

光による分子イメージングの現状と将来

田 村 守

Optical Molecular Imaging: Current Status and Its Futures

Mamoru TAMURA

The “true” meaning of molecular imaging is to construct the Molecular Library, which contains the complete set of the information concerning the function of all the genome of living organisms. The final output of this Molecular Library and Imaging is the clinical application of human being, as personalized treatment. Several optical molecular imaging are given and optical technology must play the indispensable role in this new field, followed by human genome project.

Key words: Molecular Library, molecular imaging, optical imaging, multimodality imaging, biophotonics

「分子イメージング」の言葉が最近になり、急速に広がりつつある。この言葉がおおやけに使われたのは、2002年に2つの学会、The Society for Molecular Imaging (SMI) と Academy of Molecular Imaging (AMI) が米国で設立されたことによる。この学会の設立母体が、核医学 (nuclear medicine) や放射線医学 (radiology) を中心とした画像診断であったため、また“イメージング”の言葉が前面に出されたため、その内容に関し、いくつかの誤解が生じている。特に本邦において、“分子イメージング”とはPET (positron emission tomography) を中心としたヒトを対象とする画像診断であるとの考えが強く主張されているが、これは分子イメージングのもつ、広範、かつ明解な生物学的・医学的概念のごく一部でしかない。筆者はたまたま NIH (National Institute of Health) が2004年秋に最終案として“分子イメージング”のロードマップの制定に関与していたこと、また2003年に終了したヒューマンゲノムプロジェクトがスタートした時点 (~1990年) で、すでに“ポストヒューマンゲノム”の方向を NIH で探りだしはじめたときより、“光”の部分にコミットしてきたこともあり、分子イメージングの実態と今後の方向を、独断と偏見を交えてまとめてみたい。

1. “分子イメージング”は必ずしも“イメージング”のみを目指してはいない

前述の SMI の molecular imaging の定義には、イメージングの言葉は出てこない。そこでは、“広く生きた動物における多くの生物学的プロセスを細胞レベル、分子レベルで計測し、同定する”とある。これに対し、より臨床医学的立場にたつ AMI は、“この分野のゴールは、生きた生物系の細胞 1 分子レベルのイメージングを可能とする技術とアッセイ (評価) 法を発展させることである。これにより、生物学的プロセスをより深く理解し、多くの病気の診断、治療管理をよりよい方向に導く”とある。なぜ SMI と AMI が並立したかわかる気がする。

それでは、今後10年、ヒューマンゲノムに匹敵する“分子イメージング”のプロジェクトを推進する NIH の動きをみてみよう。筆者の手もとにある2004年秋の NIH Roadmap Initiative に掲げられている“分子イメージング”は、正しくは“molecular library and imaging”であり、“分子ライブラリー”の言葉が抜けて、流布されている。ちょうどヒトゲノムプロジェクトがヒトの全遺伝子の構造 (シーケンズ) の地図 (カタログ、辞書) を完成させたように、次にこの分子ライブラリーを完成させるのが

表1 今後10年の分子イメージングの概略。

1~3年の目標	~10年後の最終目標
<ul style="list-style-type: none"> ゲノム情報に基づいた分子ターゲットのカタログをつくる 現在のものの1000倍の感度と特異性をもつプローブの開発 hybrid imaging systemの完成 イメージング用試薬およびプローブのデータベース 	<ul style="list-style-type: none"> 分子イメージング法に基づいた個人のpersonalized medicineを完成させる 動物の生理学を分子イメージングにより理解する 細胞内の情報伝達系のトポロジーの作製 細胞内イベント検出のためハイスループット単一分子検出技術の確立

真のねらいである。その目指すところは、遺伝子の機能を中心として生命活動を担うすべての分子に関する情報—どんな形をした分子がいつどこでどんな役割を果たしているか—のカタログであり、図書館をつくることである。これがいかに大変なことか、次のことからわかる。われわれの身体は数十兆の細胞からつくられているが、出発は1つの受精卵から始まる。1つの受精卵から細胞分裂を繰り返し赤ちゃんが生まれるまで、そのすべての発生過程において個々の細胞内でどの遺伝子が発現し、何の役割を果たしているかをすべて明らかにする、気の遠くなるような課題である。これを解くのが分子イメージングである。決してPETでがんを見つけるのが分子イメージングではないことがおわかりいただけるであろう。

