



金 沢 大 学 十全医学会総会・学術集会

期日 2009年7月25日(土)
会場 金沢大学医学部記念館

12:30~12:55 十全医学会総会

- I. 会長挨拶
II. 庶務報告 平成20-21年 事業計画および報告
III. 会計報告 1. 平成20年 決算報告 2. 平成21年 予算計画
IV. 編集報告

12:55~13:30 第5回 十全医学賞受賞式および記念講演

「原発性免疫不全症における遺伝子変異のreversion(復帰)」
金沢大学医薬保健研究域医学類 小児科 講師 和田 泰三

学術集会テーマ「分子イメージング」

13:30~14:20 (講演+討論) 担当: バイオトレーサー診療学(核医学)教授 絹谷 晴剛

「分子イメージングの臨床: 脳・循環器疾患への応用」
(財)先端医学薬学研究センター 臨床研究開発部 部長 松成 一朗

14:20~15:20 (講演+討論) 担当: バイオトレーサー診療学(核医学)教授 絹谷 晴剛

「腫瘍の分子イメージング —放医研での研究を中心に—」
放射線医学総合研究所分子イメージング研究センター
分子病態イメージング研究グループリーダー 佐賀 恒夫

15:20~15:35 コーヒーブレイク

15:35~16:35 (講演+討論) 担当: 脳老化・神経病態学(神経内科学)教授 山田 正仁

「脳神経伝達機能の分子イメージング」
放射線医学総合研究所 脳病態研究チームリーダー 伊藤 浩

16:35~17:35 (講演+討論) 担当: 分子神経科学・統合生理学(生理学第二)教授 櫻井 武

「多光子励起顕微鏡法による細胞機能の分子イメージング」
自然科学研究機構生理学研究所 脳機能計測・支援センター
多光子顕微鏡室 准教授 根本 知己

- ◆大学院医学系研究科(博士課程):十全医学賞記念講演および学術集会「分子イメージング」は、up-to-dateコース(専攻共通)セミナーとなります。
- ◆医師:「石川県医師会生涯教育研修会」として認定されております。

和田泰三：原発性免疫不全症における遺伝子変異の reversion (復帰)

遺伝子変異の reversion (復帰) とは、ある疾患の原因遺伝子において、遺伝子変異が正常の配列に戻るか、あるいは遺伝子変異を代償するような第二変異が起こることである。このような reversion が体細胞の一部に起こると、もとの異常細胞とのモザイクの状態となる (somatic revertant mosaicism)。原発性免疫不全症において reversion が起こった際には、機能を回復した細胞 (revertant) がもとの異常細胞に対して増殖優位性を持つ可能性があり、原因遺伝子産物の生体内での機能の解明に役立つほか、revertant による臨床症状の改善が期待され「自然の遺伝子治療」としても注目されている。我々は、稀な現象と考えられてきた reversion に関して以下のことを明らかにしてきた。



1. Wiskott-Aldrich 症候群 (WAS)

WAS は、血小板減少、湿疹、易感染性を三主徴とする疾患で、WASP 蛋白 (WASP) 遺伝子の異常による。我々は、reversion を有する WAS 患者を、兄弟例を含めて数多く見出し、1) WASP⁺ T 細胞は WASP⁻ T 細胞に対して増殖優位性を有すること、2) 加齢により revertant が増加すること、3) 臨床像へ与える影響は劇的な改善から不変な例まで多様であること、4) 繰返し配列やヘアピン構造の寄与した DNA slippage が機序として重要であること、5) WASP の増殖優位性は T 細胞と B 細胞では全く異なることなどを明らかにした。これらの報告は WAS において reversion が予想以上に起きている可能性を示唆しており、実際、2006年に欧州免疫不全学会が行った調査では、我々の例を含め、WAS 患者 272 例中 30 例 (11%) に reversion を認め、その頻度は決して少なくないことが明らかにされた。

2. Omenn 症候群

リンパ球抗原受容体遺伝子再構成を担う重要な酵素である RAG の異常症では、RAG 機能が完全に欠如すると成熟 T、B 細胞を欠く重症複合免疫不全 (T⁻B⁻ SCID) となり、一部残存すると異常

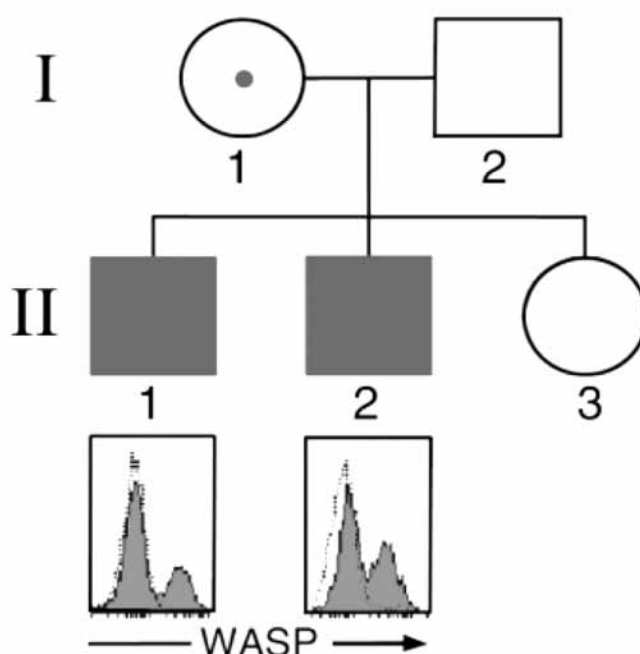


図 Reversion を認めた WAS 兄弟例 (J Clin Invest 2003;111(9), In This Issue より)

