっていて、高等生物になるにしたがい免疫機能として発達して「良い関係」を保っている。そのバランスがくずれると劇症型や高病原性として致死率を上げることになる。人類の歴史も感染症によって大きく変化してきている。ペスト、スペイン風邪（インフルエンザ）、赤痢、結核、コレラ、ポリオ、エイズ、エボラなどなどである。

世界の近代化によって、社会構造や流通・旅行の形態がこれらの感染症を誘発し、感染症の内、高病原性の感染症は世界規模で恐怖の的になっている。一時は、抗生物質により激減したことで感染症はすでに終わったかに見えたが、エイズの出現、SIRDS や H5N1 インフルエンザの出現とエボラで世界中が感染症対策に翻弄されている。そして、結核は、今でも東南アジアでも猛威を振るっている状況である。アジアでの感染症研究の発端となったのは、H5N1 の死亡例の病理標本を見ることから始まり、そのブロックを借り受け、解析したことであった（図: 肺上皮細胞核内で H5N1 増殖(Nguyen & Suzuki *et al.* Jpn. J. Infect. Dis., 2008; 61: 157-160.)



さて、以上のべたように感染症の研究では、感染源の特定とホスト側の両者からのアプローチがある。両者の間にある薬剤の３者からの研究を Bioimaging の観点から紹介してもらい、感染症への理解と今後の感染症研究や生体防御の視点をひもといてもらえることを期待している。プログラムの順の新しい視点でのシンポジウムとした。

最小イオンチャネル Hv1/VSOP による貪食細胞の活性酸素産生の多重制御

岡村 康司[1,2,*]、大河内 善史[1]、荒谷 康昭[3]、Hibret A. Adissu[4]、鈴木 和男[5]

[1]大阪大学大学院医学系研究科、[2]大阪大学大学院生命機能研究科、

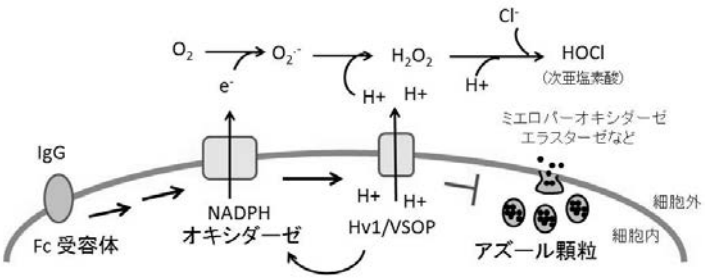
[3]横浜市立大学大学院生命ナノシステム科学研究科、

[4]Physiol & Experimental Med, Hospital for Sick Children, Canada、

[5]帝京大学 アジア国際感染症制御研究所

*E-mail: yokamura@phys2.med.osaka-u.ac.jp

Hv1/VSOP は、プロトン透過、膜電位感知、pH センサー機能を有し、哺乳類ゲノムでコードされる分子量最小のイオンチャネル蛋白質である。我々は Hv1/VSOP の機能が欠失したノックアウトマウスを作成して、Hv1/VSOP が、好中球において、細胞膜電位および細胞内 pH の制御を通して活性酸素の産生を助けることを明らかにし（Okochi et al., BBRC 2009、Chemaly et al., JEM 2010）、従来提唱されてきた NADPH オキシダーゼの制御因子仮説を実証してきた（図）。我々は、この研究の延長上で、好中球でのプロトンチャネルの新たな役割を見いだした。好中球では、活性酸素 H_2O_2 は強力な酸化剤である次亜塩素酸（HOCl）に変換され、この過程には特殊な小胞（アズール顆粒）に蓄えられているミエロパーオキシダーゼ（MPO）が細胞外へ分泌される必要がある。我々は、好中球を刺激して HOCl の産生量を調べたところ、プロトンチャネルの機能が欠失した好中球において、HOCl の産生量が野生型よりも有意に増加するという奇妙な結果が得られた。この現象について詳細に解析したところ、プロトンチャネルの機能が欠失した好中球において、ミエロパーオキシダーゼを含む小胞の数が野生型よりも有意に減少しており、その結果として細胞外に分泌される MPO の量が増加していた。すなわち、プロトンチャネルの機能が欠失した好中球では、小胞の分泌が促進されていることが明らかになった（Okochi et al., JLB 2016）。我々は、この過剰な小胞分泌と関連する個体レベルの表現型として、カンジダ菌感染時の肺において、炎症症状が野生型よりも強く現れる所見を見いだした（Okochi et al., JLB 2016）。これらの結果から、プロトンチャネルは、過度の小胞分泌を抑制することで炎症を防いでいると考えられる（図）。



好中球におけるプロトンチャネルの役割：従来知られていたオキシダーゼ活性を維持する機能（）。今回見つかった脱顆粒を抑制する機能（）。

トリインフルエンザ H5N1 を高病原性化する Non-structural protein 1 における変異のタンパク質分子機構

加藤 有介[1,*]、福井 清[1]、鈴木 和男[2]

[1]徳島大学先端酵素学研究所、[2]帝京大学アジア国際感染症制御研究所

*E-mail: ysk.kt@tokushima-u.ac.jp

鳥インフルエンザウイルス H5N1 はヒトなどの哺乳類に対し高い致死率を示す。Non-structural protein 1 (NS1)は、H5N1 の病原性因子である。NS1 の RNA 結合ドメイン(RBD)における 42 番目の残基におけるアミノ酸置換変異は、H5N1 のマウスに対する病原性の程度を劇的に変化させる。我々は、この置換が RBD に与える影響を検討したところ、この残基が Ser の場合には RBD は二本鎖 RNA に結合し、Pro の場合にはそうではないことを見出した。Ser42 型と Pro42 型の RBD の構造モデルを構築したところ、その構造に大きな違いが見られた。一方で、ゲル濾過クロマトグラフィーと円二色性スペクトル (CD)の測定では、両者に際立った違いは見られなかった。我々の結果は、点変異による単一アミノ酸置換が、マイナーではあるが、グローバルな構造変化を導くことで、NS1 の機能に重大な影響を及ぼし、ひいては H5N1 の病原性の程度を著しく変化させるということを示唆した。

