

## 資料

ライフサイエンスのためのアイソトープ測定機器(第五シリーズ)  
“ライフサイエンスにおけるイメージング”

### Ⅸ. イメージングにおける RI と蛍光の利点

古川高子, 金 朝暉

Reprinted from  
RADIOISOTOPES, Vol.58, No.7  
July 2009



Japan Radioisotope Association

<http://www.jrias.or.jp/>

## 資 料



## ライフサイエンスのためのアイソトープ測定機器 (第五シリーズ) “ライフサイエンスにおけるイメージング”

### IX. イメージングにおける RI と蛍光の利点

古川高子, 金 朝暉

独立行政法人 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

263-8555 千葉県千葉市稲毛区穴川 4-9-1

イメージングはこれまでも広い分野において有効な研究手段として用いられてきた。特に最近では“分子イメージング”が動物やヒトの体内で起こる事象を分子レベルで捉える研究方法として注目を集めている。分子イメージングでは多様なイメージング手段が目的に応じて用いられ、その機器・技術は急速な進歩を続けている。なかでも蛍光イメージングと PET, SPECT などの RI イメージングは魅力あるイメージング法である。蛍光イメージングは多様なイメージングプローブが利用でき、サブセルラーレベルの解像度も可能である。RI イメージング, 特に PET の定量性は他のイメージング法をはるかにしのぎ、また、ヒトでのイメージングが可能なのは大きな魅力である。本稿では蛍光と RI 二つのイメージング法を、その特徴を比較しながら紹介する。

Key Words : PET, SPECT, *in vivo* fluorescence imager, fluorescence microscopy

#### 1. はじめに

基礎から臨床医学に至るまで、生命科学の幅広い領域でイメージングは有用な研究ツールとして広く用いられている。特に近年、ポストゲノムの時代を迎え、生体の中で起こる様々な現象をその個体や組織を破壊することなく、あるがままの状態の中で捉えうる *in vivo* イメージングは生命現象を理解し解明するうえでの重要性が認識され“分子イメージング”という一つの研究分野として認知されるに至っている。分子イメージングは病気の診断や治療に直結する研究分野として基礎研究の成果を社会に還元するための translational research においても大きな役割を果たすと期待され、また、ヒトでの生体情報が直接得られる数少ない研究手法としても貴重である。分子イメージングは機器やイメージングプローブ(イメージング剤, 造影剤), 解析方法などの開発・改良とあいまって、現在急速な進展を遂げている。イメージングには

MRI や超音波をふくめ、様々な手法が用いられるが、なかでも、多様なイメージングプローブのデザインが可能な蛍光イメージングやヒトでのイメージングが可能な PET, SPECT などの RI イメージングへの関心は高い。イメージング法の進歩は急速であり、とても全体をカバーすることはできないが、本稿では *in vivo* イメージングを中心に、RI イメージングと蛍光イメージングについてそれぞれの特徴を比較しながら紹介する。

#### 2. RI イメージング・蛍光イメージングの基本的な特徴

RI イメージングでは、放射性同位元素 (RI) の原子核の崩壊に伴って放出される  $\beta$  線や  $\gamma$  線などの光子を、シンチレータなどを用いる検出器によって捉えることにより、RI の 2 次元又は 3 次元での分布を画像化する。原子核の崩壊する頻度や放出される光子のエネルギーは一定で原子の置かれた環境によって影響を受けな

い。また、PETやSPECTのイメージングに用いられる $\gamma$ 線やポジトロン崩壊に伴って生じる消滅放射線などの電磁波は生体組織による吸収や散乱が少ないため、PETやSPECTは*in vivo*イメージングにおいても定量性に優れたデータを与えうる。一方でRIが存在する限り、その化学形が変化しようとも、存在する環境が物理的・化学的に変化しようとも、光子は放出され続けるため、イメージングプローブの体内での代謝などの変化を識別することはできず、また構造の変化によって光子の放出をコントロールするようなプローブのデザインができないなどの制限が生じる。

蛍光色素や蛍光蛋白質などの蛍光物質は特定の波長域の光を受けるとそのエネルギーを吸収して励起状態になる。その後、一定の時間の間に吸収したエネルギーの一部を励起光より波長の長い蛍光として放出して基底状態に戻る(図1)。この蛍光を光電子増倍管やCCD(charged coupled device)カメラなどの検出器を用いて捉え、画像化するのが蛍光イメージングである。蛍光を発するか発しないか、光の強度が強いか弱いか、蛍光寿命が長いかわり短いかなどは、分子の立体構造や分子の置かれた環境に大きく依存する。また、励起光や蛍光は可視領域近辺の波

長を持ち、生体組織による吸収や散乱が大きい。吸収や散乱は波長とともに減少するため、*in vivo*の蛍光イメージングでは近赤外線領域の波長を持つ蛍光物質の利用が有利となる。更に、皮膚などの体組織の成分や消化管内の食物が蛍光を発するため、*in vivo*のイメージングではこれらが妨げとなって定量性の高いデータを得ることは難しい。一方で、構造や環境の変化によって蛍光が変化することは、イメージングプローブの受ける代謝や置かれた環境の変化を反映するプローブデザインが可能なることを意味し、多様なプローブ開発を可能にしている。