T細胞クローンの選択的増加に起因した紅皮症などを特徴とする Omenn 症候群となる。我々は、もとの RAG1 遺伝子変異を代償する複数の第二変異により RAG1 機能の部分的な回復が生じ、T・B・SCID ではなく、Omenn 症候群の像を呈した乳児例を初めて見出した。本報告により、reversion は臨床表現型を修飾する因子として非常に重要であること、また異なる revertant が複数個認められており reversion は同一患者で複数回起こり得ることが示された。

3. 白血球接着異常症 1 型 (LAD1)

重症細菌感染症、白血球増多、創傷治癒遅延を特徴とする LAD1 は、白血球上の α 2 インテグリン (CD18) の欠損による。我々は、LAD1 男児例において、 $CD8^+$ T細胞の 1.5% に reversion による $CD18^+$ 細胞の出現を検出した。同細胞は、T細胞レセプター V α 22 を有するシングルクローンで、メモリー/エフェクターの表面マーカーを有していた。顆粒球系には reversion は起こっておらず、臨床症状の改善は認められなかった。本報告により、reversion は progenitor レベルだけではなくある程度成熟した細胞でも起こり得ること、 $CD18^+$ T細胞は $CD18^-$ T細胞に対して増殖優位性を有すること、臨床症状の改善や修飾には revertant の種類や量が重要であることなどが示された。

4. X連鎖重症複合免疫不全症 (XSCID)

XSCID は、サイトカインレセプターである γ c鎖の異常に起因し、TやNK細胞の発生が障害され、T・B⁺NK⁻ SCID の表現型となる。我々は、自己T、NK細胞が出現しているばかりか、Omenn 症候群様の症状も呈した特異な XSCID 男児例を見出した。患児T細胞の一部には第二変異が認められ、もとの *IL2RG* 遺伝子のスプライス変異を完全に代償していた。このような revertant は末梢血中には検出されず、主に皮膚にて認められ、皮膚病変と関連していると考えられた。本例により、XSCID の臨床スペクトラムは幅広く、また reversion は非典型的な病態を引き起こす因子として重要であることが示された。

以上のように、原発性免疫不全症における遺伝子変異の reversion は、従来考えられていたよりも高頻度で起こっている可能性があり、また臨床像を修飾する因子として重要であることが判明した。

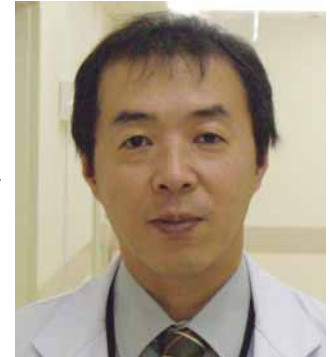
参考文献

1. Wada T, Candotti F. Somatic mosaicism in primary immune deficiencies. *Curr Opin Allergy Clin Immunol* 8:510-514, 2008
2. Wada T, et al. Somatic mosaicism in Wiskott-Aldrich syndrome suggests in vivo reversion by a DNA slippage mechanism. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98:8697-8702, 2001
3. Wada T, et al. Second-site mutation in the Wiskott-Aldrich syndrome (WAS) protein gene causes somatic mosaicism in two WAS siblings. *J Clin Invest* 111:1389-1397, 2003
4. Wada T, et al. Oligoclonal expansion of T lymphocytes with multiple second-site mutations leads to Omenn syndrome in a patient with RAG1-deficient severe combined immunodeficiency. *Blood* 106:2099-2101, 2005
5. Wada T, et al. Detection of T lymphocytes with a second-site mutation in skin lesions of atypical X-linked severe combined immunodeficiency mimicking Omenn syndrome. *Blood* 112:1872-1875, 2008

松成一朗

講演要旨

分子イメージングの臨床：脳・循環器疾患への応用



近年画像診断技術の進歩には驚くべきものがあり、特に分子プロセスを標的とした分子イメージングが医学・薬学領域で注目されている。今回、分子イメージングの脳・循環器疾患への臨床応用について概説する。

1. 脳疾患への応用

・脳ブドウ糖代謝イメージング

これからの高齢化社会において、認知症は老後の最大の心配事の一つである。今後、どんなに素晴らしい治療法が開発されたとしても、脳が大きなダメージを受けてしまったからではその効果にも限界があり、したがって出来るだけ早い時期に適切な診断をして治療を開始する必要があると思われる。その診断指標として期待されているのがPETやMRIなどの画像バイオマーカーである。特に脳におけるFDG集積は、シナプスの活動性を反映するとされており、アルツハイマー病など脳変性疾患における変化を鋭敏に捉える手法として期待されている。我々は日本人脳における脳機能データベースを構築し、これをベースとしてアルツハイマー病などの脳変性疾患の早期診断法の確立を目指して、2002年より金沢大学医薬保健研究域医学系、脳老化・神経病態学(神経内科学：山田正仁教授)と共同で石川ブレインイメージング研究を開始し、これまで950名以上のボランティアおよび280名以上の認知症疑い患者のFDG PET、MRI 画像データを蓄積してきた。その結果、アルツハイマー病の早期より萎縮が生じるとされる海馬でのブドウ糖代謝は低下していないこと(1)、若年者においてはMRIよりもFDG PETの方がより鋭敏に病変を検出できること(2)などを見出してきた。