結果と議論：大腸菌による発現系を用い、Pro42 型の RBD (RBD(P))と Ser42 型の RBD (RBD(S))を発現、調製した。分析用のゲル濾過クロマトグラフィー (Superdex 75 10/300 column (GE Healthcare))により、これらのサンプルの溶液内での分子量を測定したところ、それぞれ 19.4 ± 0.2 および 19.4 ± 0.1 kDa という値が計測された。アミノ酸配列から計算される RBD のモノマーの分子量は、およそ 8.5 kDa であることから、RBD(P), RBD(S)ともに、水溶液中でダイマーを形成していることが示唆された。ついで我々は CD 測定を行ったところ、両者のスペクトルはほとんど同じであった。これらのスペクトルは 208, 222 nm に谷が見られたことから、RBD がヘリックスリッチであることが示唆された。このように、ダイマーを形成し、ヘリックスリッチであるという点で、共通の構造を示す RBD(P)と RBD(S)が、機能上等価であるのかどうかを検討するために、Electrophoresis Mobility Shift Assay (EMSA)を行った。その結果、二本鎖 RNA に対して RBD(P)が結合しなかったことに対し、RBD(S)では、結合が示された。こうした変異が、タンパク質構造におよぼす影響を、より詳細に解析するために、RBD の分子モデルをホモロジーモデリングと分子ドッキング手法により構築した。その結果、RBD(S)と RBD(P)では、α ヘリックス間の相対的な配置が大きく異なることが示唆された。こうした違いにより、RNA 結合のためのインターフェースの構造に大きな違いが生じ、RNA 結合能に違いが見られたのではないかと考えられる。これまで、RBD の RNA 結合に重要な役割を果たす残基は、Arg35 と Arg38 であると考えられてきた。しかし、これらの残基を変異させた場合でも、H5N1 のマウスに対する病原性の程度は、さほど変化がないことが報告されている。Arg 残基は、正電荷を持つ残基であり、複数の水素結合を形成することが可能である。それに対して、Ser 残基には電荷はなく、形成出来る水素結合は 1 本だけである。したがって、なぜ、Ser の置換が、Arg の置換よりも、RBD の機能に、より大きな影響を示すのか、ということは、アミノ酸残基の性質だけを考えていても理解することは難しい。そこで我々は、今回、RBD(P)と RBD(S)の分子モデルを作成し、それらの構造を比較したところ、RNA 結合インターフェースにおいてグローバルな構造変化が生じており、その結果、Arg35, Arg38 をふくむ、さまざまな RNA 結合残基の相対的な配置に、大きな変化が見られることが示唆された。こうした構造変化は、RNA 結合能に対する変化だけでなく、NS1 と他のタンパク質の間の相互作用にも、影響を及ぼす可能性があるかも知れない。こうしたことなどにより、H5N1 の病原性に大きな違いが生じることとなった可能性が示された。我々の解析結果により、RBD のヘリックスの相対配置を変化させることで、その働きに重大な変化をもたらす可能性が示された。RBD の構造に影響に影響を与える薬剤を開発することが出来れば、その

病原性の程度を大幅に低減することが、可能になるかも知れない。

Kato YS, Fukui K, Suzuki K. Mechanism of a Mutation in Non-Structural Protein 1 Inducing High Pathogenicity of Avian Influenza Virus H5N1. Protein Pept Lett. 2016;23(4):372-378.

植物の感染防御応答の制御と細胞内の膜動態

朽津 和幸[1,2,*]、大滝 幹[1]、羽山 大介[1]、北畑 信隆[1]、花俣 繁[1]、来須 孝光[1,3]、上田貴志[4]

[1]東京理科大学 理工学部 応用生物科学科、[2]東京理科大学 イメージングフロンティアセンター、

[3]東京工科大学応用生物学部、[4]基礎生物学研究所

*E-mail: kuchitsu@rs.tus.ac.jp

今後の人類が直面する重要な課題である食糧･環境･エネルギー問題の本質を考えると、人類がいかに多くを植物に依存しているかに気づく。世界の人口は未だに増加の一途をたどっており、穀物や青果物に代表される食糧の安定的な供給は、今後の人類にとって必要不可欠な課題である。農業による植物生産にとって、植物病原体による感染症は、未だに大きな脅威である。感染症に対する従来の農薬の大半は、病原体の増殖や感染を標的とし、それを抑制する殺菌剤であるが、ヒトの感染症の原因の大半がウイルスや細菌であるのに対して、植物病原体の約 8 割は真菌、卵菌等の真核生物である。そのため、感染症対策として殺菌剤を用いるアプローチには、人体や環境への影響や耐性菌の出現に対する配慮が必要であり、それに代わる方法論も求められている。

一方、植物も、病原体の感染を感知し撃退する、動物とは異なる高度な免疫系を発達させている。その過程では、NADPH oxidase による活性酸素種(ROS)の積極的生成、抗菌性物質の合成、局所的プログラム細胞死(PCD)等が誘導され、分子機構の解明が進められつつある。植物の免疫力を増強する薬剤は、従来の殺菌剤や殺虫剤の欠点を克服できると期待される。これまでに数種の抵抗性誘導剤が実用化されているが、一部の作物と病原体にのみ有効なサリチル酸経路に作用する薬剤に限られている。我々は、植物培養細胞の ROS 生成を指標とした簡便な選抜･評価系(特許登録済)を考案し、「植物サプリ」とも呼び得る新規植物免疫活性化剤の探索を進めている。その過程で、phosphoinositide 3-kinase (PI3K)阻害剤が、感染シグナル誘導性 ROS 生成を亢進するなど、植物の感染防御応答の活性化能を持つことを見出した。

PI3K は種々の膜交通系の制御に関与することが知られている。我々は、タバコ培養細胞 BY-2 をモデル系として、オートファゴソーム等の細胞内膜系のイメージング実験系(Hanamata *et al. Plant Signal Behav.* 2013)を用いて解析した結果、卵菌由来の感染シグナル cryptogein により誘導される PCD を伴う感染防御応答過程において、液胞やオートファゴソーム等の細胞内膜系の動態が変化することを見出した(Higaki *et al. Plant Cell Physiol.* 2007; Higaki & Kurusu *et al. J. Plant Res.* 2011)。

そこで、どの膜交通系が植物免疫活性の制御に関与するかを明らかにするため、種々の膜交通系の変異体を用いて、ROS 生成等の感染シグナル誘導性の反応に対する影響を解析している。また感染シグナル受容体タンパク質のイメージング実験系を構築し、感染シグナル受容後のエンドサイトーシスを介した動態解析を進めている。