画像の取得や処理に時間がかかるRIイメージングに対し、蛍光イメージングではほぼreal timeでの画像取得が可能なること、また、異なった波長の蛍光物質を用いることにより、複数の蛍光物質の分布を同時に、それぞれ区別して画像化できることなどが利点として挙げられる。更に、*in vivo*でのイメージングの場合、蛍光イメージングに用いる機器はPET、SPECTに比較するとかなり安価であり、また操作も容易である。RIを取り扱う場合のように施設等に対する制約や、イメージング剤合成時に半減期を考慮する必要がなく、蛍光イメージングはRIイメージングに比べ導入が容易なイメージング

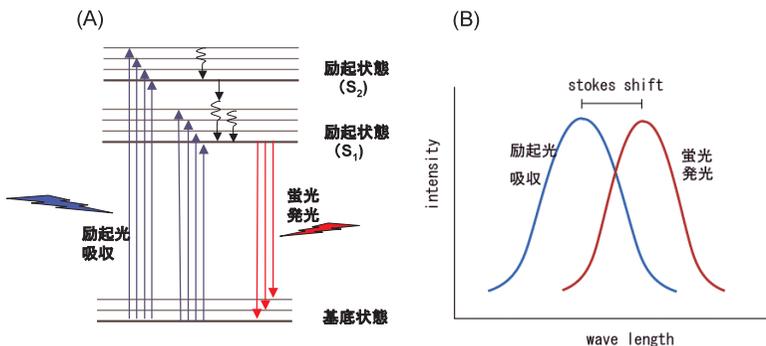


図1 蛍光物質による励起光エネルギーの吸収と蛍光発光

- (A) 蛍光物質は一定の波長域の励起光を吸収して励起状態となり、内部転換等で一部のエネルギーを失った後、残りのエネルギーを蛍光として発して基底状態に戻る。
- (B) 励起と蛍光は物質ごとに一定のスペクトルを持つ。励起はピーク付近で効率よく行われる。蛍光の波長は励起光より長く、ストークシフトと呼ばれる両者のピークの隔たりが大きい方が蛍光の検出に有利である。

法といえるであろう。

### 3. RI イメージング・蛍光イメージングの機器

#### 3.1 陽電子断層撮影法 (Positron Emission Tomography, PET)

陽子過剰の原子核より放出される陽電子 (ポジトロン) は運動エネルギーをほぼ失った状態で負電化を持つ電子と対消滅を起こし, 消滅放射線といわれる 511 keV のエネルギーを持つ一対の光子をほぼ 180 度の相対する方向に向けて発する。この光子を検出器で捉え, 同時に放出され, 180 度の方向に飛ぶ性質から, コンピューターによって線源の位置を計算し 3 次元的に再構成するのが PET である。

PET は *in vivo* のイメージング法のなかでひととき優れた定量性と感度を持つ。解像度は臨床用の PET では 4 ~ 5 mm 程度, 小動物用の PET では 1.3 ~ 1.5 mm 程度であるが, より高い解像度をめざして開発が進められている。PET の原理, 小動物用 PET の詳細については本シリーズ “I. PET 薬剤と動物用イメージ

ング装置”<sup>1)</sup>, 及び “III. 小動物用 PET 装置の開発”<sup>2)</sup> に詳しいのでご参照いただきたい。

#### 3.2 単一光子放射断層撮影法 (Single photon emission computed tomography, SPECT)

シングルフォトン放出核種を検出する SPECT では, 光子の放出される方向に PET が捉える消滅放射線のような規則性がないため, コリメータを用いて特定の方向から入射する光子のみを検出することで光子の入射方向を決定している。このため, 放出される光子のうち一部しか利用することができず, PET に比べ SPECT の感度は一般的に低くなる。一方, PET で検出する消滅放射線が全てのポジトロン核種で 511 keV の一定のエネルギーを持つのに対し, SPECT ではさまざまなエネルギーを持つシングルフォトン放出核種をエネルギーによって識別することができるため, 異なる核種によって標識された化合物を同時に用いたイメージングが可能である。

臨床用の SPECT ではパラレルコリメータが用いられることが多いが, 小動物用の SPECT では解像度のよいピンホールコリメータが主に用いられる。ピンホールコリメータでは理論上



図2 小動物用 PET/CT

Siemens Medical Solutions 社製 Inveon Multimodality System のうち PET と CT の組み合わせ。



図3 小動物用 SPECT/CT

Gamma Medica-Ideas 社製 Preclinical Platform X-O-X-SPECT

無限大の解像度を実現することができる。ただし、ピンホールコリメータでは利用できる光子の割合が極めて低く、検出感が悪くなる。このため、マルチホールコリメータが用いられるようになってきている。

SPECT, 特に小動物用 SPECT については本シリーズ“Ⅷ. SPECT 技術を用いた小動物イメージング”<sup>3)</sup>に詳しく紹介されているのでご参照いただきたい。

### 3.3 Phosphor imager

組織切片や northern blot のメンブレン上の RI の検出など, *in vitro* の RI イメージングには現在 phosphor imager (メーカーにより Phosphoimager, Phosphorimager, Phosphor imager などと呼ばれる) がよく用いられている。Phosphor imager は輝尽性蛍光体 (photostimulable phosphor) が X 線, 電子線などを受けると励起状態になり, これに, 発光波長よりも長波長の光を照射すると減衰していた光が一時的に強くなる輝尽発光 (photostimulated luminescence) を示す性質を利用している。感度は X 線フィルムを使用する場合に比べ数倍から数十