・脳アミロイドイメージング

アルツハイマー病の病理学的特徴としては、まずアミロイド 蛋白の脳内蓄積、タウ蛋白の蓄積による神経原繊維変化が代表的である。特にアミロイド蛋白の蓄積はアルツハイマー病発症の10-15年前から起こるとされている。最近、このアミロイド蛋白をPETを用いて可視化するトレーサーが開発されており、注目を集めている。特にC-11 Pibによるアミロイドイメージングは世界

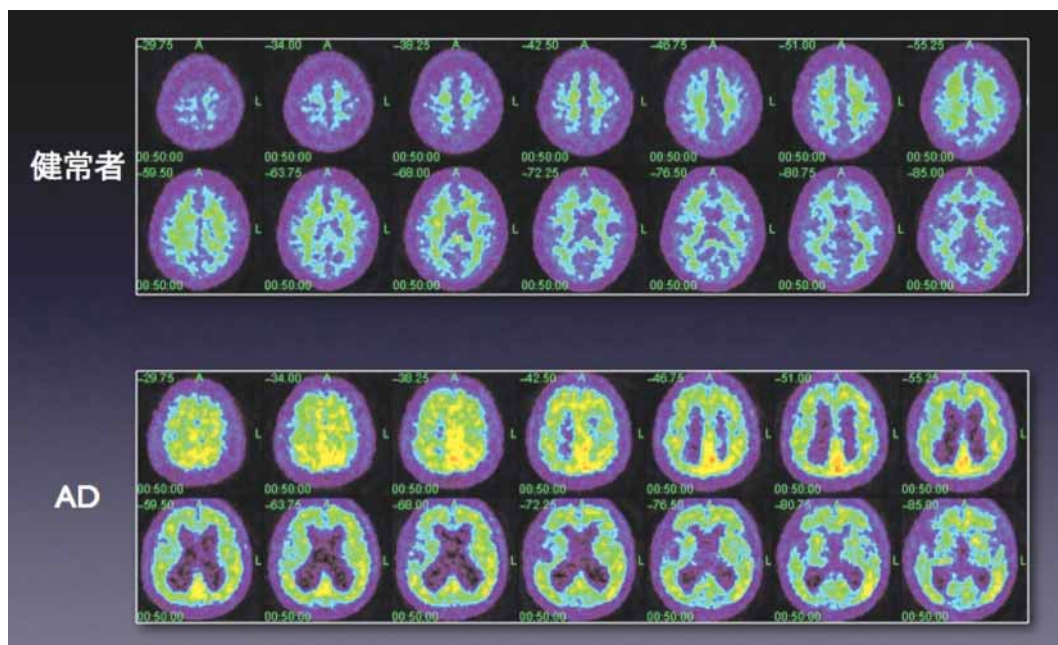


図 健常者(上段)およびアルツハイマー病(AD：下段)患者のC-11 Pib PET画像(50-70分後像)

的に臨床研究に使われている(3)。我々の検討でも、アルツハイマー病では後部帯状回など灰白質に著明なC-11 Pib集積を認め、健常者とは明らかに異なる様相を呈した(図)。しかしC-11 Pib集積は、必ずしも病的なアミロイドプラークに特異的ではないことも報告され始めており、したがって画像データの解釈は慎重に行う必要があることに注意すべきである。

2. 心疾患への応用

心不全は、医学の進歩にもかかわらず諸国における主要な死因の一つであり、その悪化因子の一つとして交感神経系が係わっていることが知られている。ノルエピネフリンのアナログであるC-11 Hydroxyephedrine(HED)は、心筋における交感神経を特異的に画像化する分子イメージングトレーサーである(4)。我々の心不全症例での検討では、心筋へのHED集積量は心不全の重症度の指標と相関していた。一方、心筋からのHED消失率は全身交感神経の活動性の指標である血中ノルエピネフリンと相関を認め、これらの指標を組み合わせることにより、複雑な病態を示す心不全の本質に迫ることが期待される。

文献

1. Samuraki M, Matsunari I, Chen WP, et al. Partial volume effect-corrected FDG PET and grey matter volume loss in patients with mild Alzheimer's disease. *Eur J Nucl Med Mol Imaging*. Oct 2007;34(10):1658-1669.
2. Matsunari I, Samuraki M, Chen WP, et al. Comparison of 18F-FDG PET and Optimized Voxel-Based Morphometry for Detection of Alzheimer's Disease: Aging Effect on Diagnostic Performance. *J Nucl Med*. Nov 15 2007;48(12):1961-1970.
3. Klunk WE, Engler H, Nordberg A, et al. Imaging brain amyloid in Alzheimer's disease with Pittsburgh Compound-B. *Ann Neurol*. Mar 2004;55(3):306-319.
4. Nomura Y, Matsunari I, Takamatsu H, et al. Quantitation of cardiac sympathetic innervation in rabbits using 11C-hydroxyephedrine PET: relation to 123I-MIBG uptake. *Eur J Nucl Med Mol Imaging*. Aug 2006;33(8):871-878.