蛍光イメージングによる神経細胞内マグネシウムイオン動態の解析

新藤　豊[1,*,†]、山中　龍[1]、鈴木　孝治[2]、岡　浩太郎[1,*]

[1]慶大・生命情報；[2]慶大・応化

*E-mail: shindo@z5.keio.jp; oka@bio.keio.jp

要旨

マグネシウムイオン（Mg^{2+}）は生体に必須のイオンの一つであり、数百種類にも及ぶ酵素活性の調節、DNA や RNA、タンパク質の立体構造の維持、イオンチャネルの透過性調節など様々な生命現象に影響を与える。しかし、細胞内の Mg^{2+} 濃度がいつどのようなメカニズムで変化するのかに関する知見は少ない。我々は独自に開発した Mg^{2+}選択性蛍光プローブである KMG シリーズを用いて、神経細胞内 Mg^{2+}濃度変化を観察し、その動員メカニズムを調べてきた。分散培養した海馬神経細胞では、高濃度グルタミン酸や一酸化窒素が細胞質中の Mg^{2+}濃度上昇を引き起こした。これらは過剰な Ca^{2+}濃度上昇やプロテインキナーゼ G（PKG）経路の細胞内シグナルが引き金となり、ミトコンドリアから Mg^{2+}が放出されたことによることを明らかにした。また、パーキンソン病の細胞モデル実験では、細胞外からの流入とミトコンドリアからの放出の両方の寄与で細胞質中の Mg^{2+}濃度は上昇し、このことが神経変性に対する保護効果を示した。さらには、ミトコンドリアをはじめとした細胞内局所での Mg^{2+}濃度変化を測定するために、新規プローブおよびそれを用いた手法を開発し、細胞内 Mg^{2+}動態をより詳細に調べることも可能となった。

はじめに

Mg^{2+}は細胞内に最も多く存在する、生命活動に必須の 2 価陽イオンであり、生体分子の安定性や細胞内でのエネルギー産生、数百種類に及ぶ酵素反応がその影響を受ける[1, 2]。細胞内 Mg^{2+}濃度は約 0.5～1 mM の範囲でほぼ一定に保たれていると従来考えられていた。しかし最近になって、哺乳類細胞に発現する多種類の Mg^{2+}輸送タンパク質が同定され、細胞が状況に応じて細胞内 Mg^{2+}濃度を調節している可能性が示唆された[3]。実際に、T 細胞では抗原提示により MagT1 という Mg^{2+}選択性イオンチャネルが開き、流入した Mg^{2+}がセカンドメッセンジャーとして働く[4]。また、細胞内 Mg^{2+}濃度が概日リズムに応じて変化することも報告されており[5]、細胞が Mg^{2+}濃度を能動的に変化させ、それが細胞機能において重要や役割を果たしていることがわかってきた。本稿では、神経細胞内の Mg^{2+}濃度が神経伝達物質の受容により変化することを明らかにした我々の研究について紹介し、また、パーキンソン病の細胞モデルを用いた細胞内 Mg^{2+}による神経保護作用について言及する。さらに、新規プローブを用いた細胞内局所での Mg^{2+}イメージング手法についても紹介する。

† 2015 年度日本バイオイメージング学会奨励賞受賞者

Mg^{2+}選択性蛍光プローブ

細胞内 Mg^{2+}動態を観察するにあたり、市販の蛍光 Mg^{2+}プローブのイオン選択性の低さが問題となる。特に神経細胞をはじめとした興奮性細胞内では Ca^{2+}濃度が大きく変動するため、Ca^{2+}シグナルにも応答してしまう市販のプローブでは Mg^{2+}濃度変化を正確にとらえることができない。

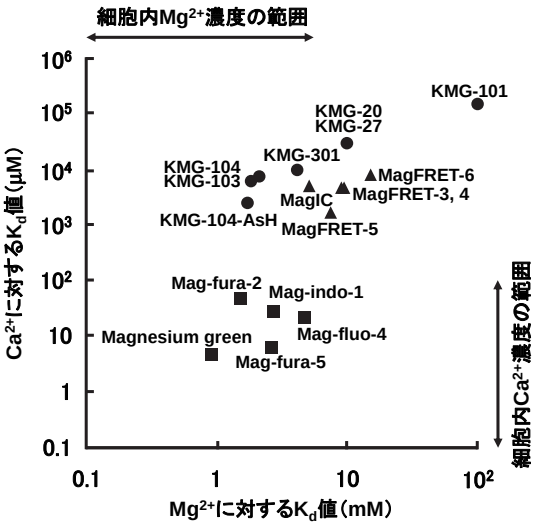


図 1. Mg^{2+}プローブの Mg^{2+}、Ca^{2+}に対する K_d 値

KMG シリーズ（●）は[6–9]より、遺伝子コード型（▲）は［10, 11］より、市販のプローブ（■）は Thermo Fisher Scientific 社のウェブサイトよりデータを使用。

プローブ名	励起波長	蛍光波長	p*K*a
Mag-fura-2	369 nm (free) 330 nm (Mg^{2+})	511 nm	5.0
KMG-104	502 nm	523 nm	4.2
KMG-301	565 nm	589 nm	5.0
KMG-104-AsH	522 nm	541 nm	4.2
MagFRET	433 nm	475 nm (Cerulean) 529 nm (Venus)	6.0*
MagIC	515 nm (Venus) 587 nm (mCherry)	530 nm (Venus) 610 nm (mCherry)	7.5

表 1. 代表的な蛍光 Mg^{2+}プローブの特性比較

* 論文中に p*K*a 値の記載がなかったため、Venus（プローブ中で使用している黄色蛍光タンパク質）の p*K*a 値を記載した。

この問題を解決するために我々のグループは Mg^{2+}選択性蛍光プローブ、KMG シリーズを開発した[6–9]。これらは Ca^{2+}に対する解離定数（K_d 値）が高く Ca^{2+}との親和性が低いため、細胞内 Ca^{2+}濃度が大きく変動しても Mg^{2+}シグナルだけを可視化することができる（図 1）。近年では、MagFRET シリーズや MagIC 等の遺伝子コード型 Mg^{2+}プローブも開発され、これらも高い Mg^{2+}選択性を示しているが、蛍光タンパク質の特性上 pH 感受性が比較的高く（表 1）[10, 11]、利用には注意が必要である。神経活動により細胞内の Ca^{2+}濃度や pH が変化することを考えると、KMG シリーズが現状で最も神経細胞内 Mg^{2+}のイメージングに適したプローブであると考えられる。