倍高いとされる。解像度は性能表では 25  $\mu\text{m}$  までであるとされるが, 放射線の飛程等の影響もあり, 使用経験からすると実際には 100  $\mu\text{m}$  程度の印象を受ける。定量性がよく, X 線フィルムによるオートラジオグラフィと違って試料中の RI 量を相対的にではあるが数値化できるのが魅力である。

### 3.4 小動物用 *in vivo* 蛍光イメージャー

可視光は透過性が低いいため, 蛍光を用いるイメージングはヒトを含めた大型動物ではほぼ体表面に限られるが, 小動物では全身撮像のための機器が開発され, その機能も急速に進歩している。構造は比較的シンプルで, マウスやラットなどの被写体を入れる暗箱, 励起光の光源とその波長を絞るためのフィルタ, 発した蛍光の波長を選択するためのフィルタ, CCD カメラで構成される。必要に応じ, 動物の体温を保持するためのヒーターや吸入麻酔のための装置を加える。蛍光による撮像はほとんどの場合数秒以内に終了するが, 経時的な変化をみる場合や多波長での撮像を行う場合には安定した麻酔や体温維持が必要となる。小動物の蛍光イメージングではバックグラウンドとなる自家蛍光の除去が重要な課題である。主な方法には, 対象とする蛍光物質の持つ励起波長とずらした波長域で励起した場合に得られる収集波長域での画像を減算するもの, 蛍光の波長分析を行い, コントロールの個体や測定対象が存在しないことが明らかな部位からの蛍光波長のパターンや測定対象とする蛍光物質の蛍光波長のパターンと比較するものなどが挙げられる。

これまでの機器では体表付近の蛍光を平面的に捉えるものがほとんどであったが, 現在では生体による吸収・散乱の少ない近赤外領域の波長を持つ蛍光物質との組み合わせにより, より体深部からの蛍光の検出が可能になるとともに, 蛍光物質の体内分布を 3 次元で画像化することが可能な機種も登場している。蛍光を用いる 3 次元イメージングでは組織内を通過する際に起



図 4 Phosphor Imager

富士フィルム社製フルオロ・イメージアナライザー  
FLA-7000



図5 小動物用 *in vivo* 蛍光イメージャー  
XENOCEN 社製 IVIS Lumina (左) と Cambridge Research  
Instrumentation Inc (CRI) 社製 Maestro

この散乱や吸収によって生じる蛍光強度の低下や蛍光強度のピークが現れる時間的な遅れから組織内で蛍光物質が存在する位置を推定している。パルス状の光 (time-dominant), 一定周期で強度が変化する光 (frequency-dominant), 連続光 (steady state-dominant) を与えて測定する方法などがある<sup>4)</sup>。

### 3・5 蛍光顕微鏡

蛍光顕微鏡では、固定した組織や細胞とともに、生きている動物の組織や細胞などの観察が可能である。透過型、落射型のほか、蛍光実体顕微鏡、共焦点レーザー顕微鏡、多光子励起蛍光顕微鏡など様々なタイプの蛍光顕微鏡が用いられている。

#### 3・5・1 共焦点レーザー走査顕微鏡

一般の蛍光顕微鏡では光源にキセノンランプや水銀ランプが用いられることが多いが、共焦点顕微鏡ではほとんどの場合、輝度、単色性、集光性に優れたレーザー光が用いられる。共焦点レーザー走査顕微鏡ではピンホールを通したレーザー光 (励起光) をダイクロイックミラーで反射、対物レンズで集めて試料の中で焦点を結ばせる。発した蛍光は対物レンズとダイクロイックミラーを通り検出器に向かう。検出器の前には焦点位置からの光が集まる位置にピンホールを設ける。励起光の通路にある蛍光物質が励起光を受けて

蛍光を発しても、焦点を離れた位置からの蛍光は一部しかピンホールを通らないため、検出器に達する光は焦点付近から発した蛍光によって占められる。この“焦点”を視野内の平面上に移動させ、各焦点からの情報から画像を作り上げる。共焦点顕微鏡では一般の蛍光顕微鏡のような焦点深度以外の位置からの蛍光のかぶりが少なく鮮明な画像が得られ、特に培養中の細胞のように厚みのある試料では有効である。温度の維持や CO<sub>2</sub> の供給の可能な装置を付加して生きた細胞の長時間にわたる変化を記録することもできる。更に焦点深度を変えた画像を集めて立体像を構築することも可能である。

#### 3・5・2 多光子励起蛍光顕微鏡

通常蛍光物質の励起は一つの光子の吸収によって起こるが、光子密度の高い状態では二つ以上の光子がほぼ同時に吸収されることによって起こることがある。このような多光子過程を利用しているのが多光子励起蛍光顕微鏡である。蛍光物質の励起は光子密度の高い焦点面だけで起こるため、共焦点顕微鏡のようにピンホールを設置することなく焦点面のみからの画像を取得することができる。また、多光子過程では吸収されるエネルギーは複数の光子のエネルギーの和となるため、蛍光物質の発する蛍光より波