佐賀恒夫

講演要旨

腫瘍の分子イメージング - 放医研での研究を中心に -



分子イメージングとは、「分子レベル・細胞レベルで起こっている現象の空間的・時間的分布を、生きている動物やヒトそのままの状態でも可視化し、定量評価する技術」と定義される。この定義を悪性腫瘍にあてはめると、「細胞ががん化し進行する過程で獲得した様々な特性をイメージングで評価する技術」となり、現在PETを中心に行われている腫瘍の代謝・機能イメージングがその代表と考えられる。放医研においては、平成17年11月に分子イメージング研究センターが発足し、これに伴って平成18年4月より、分子病態イメージング研究グループが腫瘍イメージング研究を開始した。本講演では、これまでの3年強にわたる我々の研究グループでの研究成果を中心に、腫瘍の分子イメージング研究の現状について解説する。

腫瘍イメージング研究は、標的分子の探索・機能解析に始まり、その標的を特異的に検出するための分子プローブの開発、さらにモデル動物でのプローブの評価・改良をへて臨床での評価・実証へとつながっていく。一つの研究グループのみで完結するものではなく、所内外の基礎研究部門、臨床部門との連携のもとで、研究を推進している。

標的分子探索においては、現在大きな社会的問題となっているアスベスト中皮腫を主たる対象として研究を進めている。その中で、正常中皮細胞をアスベストにばく露すると、フェリチン重鎖蛋白の発現が亢進し、これによりアスベストばく露により引き起こされるアポトーシスに抵抗性になることがわかった。これにより、細胞が死ぬことなくさらにばく露を受け続け、発がんに至る可能性が示唆された。また、siRNAを用いた中皮腫細胞の遺伝子発現解析により、siRNAによる遺伝子発現の抑制により中皮腫細胞の増殖抑制をきたす遺伝子が多く発見され、そのうちのいくつかはアポトーシス抑制遺伝子であることがわかった。その中の一つの遺伝子に関して、治療への応用を目指した検討が進行中である。

プローブ開発においては、現在抗体・ペプチドを中心とする研究を重点的に進めている。現在、分子標的医薬品としていくつかの抗腫瘍抗体が臨床に用いられている。抗体治療が奏功するため

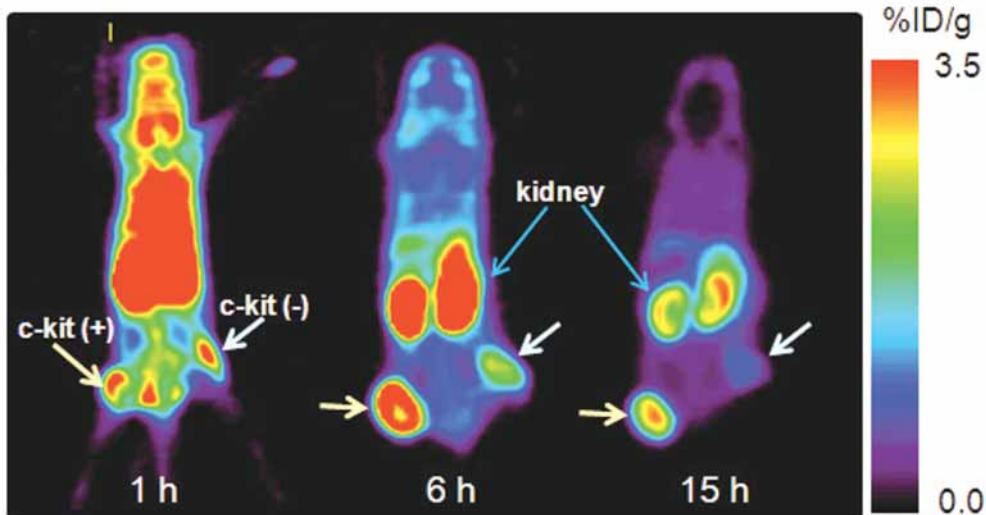


図1 ^{64}Cu 標識抗c-kit Fabによる担癌マウスのPETイメージング

投与1時間後では、血流を反映して、抗原陽性腫瘍と陰性腫瘍の間で集積に差を認めないが、投与6時間後から陽性腫瘍が明瞭に描出されている。腎への高い生理的集積を認めている。

には、治療対象の腫瘍が標的抗原を高発現していることが必須であるが、生検組織での評価では、抗原発現の不均一性の問題を克服できない。抗体イメージングにより、原発巣・転移巣を含む全身の評価が可能になれば、治療の奏功する患者の適正な選択に貢献できると期待される。現在、EGFR、Her-2やc-kit、中皮腫マーカーである mesothelinなどを標的とする抗体イメージングの検討を行っており、感度・定量性に優れるPETイメージングへの応用に向けて、低分子量抗体(Fab)と中半減期ポジトロン核種(Cu-64、半減期13時間)を用いた検討をスタートしたところである(図1)。また、Y-90などの細胞障害性のアイソトープで標識した抗体による内照射療法への応用も重要な課題である。また、がんの増殖・浸潤・転移形成に深く関連する腫瘍内の血管新生を標的にしたRGDペプチドによるPETイメージングの検討も進んでいる。