神経伝達物質が引き起こす神経細胞内 Mg^{2+}濃度変化

神経細胞内の Mg^{2+}、Ca^{2+}濃度変化の関係を調べるために、KMG-104 と Ca^{2+}プローブである Fura-red を用いた同時測定を行った。図 2A に示すように、これらのプローブは 488 nm のレーザーで共に励起可能であるが、蛍光波長は離れているため、それぞれのシグナルを分けて観察できる。両プローブを分散培養したラット海馬神経細胞に導入し、脳内における主要な興奮性神経伝達物質であるグルタミン酸に対する応答を観察した。グルタミン酸（100 μM）を添加後、まず細胞内 Ca^{2+}濃度は大きく上昇してそのまま高い値を維持したのに対し（図 2B、灰色線、右軸、Fura-Red の蛍光輝度減少が Ca^{2+}濃度上昇に対応する）、細胞内 Mg^{2+}濃度は 30 秒ほど遅れて上昇し始め、その後減少に転じた（図 2B、黒線、左軸、KMG-104 の蛍光輝度の上昇が Mg^{2+}濃度上昇に対応する）[12]。このとき神経細胞内 Ca^{2+}濃度上昇は、細胞外からの大量の Ca^{2+}流入が原因であるが、これはミトコンドリアへのストレスとなり、神経興奮毒性の引き金となる[13]。我々は以前、ミトコンドリアが細胞内の Mg^{2+}貯蔵庫であることを明らかにしており[14]、今回のようなミトコンドリアへのストレス負荷もミトコンドリアから細胞質への Mg^{2+}放出につながる可能性が考えられる。そこで、ミトコンドリアの分布がまばらな神経突起上で、局所的な Mg^{2+}濃度上昇の様子を比較した。グルタミン酸添加に伴う Mg^{2+}濃度上昇はミトコンドリアが密に存在する領域では観察されたのに対し、ミトコンドリアが疎な領域では観察されなかった[12]。このことから、グルタミン酸添加によりラット海馬神経細胞内ではミトコンドリアから Mg^{2+}が放出されていたことがわかった。神経突起上でミトコンドリアが疎な領域で Mg^{2+}濃度上昇

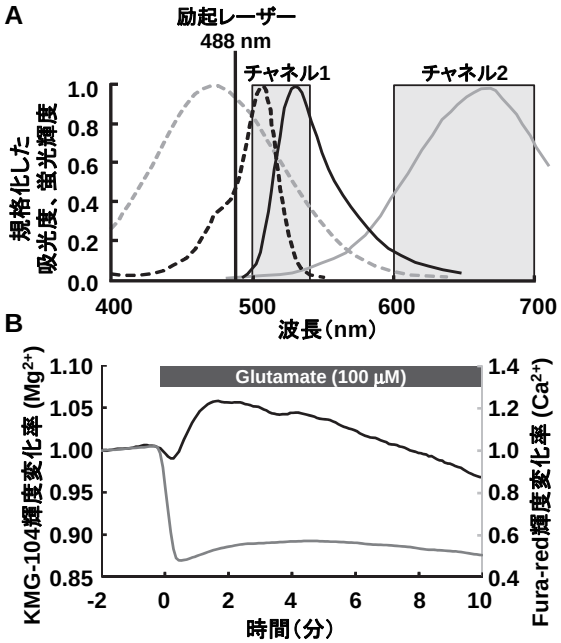


図 2. 細胞内 Mg^{2+}、Ca^{2+}濃度変化の同時測定

A、KMG-104（黒）と Fura-red（灰色）の吸収（破線）、蛍光（実線）スペクトル。両色素を 488 nm のレーザー光で同時に励起し、チャネル 1 で KMG-104、チャネル 2 で Fura-red の蛍光をそれぞれ測定することで細胞内 Mg^{2+}、Ca^{2+}濃度変化の同時測定が可能となる。B、グルタミン酸（100 μM）により引き起こされるラット海馬神経細胞内 Mg^{2+}（黒）、Ca^{2+}（灰色）濃度変化の様子。

が観察されなかったのは、細胞膜上の Na^+/Mg^{2+}交換体が余剰な Mg^{2+}を細胞外へと排出するため[15]、体積に対する表面積の比が大きい神経突起上ではミトコンドリアから放出された Mg^{2+}はすぐに細胞外へ排出され、Mg^{2+}濃度が上昇するのはミトコンドリア近傍に限定されるためと考えられる。

我々は、他にも神経細胞内 Mg^{2+}濃度を変動させる神経伝達物質があるかを探索し、ガス状シグナル分子で神経伝達物質としても働く一酸化窒素（NO）が神経細胞内 Mg^{2+}濃度上昇を引き起こすことを発見した[16]。ミトコンドリアから予め Mg^{2+}を薬理的に放出させておいた細胞では、NO は Mg^{2+}濃度を上昇させなかったことから、ミトコンドリアが Mg^{2+}を放出していたと考えられる。NO は細胞質中で可溶性グアニル酸シクラーゼを活性化し、環状グアノシン一リン酸（cGMP）を産生させる。cGMP はプロテインキナーゼ G（PKG）を活性化し、リン酸化により様々なタンパク質の活性に影響を与える。このシグナルの影響を受けるミトコンドリアのタンパク質として ATP 感受性 K^+（$MitoK_{ATP}$）チャネルがある[17]。NO、cGMP の細胞膜透過型アナログである 8-Br-cGMP、$MitoK_{ATP}$ チャネルの活性化剤である diazoxide はそれぞれ神経細胞内 Mg^{2+}濃度の上昇を引き起こしたが、$MitoK_{ATP}$ チャネルの阻害剤である 5-HD で処理した細胞ではそれらの応答は抑制された。これらのことから我々は、海馬神経細胞内では NO、cGMP、PKG シグナルが $MitoK_{ATP}$ チャネルを活性化し、その影響でミトコンドリアが Mg^{2+}を放出したと結論付けた[16]。