図6 共焦点レーザー走査顕微鏡  
オリンパス社製共焦点レーザー走査型顕微鏡 FLUOVIEW FV  
1000

長の長い光を励起光に用いることができる。このため、近赤外線など組織透過性の高い波長域の光を励起に用いることができ、共焦点顕微鏡より深く、組織表面から数100  $\mu\text{m}$ の深さまで画像を取得することができる。

#### 4. RI イメージング・蛍光イメージングのプロープ

イメージングプロープ（イメージング剤）の開発では、何をターゲットとするか、どのようにターゲットに結合又はターゲットと相互作用するプロープをデザインするか、実際の合成をどう行うかなどが問題となる。*in vivo*のイメージングではターゲットとプロープの関係だけでなく、血流、代謝、ターゲット以外の生体分子との相互作用などさまざまな要因が大きく影響するため、これらの要因に対する配慮も必要である。これらの事項はRI イメージングにも蛍光イメージングにも共通するが、それらをいかに解決し、よりよいプロープを実現していくかの戦略にはそれぞれの特性から違いが見られる。特にいかにターゲット以外の組織への非特異的な集積やバックグラウンドを抑えてS/N (Specific/non-specific) 比を高めるかでは、常に信号を発し続けるRIプロープが主に非特異組織からのプロープの消失に依存するのに対し、蛍光プロープではターゲットでのみ発光するON/OFF切り替えを利用するアプローチをとることが可能である。

##### 4.1 RIプロープ

###### 4.1.1 陽電子放出核種

グルコースや脂肪酸、アミノ酸、核酸などエネルギー源として、また、細胞構成成分として利用される化合物や医薬品などの有機物はポジトロン放出核種である $^{11}\text{C}$ 、 $^{13}\text{N}$ 、 $^{15}\text{O}$ 、 $^{18}\text{F}$ などによって母体化合物の構造・性質に大きな影響を与えずに標識が可能のため、これらの化合物本来の挙動をPETによって画像化できる。これに対し蛍光物質は少なくとも数百の分子量を

持ち、低分子化合物の性質を変えずに標識することは困難である。低分子PET化合物の典型的な例は $\text{O}_2$ で、 $^{15}\text{O}$ を用いる以外に生体内での挙動を画像化することは不可能と考えられる。ただし、 $^{15}\text{O}$ の半減期はあまりに短く $\text{O}_2$ 、 $\text{CO}$ など非常に単純な構造の化合物以外の合成は困難である。これに対し $^{11}\text{C}$ は20分の半減期があり、多くの化合物で母体化合物そのものの標識体が合成可能である。PETプロープの合成は短時間で終了する必要がある、かつ微量・低濃度での取扱いが要求されるため、一般の有機合成とは違った特別な標識方法が開発されている<sup>5)</sup>。RIで標識された化合物を生体に投与した場合、化合物が代謝を受けて化学形が変化しても放射線は出続け、得られる画像はもとの化合物と代謝物とを合わせた動きを捉えることになる。例えばグルコースなどでは代謝が早い上、さまざまな代謝物が生じて、解析が困難である。 $^{18}\text{F}$ -2-fluoro-2-deoxy-D-glucose (FDG)はグルコースの構造にわずかな変化を与えることで、途中までしか代謝を受けないようにデザインされており、複雑な代謝を防ぎ、細胞内に滞留させることにより、組織での高い集積を得ることができる。このようなデザインはメタボリックトラッピングとよばれ、FDGのほか3- $^{18}\text{F}$ -fluoro-3-deoxythymidine (FLT)などにも用いられている。

ドーパミンなどの神経伝達物質受容体に結合するアゴニストやアンタゴニストも数多くポジトロン核種で標識され、精神神経疾患におけるこれらの受容体の変化や薬物による占有率の研究などに用いられている。 $^{11}\text{C}$ などのポジトロン核種は半減期が短いため高比放射能の標識が可能で、高感度で検出できることや、定量性が高いことなど、PETは神経伝達物質受容体のイメージング研究に有利な性質を備えている。

$^{11}\text{C}$ 、 $^{13}\text{N}$ 、 $^{15}\text{O}$ 、 $^{18}\text{F}$ 以外にも多様なポジトロン放出核種がイメージングに利用可能である<sup>6)</sup>。 $^{68}\text{Ga}$ や $^{62}\text{Cu}$ がジェネレーターで供給が可能のほか、 $^{64}\text{Cu}$ や $^{76}\text{Br}$ のように医療用の小型サ

イクロトロンで製造可能な核種も多数存在し、今後利用が広まっていくと期待される。 $^{61}\text{Cu}$ ,  $^{62}\text{Cu}$ ,  $^{64}\text{Cu}$  などのポジロン核種で標識された Cu-ATSM は低酸素組織のイメージング剤として用いられる。Cu-ATSM は低酸素状態の細胞内では 2 価の Cu イオンが 1 価に還元されるためキレート構造が維持できなくなり、Cu が細胞内にトラップされる。低酸素組織のイメージング剤としては、低酸素状態の細胞内で還元され、ラジカルを生じて細胞内の高分子に結合する性質を持つ nitroimidazole 系の化合物を  $^{18}\text{F}$  で標識した [ $^{18}\text{F}$ ] fluoromisonidazole (FMISO) なども用いられている。両者は低酸素細胞内にトラップされるメカニズムが異なり、どちらも低酸素腫瘍のイメージングに用いられてはいるが腫瘍内の分布は必ずしも重ならないことが報告されている<sup>7)</sup>。