様々な疾患モデルは、新規プローブの評価のみならず、既存のプローブを用いた疾患の病態解明や新規治療薬評価にも有用である。我々は、中皮腫モデル(上皮型・肉腫型)を用いて糖代謝プローブ・核酸代謝プローブの腫瘍集積性を比較して、組織型により適したプローブが異なる可能性を示した。また、ラットの肝移植モデルでの検討により、FDG-PETにより急性拒絶の評価のみならず免疫抑制治療の効果判定も可能であることがわかった。

腫瘍PETプローブの臨床研究では、放医研で以前から行われていたアミノ酸プローブのメチオニン(¹¹C-methionine)に加えて、細胞増殖イメージングとして注目されているフルオロチミジン(¹⁸F-FLT)、治療抵抗性の原因として臨床的に重要な腫瘍内低酸素をイメージングするプローブ(Cu-ATSM, ¹⁸F-FAZA)を用いたPETの検討を行っている。重粒子医科学センター病院で行われている重粒子線治療患者(肺がん)を対象とした検討では、治療前のFLT腫瘍集積と予後(再発・転移)が相関することが明らかとなり、一つの予後因子と考えられる。また、FLT-PETが放射線照射領域の骨髄の活性を非常に鋭敏に評価できることもわかった。低酸素イメージングにおいては、重粒子医科学センター病院および外部医療機関との共同研究として、低酸素プローブの腫瘍集積性と重粒子線や放射線治療効果との関係性を評価する臨床研究が進行中である。

腫瘍イメージング研究を開始して3年が経過し、ある程度の成果が上がってきた。今後も、所内外の研究施設との連携を進め、臨床に貢献するイメージング法の開発を目標に、鋭意研究を進めている。

参考文献

1. Saga T, Kawashima H, Araki N, Takahashi JA, Nakashima Y, Higashi T, Oya N, Mukai T, Hojo M, Nobuo Hashimoto N, Manabe T, Hiraoka M, Togashi K. Evaluation of primary brain tumors with FLT-PET: usefulness and limitation. *Clin Nucl Med* 2006;31:774-80.
2. Aung W, Hasegawa S, Furukawa T, Saga T. Potential role of ferritin heavy chain in oxidative stress and apoptosis in human mesothelial and mesothelioma cells: implications for asbestos-induced oncogenesis. *Carcinogenesis* 2007;28:2047-52.
3. Koizumi M, Saga T, Yoshikawa K, Suzuki K, Yamada S, Hasebe M, Ohashi S, Abd-Elrazek S, Ishikawa H, Sagou K, Tamura K, Hara R, Kato H, Yasuda S, Yanagi T, Tsujii H. ¹¹C-Methionine-PET for Evaluation of Carbon Ion Radiotherapy in Patients with Pelvic Recurrence of Rectal Cancer. *Mol Imaging Biol* 2008;10:374-80.
4. Tsuji AB, Morita M, Li XK, Sogawa C, Sudo H, Sugyo A, Fujino M, Sugioka A, Koizumi M, Saga T. ¹⁸F-FDG PET for Semiquantitative Evaluation of Acute Allograft Rejection and Immunosuppressive Therapy Efficacy in Rat Models of Liver Transplantation. *J Nucl Med* 2009 (in press)
5. Tsuji AB, Sogawa C, Sugyo A, Sudo H, Toyohara J, Koizumi M, Abe M, Hino O, Harada Y, Furukawa T, Suzuki K, Saga T. Comparison of conventional and novel PET tracers for imaging mesothelioma in nude mice with subcutaneous and intrapleural xenografts. *Nucl Med Biol* 2009 (in press)