細胞内 Mg^{2+}による神経保護作用

これまでに、神経細胞内の Mg^{2+}濃度変化にミトコンドリアが深くかかわっていることを示したが、ミトコンドリアの機能異常は多くの病態と関連しているため、それらの病態の進行に細胞内 Mg^{2+}濃度変化が関連している可能性がある。そこで、ミトコンドリア異常とかかわりの深い神経変性疾患であるパーキンソン病（PD）における Mg^{2+}動態と神経変性の進行についての関係を、神経様に分化させた PC12 細胞と 1-methyl-4-phenylpyridinium（MPP^+）を用いたパーキンソン病の細胞モデル実験で調べた。MPP^+はドーパミン輸送体を持つ細胞に選択的に毒性を示す薬物であり、ヒトや実験動物の体内でパーキンソン病様の症状を引き起こすことや、MPP^+により引き起こされる細胞死の様子がパーキンソン病患者の神経の症状をよく再現することから、パーキンソン病のモデル実験に使われる[18]。PC12 細胞に MPP^+を添加したところ、細胞内 Mg^{2+}濃度の上昇が観察された。この時、Mg^{2+}を含まない実験液中では MPP^+による細胞内 Mg^{2+}濃度上昇幅は減少し、また予めミトコンドリアから Mg^{2+}を薬理的に放出させておいた細胞でもその上昇幅は減少した。これら 2 つの条件を組み合わせると MPP^+の添加による Mg^{2+}濃度上昇は見られなくなったことから、MPP^+は細胞外からの Mg^{2+}流入とミトコンドリアからの Mg^{2+}放出の双方を引き起こしていることがわかった[19]。MPP^+はミトコンドリアの電子伝達系複合体 I を阻害するため、この場合もミトコンドリアへのストレス負荷が Mg^{2+}放出の引き金になったと考えられる。それに対して MPP^+がどのように細胞外からの Mg^{2+}流入を引き起こしたのかは明らかになっていない。

MPP^+添加後 8 時間および 16 時間の細胞では細胞内 Mg^{2+}濃度は高い値を維持していた。また、Mg^{2+}を含まない溶液や Mg^{2+}輸送の阻害剤を含む溶液中では、MPP^+添加直後の細胞内 Mg^{2+}濃度上昇は抑制され、同様に MPP^+添加 16 時間後の細胞内 Mg^{2+}濃度も低く抑えられた。これらのことから、MPP^+は持続的な Mg^{2+}流入を引き起こし、それにより細胞内 Mg^{2+}濃度が高く維持されていたと

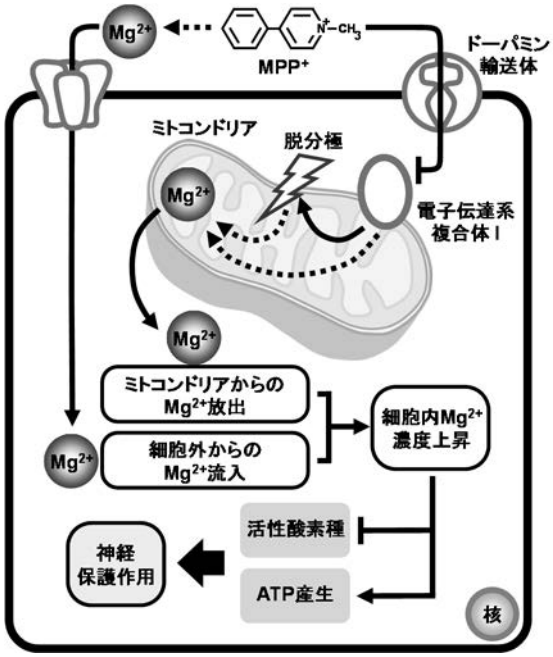


図 3. PD の MPP^+モデルにおける Mg^{2+}動員とその作用

考えられる。このとき、Mg^{2+}流入を抑制した条件ではMPP^+に暴露した細胞の生存率が低くなる傾向がみられ、様々な条件下でMPP^+に 16 時間暴露したときの細胞生存率はそれぞれの条件における細胞内 Mg^{2+}濃度と正の相関が見られた。このように、細胞内 Mg^{2+}が MPP^+による細胞死に対する保護作用を示すことが示唆された[19]。

では、なぜ Mg^{2+}の流入は細胞保護作用につながるのだろうか。Mg^{2+}流入を抑制した条件ではMPP^+添加 16 時間後の細胞内の活性酸素種の量が多く、また、細胞質中の ATP 濃度が大きく減少していた[19]。これらのことは、Mg^{2+}が活性酸素種量を低く抑えることや、ATP 産生を正常に保つことにより、MPP^+の毒性から細胞を保護したことを示唆している（図 3)。ミトコンドリアの機能を阻害したときの活性酸素種発生量は、その周囲の Mg^{2+}濃度の影響を受ける[20]。このことから、ミトコンドリア異常を伴う病態では、細胞内 Mg^{2+}はミトコンドリアからの活性酸素種発生を抑制していると考えられる。また、ミトコンドリア内の Mg^{2+}濃度はクエン酸回路中の酵素活性に影響を与え、ミトコンドリアの ATP 産生を調節する[21]。MPP^+はミトコンドリアの Mg^{2+}放出を誘導するが、一方でミトコンドリアは Mg^{2+}選択性チャネル Mrs2 を介して周囲の濃度に応じて Mg^{2+}を取り込んでいる[22]。そのため、細胞外から Mg^{2+}を流入させ、細胞質中の Mg^{2+}濃度を高く維持できた細胞では、ミトコンドリアは再取り込みにより内部の Mg^{2+}濃度の減少を抑え、ATP 産生が維持されたのではないかと考えられる。これらの作用により、Mg^{2+}は MPP^+モデルのパーキンソン病において神経保護作用を示したと考えられる。以上のことは、細胞膜やミトコンドリア膜の Mg^{2+}輸送能がパーキンソン病の進行速度を決める重要な要因の一つであることを示唆している。