PET イメージング剤については本シリーズ“ I. PET 薬剤と動物用イメージング装置”<sup>1)</sup>に詳しく紹介されているので参照されたい。

#### 4.1.2 $\gamma$ 線放出核種

SPECT によるイメージングには、ジェネレータによる入手が可能でかつエネルギーがイメージングに適した  $^{99\text{m}}\text{Tc}$  のほか  $^{111}\text{In}$  など金属核種がよく用いられている。造骨部位に集積する  $^{99\text{m}}\text{Tc}$  標識リン酸化合物や心筋に集積する  $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -MIBI (methoxyisobutyl isonitrile) のように放射性金属を含めた化合物自体の性質としてターゲットに集積する場合は別として、金属核種を用いて母体化合物を標識する場合には数百の分子量を持つ二官能性キレート剤などを介した標識が必要なため、低分子量の母体化合物の場合には本来の性質を維持した標識は難しい。一方で抗体やペプチドなど、分子量の大きな化合物では金属核種による標識の母体化合物の性質への影響が少ない。また、抗体をはじめとする蛋白質などは投与後の生物学的半減期が長く、イメージングに十分な S/N 比を得るのに長時間を要するため、半減期の長い  $^{111}\text{In}$  などのシングルフォトン放出核種による標識が好

まれている。

## 4.2 蛍光プローブ

### 4.2.1 蛍光色素

蛍光色素にはフルオレセイン、ローダミン、BODIPY, Cy 色素をはじめとして種々の基本骨格が存在し、しかもそれぞれに異なった特性を持つ誘導体が開発されているため、種類が非常に多く、用途に応じて使い分けられている。蛍光色素の使用手法としては、細胞内器官への集積・結合などをはじめとして、蛍光色素そのものの性質に基づくイメージングのほか、蛋白質など目的とする化合物を標識してその化合物の分布・挙動などをイメージングする場合が考えられる。

先にも述べたように、蛍光色素は環境や構造のわずかな変化で蛍光の ON/OFF や波長が変化するため、はじめは蛍光を発せず、生体内の環境の変化やターゲットとの相互作用を受けて蛍光が発するようにデザインすることが可能である。また、蛍光物質では fluorescence resonance energy transfer (FRET) とよばれる、蛍光物質 (donor, 供与体) がエネルギーを光として発せず、近傍の分子 (acceptor, 受容体) に直接与える現象が知られている。受容体が蛍光物質である場合、供与体である蛍光物質を励起すると受容体に固有の供与体より長い波長の蛍光が観察され、受容体が蛍光を発しない“クエンチャー”と呼ばれる場合には供与体を励起させても蛍光は観察されない。例えば、供与体となる蛍光物質と受容体となる蛍光物質を相互作用が予想される二つの分子にそれぞれ結合させておくと、二つの分子の結合を受容体の蛍光によって検出できるプローブデザインが可能である。また、供与体となる蛍光物質とクエンチャーを特定のアミノ酸配列で結んでおくと、この配列を認識するプロテアーゼが存在する環境のみで供与体の蛍光が検出されるプローブがデザインできる。“activatable probe”, “smart probe”などとよばれる蛍光イメージングプロ

ープは、このような蛍光物質の ON/OFF を利用して、蛍光プローブがターゲットに達した時のみ蛍光を発するようにデザインされたものである。Tsien らが報告した “smart probe” は陽電荷により細胞内に取り込まれるポリアルギニン鎖に蛍光色素を結合させ、これとクエンチャーを結合した陰電荷を持つポリグルタミン鎖を、がん細胞の表面に多く発現する Matrix Metalloproteinase (MMP) によって認識されるアミノ酸配列で結ぶデザインである。プローブががん細胞の表面に達した時にはじめて二つの鎖が切り離され、ポリアルギニン鎖の陽電荷により蛍光色素が細胞内に取り込まれて蛍光を発する<sup>8)</sup>。Urano らが報告した蛍光プローブではがん細胞の表面に発現しているレセプターに対する抗体を酸性条件下でのみ蛍光を発する色素で標識している。蛍光抗体プローブはレセプターに結合して内在化し、酸性のリソソームに運ばれた時にはじめて蛍光が観察される<sup>9)</sup>。このほかにも様々なタイプの activatable probe が開発されている<sup>10)</sup>。

#### 4.2.2 蛍光蛋白質

蛍光蛋白質の大きな利点として、遺伝子操作により細胞や組織に発現させられることが挙げられる。細胞に恒常的に発現させてその細胞の増殖や挙動を観察することや、さまざまなプロモーターのもとに発現させて種々の環境下におけるプロモーターの活性を *in vivo* で観察すること、注目する蛋白質との fusion protein として発現させてその蛋白質の挙動を観察すること、更に二つの蛋白質を異なる蛍光蛋白質との fusion protein として発現させ、FRET の原理により蛋白質-蛋白質相互作用を検出することなど、さまざまな用途に使用できる。細胞内で発現させるため、RI 化合物や蛍光色素の場合のように投与して細胞や組織に取り込ませる過程が不要で、細胞内に取り込ませることが困難な蛋白質の挙動が観察できる点などが非常に有利であるが、一方、外来遺伝子の発現を伴うためヒトへの応用には安全性・社会倫理などが障壁