伊藤 浩

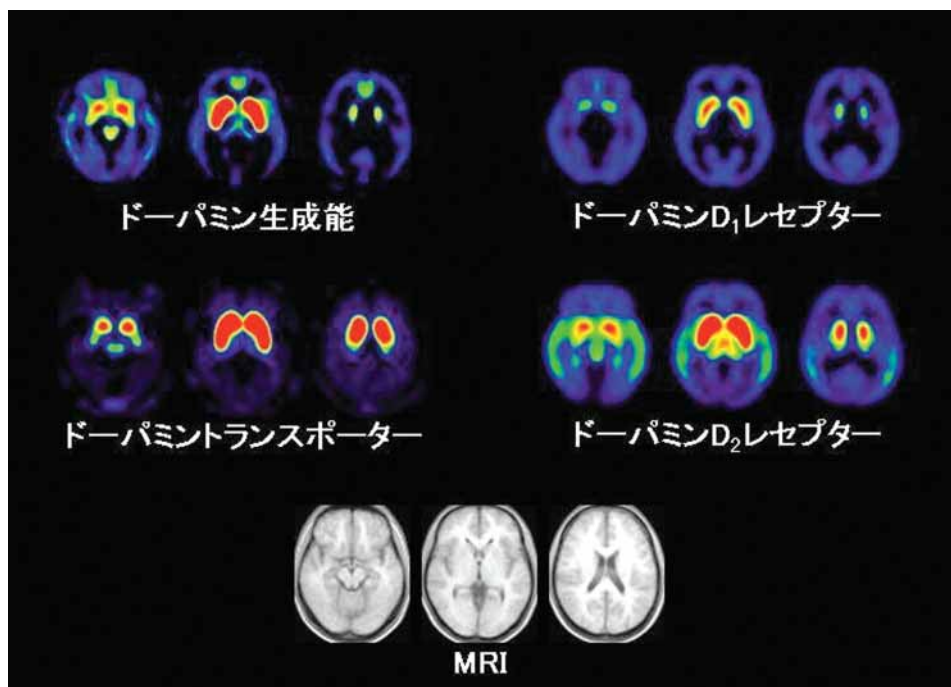
講演要旨

脳神経伝達機能の分子イメージング



核医学におけるモダリティの一つであるPET (positron emission tomography) により測定できる生理学的な脳機能パラメータとしては、脳血流量や脳酸素消費量、脳ブドウ糖代謝などの脳循環・エネルギー代謝に関するもの、脳アミノ酸代謝に関するもの、さらに神経受容体などの脳神経伝達機能に関するものや脳内のミクログリア活性、アミロイド沈着などがある。これらの脳機能パラメータ測定の中でも、脳神経伝達機能に代表されるような生体内の蛋白質などの分子の挙動を観察する手法は「分子イメージング」とも呼ばれ、PETはMRIなどと共に分子イメージングの代表的なツールとなっている。我々の施設では精神・神経疾患を対象に、その病態に関する分子イメージング研究を行っているが、本講演では、PETによるドーパミン作動性神経系の脳神経伝達機能の測定に焦点を当て、その正常データベース構築からドーパミン作動性神経系が病態に關与する疾患の病態解析、薬物治療効果の評価に関する研究について紹介する。

脳神経伝達機能は前シナプスと後シナプスの機能に大別され、前シナプス機能については主に神経伝達物質生成やトランスポーター、後シナプス機能についてはレセプターについての評価がPETで可能である。レセプターやトランスポーターについてはその分布密度(B_{max})とトレーサーの解離定数(K_D)の比である結合能(binding potential, B_{max}/K_D)を測定し、神経伝達物質生成についてはその生成速度定数を測定する。我々の施設ではドーパミン作動性神経系の前シナプス機能については、ドーパミン生成の速度定数をトレーサーとして $[^{11}C]DOPA$ を用いて測定し、ドーパミントランスポーターの結合能を $[^{11}C]PE2I$ を用いて測定している。また、後シナプス機能については、ドーパミン D_1 レセプターの結合能を $[^{11}C]SCH23390$ を用いて測定し、ドーパミン D_2 レセプターの結合能を $[^{11}C]raclopride$ および $[^{11}C]FLB457$ を用いて測定しており、ドーパミン作動性神経系に關



してはシナプス前後の機能を併せて測定することが可能である。MRIによる脳形態画像やPET、SPECTによる脳血流画像については解剖学的標準化の手法を用いて正常画像データベースが構築され、脳神経疾患における画素単位での統計学的な病態変化の検出に用いられているが、PETによる脳神経伝達機能の正常画像データベースの構築もこの手法を用いて可能である。我々はドーパミン系神経伝達機能を対象に正常画像データベースの構築を行ったが¹⁾、これにより、従来ヒト死後脳で検討されてきたドーパミン作動性神経系の前シナプス機能および後シナプス機能の解剖学的分布がヒト生体においても明らかとなった。

統合失調症はドーパミン作動性神経系が病態に関与する疾患の代表的なものであり、生涯発病率が1%弱とまれな病気ではなく、精神科疾患の主要なものの一つである。統合失調症の原因として「ドーパミン仮説」が提唱されているが、これは、統合失調症の治療薬である抗精神病薬がドーパミンD₂レセプターの遮断作用を有することや、アンフェタミンなどのシナプス間隙のドーパミン濃度を上昇させる薬物が、統合失調症の陽性症状に類似した精神症状を引き起こすことから支持されている仮説である。我々はこの仮説を検証するべく、統合失調症患者における前シナプス機能であるドーパミン生成能の測定を行い、線条体におけるドーパミン生成能が患者群で有意に上昇していることや、視床におけるドーパミン生成能が臨床症状のスコアと有意に相関していることなどが判明した²⁾。また、同じく前シナプス機能であるドーパミントランスポーターの結合能の測定も統合失調症患者において行ったが、視床におけるドーパミントランスポーターの結合能が患者群で有意に上昇していることも判明し、統合失調症におけるドーパミン作動性神経系前シナプス機能の亢進の可能性が示唆された。