Mg^{2+}動員を詳細に測定するための新たな手法

これまで紹介したように、神経細胞内の Mg^{2+}濃度変化にミトコンドリアは重要な役割を果たしている。つまり、ミトコンドリア内の Mg^{2+}濃度変化を可視化できれば神経細胞内の Mg^{2+}動態をより詳細に調べることができるはずである。そこで我々は、細胞内でミトコンドリアに蓄積されやすい、ローダミンを蛍光団とした Mg^{2+}選択性プローブ KMG-301 を開発した[8]。この分子のアセトキシメチル（AM）体を細胞に導入すると、ミトコンドリアに局在した。KMG-301 の AM 体は生体膜を透過できるが、細胞内のエステラーゼにより AM 基が切られると膜透過性を失う。そのため、細胞質中で AM 基が切られると、プローブはミトコンドリア内に入ることはできない。それを防ぐために、エステラーゼ活性を低下させる低温環境下で色素を細胞に取り込ませることで KMG-301 をミトコンドリアマトリックスに導入することに成功し、ミトコンドリア内部の Mg^{2+}濃度変化を測定することが可能となった[8]。KMG-301 は吸収波長、蛍光波長のピーク（それぞれ 565 nm、589 nm）が KMG-104 のそれぞれの波長（502 nm、523 nm）とは離れているため、これら 2 つの色素は同時使用が可能である（図 4A)。海馬神経細胞にこれら 2 種類の色素を同時に導入し、それぞれの蛍光を観察した様子を図 4B に示す。局在の異なる 2 種類のプローブの蛍光をそれぞれ観察できていることがわかる。これにより細胞質とミトコンドリア内の Mg^{2+}濃度変化を同一細胞内で同時に測定することが可能となった。この細胞に脱共役剤である FCCP を添加すると、ミトコンドリア内の Mg^{2+}濃度減少と細胞質中の Mg^{2+}濃度上昇が観察された。これは、ミトコンドリア膜電位の消失に伴う、ミトコンドリアから細胞

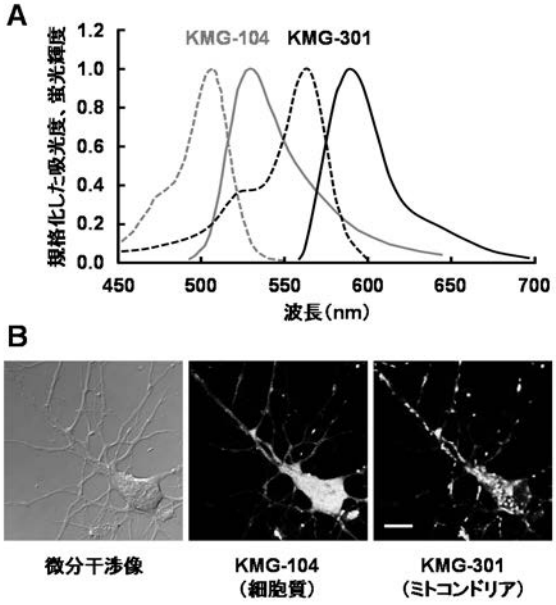


図 4. 細胞質とミトコンドリア内の Mg^{2+}同時測定

A、KMG-104（灰色）と KMG-301（黒）の吸収（破線）蛍光（実線）スペクトル。B、KMG-104 と KMG-301 両方を導入した海馬神経細胞の微分干渉像、KMG-104 の蛍光像、KMG-301 の蛍光像。スケールバーは 20 μm。

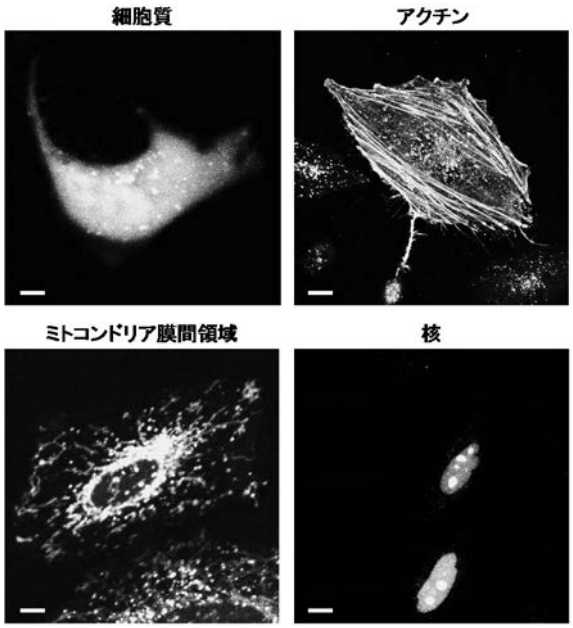


図 5. HeLa 細胞内の様々な部分に局在させた KMG-104-AsH の蛍光画像　スケールバーは 20 μm。

質への Mg^{2+}放出を直接可視化したことになる[8]。

それでは、ミトコンドリア以外の細胞内小器官が Mg^{2+}濃度変化にかかわったり、細胞内でも部位により濃度変化の様子が異なったりすることはないのだろうか。それを調べるために、細胞内の任意の場所に局在させることのできる Mg^{2+}プローブ、KMG-104-AsH を開発した。このプローブは KMG-104 と、ペプチドタグの一つであるテトラシステインタグ（TCtag）に選択的に結合するラベル化プローブである FlAsH[23] の特徴を合わせ持ち、TCtag と結合したときにのみ Mg^{2+}プローブとして機能する[9]。そのため、TCtag 付きのタンパク質を細胞内の任意の場所に発現させることで、Mg^{2+}プローブをその場所に局在させることができる。図 5 に示すように、細胞質、アクチンフィラメント、ミトコンドリア膜間領域および核に局在するタンパク質に TCtag を結合させて発現させた HeLa 細胞では、KMG-104-AsH はそれぞれ所望の位置に局在した。この手法を用いることで、ミトコンドリア以外でも細胞内の特定の場所での Mg^{2+}濃度変化を調べることが可能となった。

おわりに

本稿では、ミトコンドリアを中心とした神経細胞内での Mg^{2+}濃度変化と、Mg^{2+}の神経保護作用について述べ、さらに細胞内で局在を持った Mg^{2+}イメージングの新手法について紹介した。ミトコンドリアはエネルギー産生機関である一方、Mg^{2+}貯蔵庫でもあり、ATP 産生は内部の Mg^{2+}濃度の影響を受ける。ストレス負荷や細胞内シグナルによりミトコンドリア内の Mg^{2+}濃度が変化することは、細胞内エネルギー代謝が、Mg^{2+}輸送を介して状況に応じて制御されている可能性を示唆している。また、その他の細胞内小器官では細胞質とは異なった Mg^{2+}濃度制御が行われていて、細胞機能に重要な役割を果たしている可能性もある。未だ明らかにされていないこのイオンの動態やその役割を詳細に調べていくと、既知の細胞内シグナルだけでは説明できなかった現象を解き明かすことにつながるのではないかと期待している。