となり、その利用は細胞生物学の分野や小動物のイメージングを中心とした基礎研究に限られている。蛍光蛋白質のうち早くから使われているのは下村脩博士のノーベル賞受賞でも話題になった green fluorescent protein (GFP) である。現在では GFP の蛍光強度を強めた enhanced green fluorescent protein (EGFP) のほか、赤色、黄色などさまざまな蛍光波長を持った蛍光蛋白質が開発されている<sup>11)</sup>。なかでも mPlum のように長い波長の蛍光を持つものは *in vivo* でのイメージングに適していると考えられる。

#### 4.2.3 量子 (クオンタム) ドット

Quantum Dots (量子ドット) とはセミコンダクターとよばれる性質を持つ直径が 2~10 nm の粒子である。蛍光色素としてはカドミウムとセレンで構成されるものがよく用いられている。粒子の大きさによって発する光の波長が変化し、粒子の径が大きいほど蛍光波長が長くなる。一般の蛍光色素に比べ強い蛍光が得られ、連続して励起光をあててもほとんど退色しないなど優れた性質を持つ。また、励起波長域が広いと、異なる蛍光波長を持つ複数の種類のドットを同時に励起し画像を収集することができる。生体に用いる場合には表面をポリマーで覆うなどして、親水性を高めている。蛍光の特性には優れているが、分子量が大きいと、イメージングプローブとしてのデザインには限界があり、例えば脳血液関門 (BBB) を通過させることは難しい。現在のところ EPR 効果 (腫瘍の血管には間隙が多く、またリンパ管が未発達なため腫瘍組織には高分子化合物が蓄積しやすい) による腫瘍のイメージングが試みられているほか、更に、表面に抗体などの分子を結合させることでターゲット組織に特異的な分布を促進することも試みられている。

### 5. RI 及び蛍光を用いるイメージング例

以下に RI イメージングと蛍光イメージングの画像をいくつか例示する。

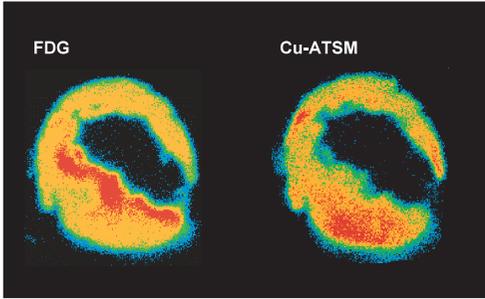


図7  $[^{18}\text{F}]\text{FDG}$  と  $[^{64}\text{Cu}]\text{Cu-ATSM}$  のマウス腫瘍内分布の比較

### 5・1 $[^{18}\text{F}]\text{FDG}$ と $[^{64}\text{Cu}]\text{Cu-ATSM}$ のマウス腫瘍内分布の比較

担がんマウスに  $[^{64}\text{Cu}]\text{Cu-ATSM}$  とその約 200 倍の放射エネルギーの  $[^{18}\text{F}]\text{FDG}$  を同時に投与し、1 時間後に腫瘍を摘出、直後に切片をイメージングプレートに密着させて  $[^{18}\text{F}]\text{FDG}$  の腫瘍内分布を phosphor imager (BAS 1500, Fuji-film 社製) で画像化 (図 7 左)、更に、 $[^{18}\text{F}]$  の減衰を待って  $[^{64}\text{Cu}]\text{Cu-ATSM}$  の分布を画像化した (図 7 右)。放射活性が高かった部位から順に赤、黄色、緑、青に色分けしている。 $[^{18}\text{F}]\text{FDG}$  と  $[^{64}\text{Cu}]\text{Cu-ATSM}$  の腫瘍内分布が異なることがわかる<sup>12)</sup>。

### 5・2 担がんマウスの PET/CT 画像

皮下に腫瘍を形成した担がんマウスに  $[^{18}\text{F}]\text{FDG}$  を投与、小動物用 PET/CT (Inveon, Siemens Medical Solutions 社製)、にて撮像。 $[^{18}\text{F}]\text{FDG}$  が矢印で示した腫瘍や脳、四肢の筋肉などに集積しているのが読み取れる (図 8)。

### 5・3 $\text{Cy5-RAFT-(cRGD)}_4$ を用いる皮下腫瘍の *in vivo* 蛍光画像及び 2 光子レーザー顕微鏡画像

RGD が結合するインテグリン  $\alpha v \beta 3$  を過剰発現している細胞としていないコントロールの細胞を移植して作製した腫瘍モデルマウスに、環状のペプチドに 4 分子の cyclic RGD (cRGD) と蛍光色素 Cy5 を結合させた  $\text{Cy5-RAFT-(cRGD)}_4$ <sup>13)</sup>、Cy5 で標識した単量体の cRGD、コントロールとなる gly を Ala に置き換えた  $\text{Cy5-RAFT-(cRAD)}_4$  を投与、3 時間後に *in vivo* 蛍光イメージャー (Maestro, Cambridge Research Instrumentation Inc (CRI) 社製) で撮像した。インテグリン  $\alpha v \beta 3$  を過剰発現する腫瘍には蛍光プローブの集積がみられた (図 9 A)。図 9 B は  $\text{Cy5-RAFT-(cRGD)}_4$  を投与した 3 時間後のインテグリン  $\alpha v \beta 3$  を過剰発現する