統合失調症の治療に用いられる抗精神病薬は、ドーパミンD₂レセプターの遮断作用を有し、ハロペリドールなどの第1世代抗精神病薬と、リスペリドンやオランザピンなどの第2世代抗精神病薬がある。抗精神病薬によるドーパミンD₂レセプターの遮断作用を、PETによる測定からレセプターの占有率という指標を計算して客観的に評価する試みが以前よりなされており、統合失調症の急性期においてはおよそ70%以上の占有率で治療効果が得られ、80%以上の占有率で副作用である錐体外路症状が出現することが知られている³⁾。したがって、70%以上かつ80%以下の占有率が得られる臨床用量がその抗精神病薬の至適用量となる。近年我々は、第2世代抗精神病薬の一つであるパリペリドンについて、その臨床試験段階でPETによるドーパミンD₂レセプター占有率の測定を行い、その至適用量を客観的に示した⁴⁾。PETの臨床試験への応用としては、マイクロドーズ試験への応用があるが、レセプターの占有率測定のような既存のPET用トレーサーを用いての新規治療薬の用量設定も重要な応用領域であり、今後のPETの新しい活用法として発展が期待される。

参考文献

1. Ito H, Takahashi H, Arakawa R, Takano H, Suhara T. Normal database of dopaminergic neurotransmission system in human brain measured by positron emission tomography. *Neuroimage*. 2008; 39: 555-565
2. Nozaki S, Kato M, Takano H, Ito H, Takahashi H, Arakawa R, Okumura M, Fujimura Y, Matsumoto R, Ota M, Takano A, Otsuka A, Yasuno F, Okubo Y, Kashima H, Suhara T. Regional dopamine synthesis in patients with schizophrenia using L-[¹⁴C]DOPA PET. *Schizophr Res* 2009, in press.
3. Farde L, Wiesel FA, Halldin C, Sedvall G. Central D₂-dopamine receptor occupancy in schizophrenic patients treated with antipsychotic drugs. *Arch Gen Psychiatry*. 1988; 45: 71-76.
4. Arakawa R, Ito H, Takano A, Takahashi H, Morimoto T, Sassa T, Ohta K, Kato M, Okubo Y, Suhara T. Dose-finding study of paliperidone ER based on striatal and extrastriatal dopamine D₂ receptor occupancy in patients with schizophrenia. *Psychopharmacology (Berl)* 2008; 197: 229-235.

根本知己

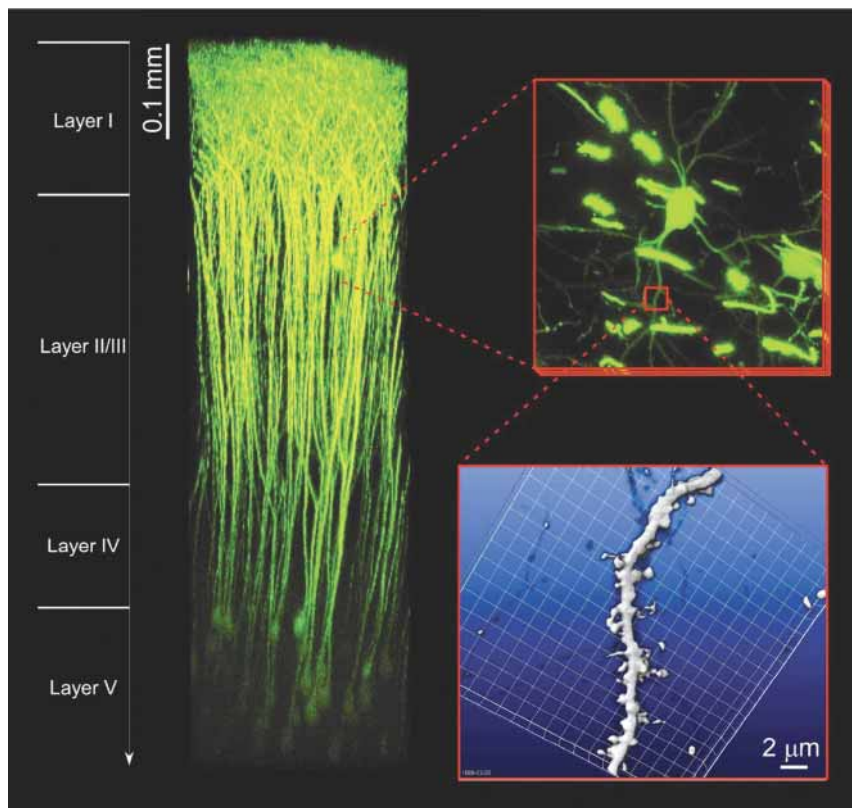
講演要旨

多光子励起顕微鏡法による細胞機能の分子イメージング



脳神経系の活動のみならず人体の生理機能は、細胞内の超分子複合体やシグナル分子のネットワークのダイナミックかつ秩序だった相互作用によって実現されている。従って、人体機能の統合的な理解のためには、生きた状態を保ったまま、それら相互作用ネットワークをありのまま捉えなければならない。即ち、複数個の構成因子の挙動を定量的に、時間的・空間的分布として取得することが必須である。光学的な測定方法は、「生きた」対象内部で、多数の因子を同時に高い時空間分解能で計測することが可能である。また、蛍光過程を用いた生組織における細胞、分子の標識技術は、昨年のノーベル化学賞の例を見るまでもなく、極めて有用である。さらに、最近では発展の著しいレーザーや光半導体の技術などに基づく、新しい顕微鏡法が、いままではだれも観察することのできなかつた事象を明らかにしている。多光子励起を用いた蛍光顕微鏡法（2光子顕微鏡）は細胞機能の可視化解析に最適なものの1つであり、生命科学、特に神経科学の領域で広く使われている。なぜならば、その低侵襲性のため、インタクトな組織的標本の深部断層を長時間にわたって高い空間分解能で観察することができるためである。