引用文献

1. de Baaij JH, Hoenderop JG, Bindels RJ. (2015) Magnesium in man: implications for health and disease. *Physiol Rev* 95: 1-46.
2. Romani AM. (2011) Cellular magnesium homeostasis. *Arch Biochem Biophys* 512: 1-23.
3. Quamme GA. (2010) Molecular identification of ancient and modern mammalian magnesium transporters. *Am J Physiol Cell Physiol* 298: C407-29.
4. Li FY, Chaigne-Delalande B, Kanellopoulou C, Davis JC, Matthews HF, Douek DC, Cohen JI, Uzel G, Su HC, Lenardo MJ. (2011) Second messenger role for Mg^{2+} revealed by human T-cell immunodeficiency. *Nature* 475: 471-6.
5. Feeney KA, Hansen LL, Putker M, Olivares-Yanez C, Day J, Eades LJ, Larrondo LF, Hoyle NP, O'neill JS, van Ooijen G. (2016) Daily magnesium fluxes regulate cellular timekeeping and energy balance. *Nature* 532: 375-9.
6. Suzuki Y, Komatsu H, Ikeda T, Saito N, Araki S, Citterio D, Hisamoto D, Kitamura Y, Kubota T, Nakagawa J, Oka K, Suzuki K. (2002) Design and synthesis of Mg^{2+}-selective fluoroionophores based on a coumarin derivative and application for Mg^{2+} measurement in a living cell. *Analytical Chemistry*

74: 1423-8.

7. Komatsu H, Iwasawa N, Citterio D, Suzuki Y, Kubota T, Tokuno K, Kitamura Y, Oka K, Suzuki K. (2004) Design and synthesis of highly sensitive and selective fluorescein-derived magnesium fluorescent probes and application to intracellular 3D Mg^{2+} imaging. *J Am Chem Soc* 126: 16353-60.
8. Shindo Y, Fujii T, Komatsu H, Citterio D, Hotta K, Suzuki K, Oka K. (2011) Newly developed Mg^{2+}-selective fluorescent probe enables visualization of Mg^{2+} dynamics in mitochondria. *PLoS One* 6: e23684.
9. Fujii T, Shindo Y, Hotta K, Citterio D, Nishiyama S, Suzuki K, Oka K. (2014) Design and synthesis of a FlAsH-type Mg^{2+} fluorescent probe for specific protein labeling. *J Am Chem Soc* 136: 2374-81.
10. Lindenburg LH, Vinkenborg JL, Oortwijn J, Aper SJ, Merkx M. (2013) MagFRET: the first genetically encoded fluorescent Mg^{2+} sensor. *PLoS One* 8: e82009.
11. Koldenkova VP, Matsuda T, Nagai T. (2015) MagIC, a genetically encoded fluorescent indicator for monitoring cellular Mg^{2+} using a non-Forster resonance energy transfer ratiometric imaging approach. *J Biomed Opt* 20: 101203.
12. Shindo Y, Fujimoto A, Hotta K, Suzuki K, Oka K. (2010) Glutamate-induced calcium increase mediates magnesium release from mitochondria in rat hippocampal neurons. *J Neurosci Res* 88: 3125-32.
13. Stout AK, Raphael HM, Kanterewicz BI, Klann E, Reynolds IJ. (1998) Glutamate-induced neuron death requires mitochondrial calcium uptake. *Nat Neurosci* 1: 366-73.
14. Kubota T, Shindo Y, Tokuno K, Komatsu H, Ogawa H, Kudo S, Kitamura Y, Suzuki K, Oka K. (2005) Mitochondria are intracellular magnesium stores: investigation by simultaneous fluorescent imagings in PC12 cells. *Biochim Biophys Acta* 1744: 19-28.
15. Kubota, T, Tokuno, K, Nakagawa, J, Kitamura, Y, Ogawa, H, Suzuki, Y, Suzuki, K, Oka, K. (2003) Na^{+}/Mg^{2+} transporter acts as a Mg^{2+} buffering mechanism in PC12 cells. *Biochem Biophys Res Commun* 303: 332-6.
16. Yamanaka R, Shindo Y, Hotta K, Suzuki K, Oka K. (2013) NO/cGMP/PKG signaling pathway induces magnesium release mediated by mitoK_{ATP} channel opening in rat hippocampal neurons. *FEBS Lett* 587: 2643-8.
17. Chai Y, Lin YF. (2010) Stimulation of neuronal K_{ATP} channels by cGMP-dependent protein kinase: involvement of ROS and 5-hydroxydecanoate-sensitive factors in signal transduction. *Am J Physiol Cell Physiol* 298: C875-92.
18. Mounsey, RB, Teismann, P. (2011) Mitochondrial dysfunction in Parkinson's disease: pathogenesis and neuroprotection. *Parkinsons* Dis 2011: 617472.
19. Shindo Y, Yamanaka R, Suzuki K, Hotta K, Oka K. (2015) Intracellular magnesium level determines cell viability in the MPP^{+} model of Parkinson's disease. *Biochim Biophys Acta* 1853: 3182-91.
20. Kowaltowski, AJ, Naia-da-Silva, ES, Castilho, RF, Vercesi, AE. (1998) Ca^{2+}-stimulated mitochondrial reactive oxygen species generation and permeability transition are inhibited by dibucaine or Mg^{2+}. *Arch Biochem Biophys* 359: 77-81.
21. Rodriguez-Zavala JS, Moreno-Sanchez R. (1998) Modulation of oxidative phosphorylation by Mg^{2+} in rat heart mitochondria. *J Biol Chem* 273: 7850-5.
22. Kolisek M, Zsurka G, Samaj J Weghuber J, Schweyen R, Schweigel M. (2003) Mrs2p is an essential component of the major electrophoretic Mg^{2+} influx system in mitochondria. *EMBO J* 22: 1235-44.
23. Adams SR, Campbell RE, Gross LA, Martin BR, Walkup GK, Yao Y, Llopis J, Tsien RY. (2002) New biarsenical ligands and tetracysteine motifs for protein labeling in vitro and in vivo: synthesis and biological applications. *J Am Chem Soc* 124: 6063-76.