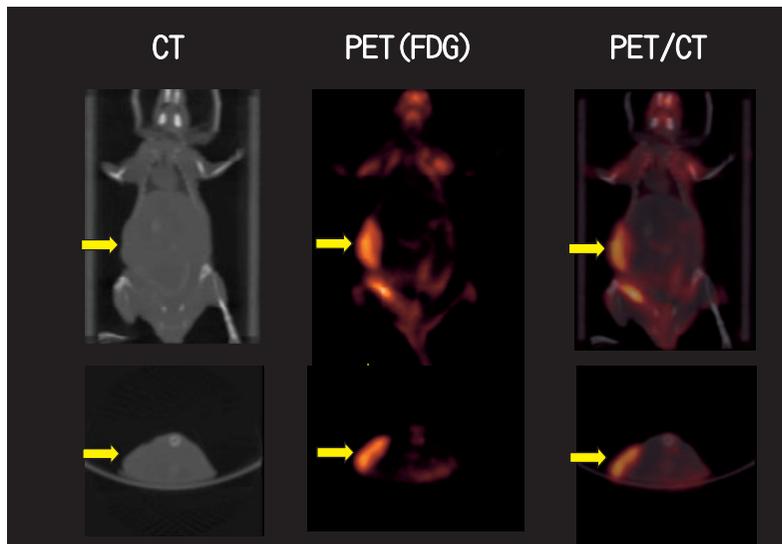


図 8 担がんマウスの PET/CT 画像

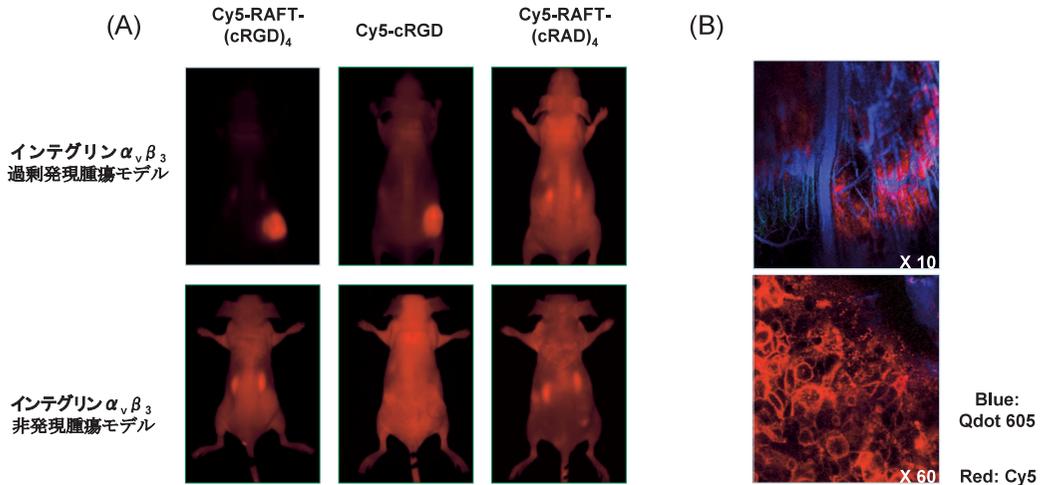


図9 Cy5-RAFT-(cRGD)<sub>4</sub>を用いる皮下腫瘍の *in vivo* 蛍光画像及び2光子顕微鏡画像

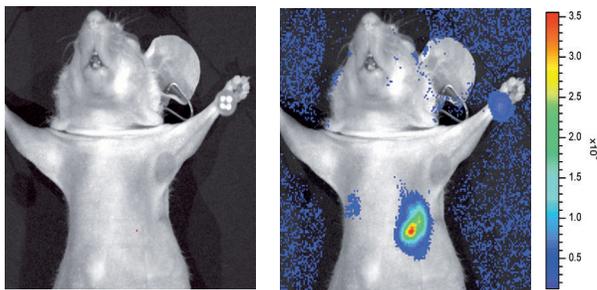


図10 DsRed 発現腫瘍の *in vivo* 蛍光画像

皮下腫瘍の2光子レーザー顕微鏡 (TCS CP5 MP, Leica Microsystems 社製) 画像。血管 (血流) を検出するため、撮像直前に Qdot 605 ITK amino (PEG) quantum dots (Invitrogen 社) を投与している。赤色は Cy5、青色は Qdot 605 を示す。腫瘍細胞の表面に Cy5-RAFT-(cRGD)<sub>4</sub> が集積しているのがわかる。

#### 5.4 DsRed 発現腫瘍の *in vivo* 蛍光画像

ヒト中皮腫細胞に赤色蛍光蛋白質 DsRed の遺伝子を導入、安定発現株を単離、これをヌードマウスの胸腔内に移植して同所移植モデルを作製した。移植から約2週間後、*in vivo* 蛍光イメージャー (IVIS Lumina, XENOGEN 社製) で撮像した (図10)。左は白色光による写真、