多光子励起過程は1931年という量子力学の黎明期に、後にノーベル物理学賞を受賞する Maria Göppert-Mayer によって既に理論的に予言されていた。しかし、その生物分野への応用には、超短光パルスレーザーの誕生と1990年のWebbのグループの報告を待たねばならなかった。第一電子励起状態への励起が複数個の光子の同時吸収による多光子励起過程は量子力学的に極めて実現



図：生きているマウス的大脑皮質のEYFP発現神経細胞群の3次元再構築

される確率の低い過程である。この確率が極めて低いことにより蛍光の発生がレンズの焦点に局限され、断層イメージングが可能となる。この過程の物理化学的特徴から、2光子顕微鏡には、深部到達性・低障害性、自己遮蔽効果の回避・褪色の補償、多彩かつ厳密な同時多重染色イメージング、紫外励起共焦点顕微鏡、局所的化学反応の誘起というような性質がもたらされている。このうち、深部到達性・低障害性は最も重要な特徴であるが、励起光が近赤外の領域にあり、生体組織に対して低吸収、低散乱であるためである。さらに、このことは標本に対する侵襲性が低いことをも意味し、長時間に渡って安定的な蛍光観察を可能としている。

我々は最近、深部到達性・低障害性を最大限に利用した、個体用“in vivo”2光子顕微鏡システムを構築した。これにより麻酔下のマウス個体の大脳皮質深部の神経細胞のイメージングに成功した(図)[1]。現在、皮質表面から0.9 mm以上の深部で神経細胞を観察することが可能であり、世界で最も優れたものの一つである。特に、我々のシステムは、新たな光学系を設計し、他グループの1/10程度のレーザー照射量で実現しており、極めて侵襲性が低い。さらに、樹状突起スパインや軸索終末の構造を高い空間分解能で観察が可能であり、第V層のsomatic dendriteのin vivoイメージングに世界でさきがけて成功した。これは大脳皮質に立体的に広く枝を張る神経細胞の全体像を生きた動物個体中で捕らえることができたということの意味するのみならず、長期間にわたり一個体中で生じる神経細胞ネットワークの変化を追跡することを可能になる方法論を手にしたことをも意味する。ある光学顕微鏡メーカーからは、このような高い深部到達性と分解能を両立できたのは、世界で唯一であるとの評価を受けた。この個体用in vivo2光子顕微鏡により、神経細胞やグリア細胞のみならず、皮膚組織、免疫組織、骨組織等への適用に成功している。

また、多彩かつ厳密な同時多重染色イメージングは、吸収スペクトルの重なりが少なく同時に1光子励起が困難な複数の色素も、2光子励起では同時に励起可能になることによる。これは2光子励起スペクトルが理論的に予想されるよりも広がっているためである。従って、2光子顕微鏡は断層化のためは共焦点ピンホールを用いていないため、原理的にほとんど色収差、視差の無い同時多重断層イメージングが可能になる。この特徴は、培養細胞など薄い標本でも有効であり、2光子顕微鏡の最も重要な特徴のひとつである。さらに紫外励起共焦点顕微鏡という特徴を加味すれば、例えば、最もスタンダードなCa²⁺指示薬であるUV励起のfura-2と他の蛍光色素の同時観察が可能であるので、Ca²⁺依存性細胞機能の解析に強力なツールになる。我々はCa²⁺依存性開口放出の単一事象の可視化に成功し、様々な分泌組織で「逐次開口放出」の存在を初めて実証した[1-3]。また我々はケージド試薬をフェムトリットル以下の体積で光活性し()、細胞膜上のチャネル・受容体の機能マッピングする方法論を確立し、グルタミン酸受容体の分布とスパイン形態の関係を明らかにすることに成功している[4]。

今後は、光技術や遺伝子工学との技術交流から新たな方向論の展開が期待される。実際、我々は新規蛍光タンパク質[5]の利用やベクトルベームと言った新しいレーザー光を用いた光ナノ・イメージングへの展開を図っている。以上のように、2光子顕微鏡は広汎な生命科学分野で広く使われていくことになるだろう。尚、様々なご指導ご支援をいただきました鍋倉淳一教授(生理研)、岡田泰伸教授(生理研所長)、河西春郎教授(東大医)及び共同研究者の方々には、この場をかりて心より感謝の意を表したく存じます。

参考文献

1. Nemoto, T.: *Mol Cells*, 26, 113-120 (2008)
2. Nemoto, T., et al.: *Nature Cell Biol.*, 3, 253-258 (2001).
3. Takahashi, N., et al.: *Science*, 297, 1349-52 (2002) ,
4. Matsuzaki, M., et al.: *Nature Neurosci*, 4, 1086-92 (2001).
5. Tomosugi, W., et al: *Nature Method* (2009) 印刷中.