(2016 年 5 月 21 日受付; 2016 年 5 月 27 日受理)

「バイオイメージング」投稿のお誘い

和文誌「バイオイメージング」は、全文がインターネット上で公開され、多くの方にお読みいただいています。シンポジウム等に基づく特集記事も歓迎致します。下記の要領で、投稿をお待ちしています。

「バイオイメージング」ホームページ(暫定):

https://sites.google.com/site/bioimagingmag/

1．本誌は、本学会の高い学際性に基づき、バイオイメージング及び関連領域に関する、広範な専門分野の研究者や 学生が理解しやすい和文の原著論文、総説、解説等を掲載する。 また、会員が所属する研究室や研究機関の紹介記事等を掲載する。論文等は、編集委員と当該分野の専門家が審査を行い、編集委員会が採否を決定する。本誌に掲載された著作物の著作権は、日本バイオイメージング学会に帰属することを前提とする。

2．他の雑誌・書籍等にすでに掲載された内容を含む原稿や、他の雑誌等に投稿中の原稿は、原著論文として投稿 できない。 総説、解説等において、図・表・文章など出版済みの内容を転載する場合は、投稿前に著作権所持者の許可を取ること。これらの規定に反した場合、また、データの捏造や他の著作物からの盗用など、科学的ないし社会的倫理に反する行為が判明した場合には、編集委員会は掲載決定後あるいは掲載後においてもその原稿の掲載取り消しを行うことができる。

3．投稿原稿の体裁は次のとおりとする。

(1) テキストは原則として MS-Word 形式のファイルとする。

(2) 原稿の最初に、表題、著者氏名、所属先、電子メールアドレスを記載する。

(3) A4 版で 6 ページ以内を標準とする。原則として和文フォントは MS 明朝、英文は Times New Roman または Times。余白：上下 25 mm、左右 20 mm、タイトル･著者氏名･所属･要旨は全段、本文は 2 段組として、40 行/ページ、行送り 17.5pt。タイトルは 12 ポイント、執筆者氏名･所属･本文は 9 ポイント。図表等は、必要に応じて 2 段組にせず、全段で掲載することも可能。図･写真･表･図の説明文は、ファイル本文中の希望箇所に挿入する。

4．投稿にあたっては、投稿原稿のファイル(MS-Word 形式と pdf 形式の双方; 図、写真の元データファイル(300 dpi 以上の解像度)を含む)を日本バイオイメージング学会「バイオイメージング」編集長宛に、電子データとして送付する。

5．校正は、著者の責任において行う。

6．著者の希望によりカラー印刷する場合の別途費用は、著者負担とする。別刷を 50 部単位で購入することができる。

原稿投稿先：

〒278-8510　千葉県野田市山崎 2641
東京理科大学理工学部応用生物科学科
「バイオイメージング」編集委員長 朽津 和幸
E-mail: kuchitsu@rs.noda.tus.ac.jp; FAX: 04-7123-9767

「バイオイメージング」編集委員会

○朽津 和幸（東京理科大学理工学部応用生物科学科/イメージングフロンティアセンター）
池水 信二（熊本大学大学院生命科学研究部）
菊地 和也（大阪大学大学院工学研究科生命先端工学専攻）
洲崎 悦子（就実大学薬学部）
古野 忠秀（愛知学院大学薬学部）
曽我 公平（東京理科大学基礎工学部材料工学科/イメージングフロンティアセンター)
桧垣 匠（東京大学大学院新領域創成科学研究科先端生命科学専攻)
（○：編集委員長）

バイオイメージング 第25巻第1号
2016年6月23日発行
発行所：日本バイオイメージング学会
〒113-0033 東京都文京区本郷7-3-1
東京大学大学院薬学系研究科生体分析化学教室内
電話: 03-5841-4760; FAX 03-5802-3339
E-mail: bioimage@nih.go.jp
URL: http://www0.nih.go.jp/niid/bioimaging/
https://sites.google.com/site/bioimagingmag/

目　次

表紙の図（第24回学術集会ベストイメージング賞受賞）
「超微小粒子の胎児期曝露に伴う脳血管周辺異常の赤外顕微法による可視化」
……小野田淳人・川﨑平康・築山光一・武田　健・梅澤雅和 … 1

2016年度 第25回日本バイオイメージング学会学術集会のお知らせ
……加藤晃一 … 2

2015年度 第25回日本バイオイメージング学会学術集会・公開講座を終えて
……朽津和幸 … 5

論　文

生命科学分野の細分化と再編成：バイオイメージングのこれから
～第24回学術集会シンポジウム「NO DIVISION, NO LIFE.
～動物と植物の細胞分裂イメージング最前線～」を終えて～
……桧垣　匠・岡部弘基 … 7

特集「第２の生体の窓～ 21世紀のバイオイメージングの窓～」

SBWイメージングの現状と課題
……曽我公平 … 9

NIR-II 波長域を用いたマウス *in vivo* 蛍光イメージングの可能性
……竹内　司・大谷敬亨・上村真生 … 11

希土類ナノ粒子OTN近赤外蛍光プローブによる
マウス *in vivo* イメージングの応用
……岸本英博・福田啓介・竹下寛之・曽我公平 … 16

「第２の生体の窓」におけるカーボンナノチューブの発光
……岡﨑俊也 … 19

動物体内におけるナノ粒子の未知なる動態メカニズムと
検出技術改善のニーズ
……梅澤雅和・新海雄介・小野田淳人・武田　健・上村真生・曽我公平 … 22

特集「感染症を見る」

オーバービュー：「感染症を見る」を開催するにあたって
……鈴木和男 … 28

最小イオンチャネルHv1/VSOPによる貪食細胞の活性酸素産生の多重制御
……岡村康司・大河内善史・荒谷康昭・Hibret A. Adissu・鈴木和男 … 29

トリインフルエンザH5N1を高病原性化する
Non-structural protein 1における変異のタンパク質分子機構
……加藤有介・福井　清・鈴木和男 … 30

植物の感染防御応答の制御と細胞内の膜動態
……朽津和幸・大滝　幹・羽山大介・北畑信隆・
花俣　繁・来須孝光・上田貴志 … 31

蛍光イメージングによる神経細胞内マグネシウムイオン動態の解析
……新藤　豊・山中　龍・鈴木孝治・岡浩太郎 … 32

「バイオイメージング」投稿のお誘い …… 38