右は写真に蛍光画像を重ねている。胸腔内でも体表に近い側 (肋骨の裏側) にできた腫瘍は体外から検出することができた<sup>14)</sup>。

#### 謝 辞

本稿の執筆にあたり、画像等の資料をご提供くださいました放射線医学総合研究所分子イメージング研究センター辻 厚至博士、齋藤有里子修士に感謝いたします。

#### 文 献

- 1) 間賀田泰寛, PET 薬剤と動物用イメージング装置, *RADIOISOTOPES*, **55**, 405-418 (2006)
- 2) 山谷泰賀, 村山秀雄, 小動物用 PET 装置の開発, *RADIOISOTOPES*, **55**, 533-542 (2006)
- 3) 藤井博史, 梅田 泉, 小島良紀, SPECT 技術を用いた小動物イメージング, *RADIOISOTOPES*, **57**, 139-152 (2008)
- 4) Hielscher, A. H., Optical tomographic imaging of small animals, *Curr. Opin. Biotechnol.*, **16**, 79-88 (2005)
- 5) 岩田 錬, PET 薬剤の標識合成技術, *RADIOISOTOPES*, **55**, 473-484 (2006)
- 6) Welch, M. J., Laforest, R. and Lewis, J. S., Production of non-standard PET radionuclides and the

- application of radiopharmaceuticals labeled with these nuclides, *Ernst Schering Res Found Workshop*, **62**, 1591-1581 (2007)
- 7) O' Donoghue, J. A., Zanzonico, P., Pugachev, A., Wen, B., Smith-Jones, P., Cai, S., Burnazi, E., Finn, R. D., Burgman, P., Ruan, S., Lewis, J. S., Welch, M. J., Ling, C. C. and Humm, J. L., Assessment of regional tumor hypoxia using  $^{18}\text{F}$ -fluoromisonidazole and  $^{64}\text{Cu}$  (II)-diacetyl-bis (N4-methylthiosemicarbazone) positron emission tomography: Comparative study featuring microPET imaging, Po2 probe measurement, autoradiography and fluorescent microscopy in the R3327-AT and FaDu rat tumor models, *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.*, **61**, 1493-1502 (2005)
  - 8) Jiang, T., Olson, E. S., Nguyen, Q. T., Roy, M., Jennings, P. A. and Tsien, R. Y., Tumor imaging by means of proteolytic activation of cell-penetrating peptides, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **101**, 17867-17872 (2004)
  - 9) Urano, Y., Asanuma, D., Hama, Y., Koyama, Y., Barrett, T., Kamiya, M., Nagano, T., Watanabe, T., Hasegawa, A., Choyke, P. L. and Kobayashi, H., Selective molecular imaging of viable cancer cells with pH-activatable fluorescence probes, *Nat. Med.*, **15**, 104-109 (2009)
  - 10) Lee, S., Park, K., Kim, K., Choi, K. and Kwon, I. C., Activatable imaging probes with amplified fluorescent signals, *Chem. Commun. (Camb)*, **28**, 4250-4260 (2008)
  - 11) Wang, L. and Tsien, R. Y., Evolving proteins in mammalian cells using somatic hypermutation, *Nat. Protoc.*, **1**, 1346-1350 (2006)
  - 12) Tanaka, T., Furukawa, T., Fujieda, S., Kasamatsu, S., Yonekura, Y. and Fujibayashi, Y., Double-tracer autoradiography with Cu-ATSM/FDG and immunohistochemical interpretation in four different mouse implanted tumor models, *Nucle. Med. Biol.*, **33**, 743-750 (2006)
  - 13) Jin, Z. H., Razkin, J., Jossierand, V., Boturyn, D., Grichine, A., Texier, I., Favrot, M. C., Dumy, P. and Coll, J. L., *in vivo* noninvasive optical imaging of receptor-mediated RGD internalization using self-quenched Cy5-labeled RAFT-c (-RGDfK-) (4), *Mol. Imaging*, **6**, 43-55 (2007)
  - 14) Saito, Y., Furukawa, T., Arano, Y., Fujibayashi, Y. and Saga, T., Comparison of semiquantitative fluorescence imaging and PET tracer uptake in mesothelioma models as a monitoring system for growth and therapeutic effects, *Nucl. Med. Biol.*, **35**, 851-860 (2008)

### Abstract

Instruments for Radiation Measurement in Life Sciences (5), "Development of Imaging Technology in Life Science". IX. Advantages of RI and Fluorescence in Imaging

Takako FURUKAWA and Zhao-Hui JIN: Molecular Diagnosis Team, Diagnostic Imaging Group, Molecular Imaging Center, National Institute of Radiological Sciences, 4-9-1 Anagawa, Inage-ku, Chiba-shi Chiba Pref. 263-8555, Japan

*Imaging has been used as an effective research tool in many fields. In recent years, "molecular imaging" has come to attract a major attention as it studies molecular events in living animals and humans. Variety of modalities is used in molecular imaging, sometimes in combination, and the machines and techniques are going through rapid progress. Two of popular modalities among them are fluorescence imaging and radioisotope (RI) imaging such as positron emission tomography (PET) and single photon emission tomography (SPECT). Fluorescence imaging provides rich selection in imaging probes and the resolution can reach into sub-cellular level. RI imaging, especially PET, is superior to the others in quantitative analysis and the direct applicability to humans. In this article the two imaging modalities are overviewed comparing their characteristics.*