表1に、今後10年の分子イメージングの概略を示してある。この中で、リスクの高いもの、また10年後の最終目標が2つ掲げられている。1つは医療分野への分子イメージングのアウトプットであり、もう1つは分子イメージングによって動物の生理学を理解することである。この計画の中に“full genome expression”があり、すべての遺伝子の機能を明らかにすることを掲げている。

本来の分子イメージングの定義には、イメージング以外にもmolecular detection(超高感度検出法)も含まれる。それは、例えば細胞1個の中で行われる分子過程を追跡する手段が必須だからである。このとき、われわれは生きのまま細胞1個の中の1個の分子を対象としなければならない。

2. 分子イメージングの重点課題

前述のように分子イメージングの本来の目的は、すべての遺伝子の機能、局在、分子構造、関係する疾病等のライブラリーを完成させることであるが、その中で“イメージング”を中心とした分野に限ると、(1) MR (magnetic resonance), (2) X-ray, (3) Optics, (4) Ultrasound, (5) Multimodality Imagingがあげられる。そしてこれらの技術課題に共通するものとして、(6) Development of Specific Probeが最重点課題となる。特に、臨床応用を目

指した“分子画像診断”ではすべてこのプローブ、別ない方では“造影剤”の開発が鍵である。以下、なぜ超音波画像診断法のようなすでに確立した“古典的な”手法がX線(CT)やMR(I)と同様な立場なのかといえば、これらはすべて病態特異的な分子プローブができれば、まったく新しい価値をもつ画像診断機器となるからである。

例えば、現在のMRIは H^+ を対象としているが、 F^- , Pi , その他の核種のイメージングが可能となれば、病態組織(例えばがん組織)に特異的に取り込まれたり、細胞表面のレセプターと結合する化合物に F^- 等でラベルし、画像化できないか、あるいは磁性体を含むプローブ等を用い、 H^+ の T_1 , T_2 を利用したイメージング等があげられる。同様にX線においても、病態認識プローブにX線の吸収体を結合させた造影剤も可能であろう。超音波ではいまは“バブル”を造影剤として使っているが、これは“化学物質”ではない。そこで“泡”に代わる音波を反射、あるいは減衰させるような物質—ある種のナノパーティクルや“やわらかい粒子”等に病態を認識する化合物を組み込んで、超音波精密画像診断を利用することが考えられている。このような病態特異的なプローブができれば、超音波画像の解像度の向上により、早期診断が可能となる。

この意味で、PETの開発は少し意味が異なる。PETにおいては、当初より、プローブの開発がすべてを決めてきた。すなわち、特異的なプローブがなければ、それ自身ではほとんど診断能力がない(血流測定用の O^{17} やグルコースの C^{12} ラベルは例外だが)。したがって、新たな装置開発より、このプローブ開発がPETにおいて最重要と位置づけられる。しかしながら、小動物用PETは、preclinic study(前臨床研究)の立場から、特に創薬分野からの強い要望があり、今後の発展が望まれる。

光イメージング(本来は広い意味の光学技術)が、今後10年の分子イメージングの最重点項目となりつつある。それは、基本的に2つの立場に由来する。

- (1) 少なくとも米国においては、政府資金(税金)が企業に直接流れることは禁止されている。したがって、常に政府資金は10年先までを見据えた新しい科

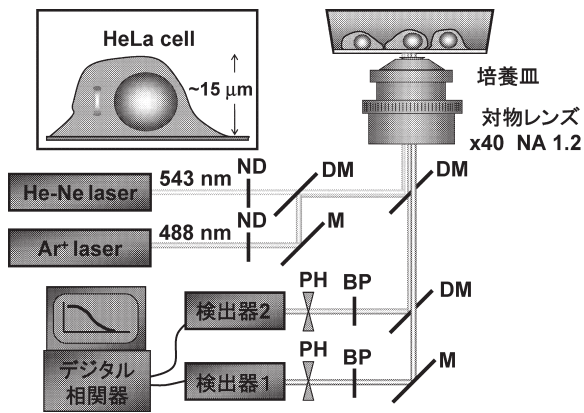


図1 蛍光相互相関分光 (FCCS) 計測システム。HeLa cell：ヒューラ細胞，M：ミラー，ND：NDフィルター，DM：ダイクロイックミラー，BP：バンドパスフィルター，PH：ピンホール。

学技術や産業の育成に投資する。ヒューマンゲノムプロジェクトはその典型であろう。この意味で、分子イメージングをヒューマンゲノムプロジェクトに匹敵する重要課題と考えたとき、「光技術」の医学、生物学分野への新たな拡大は、「光」が通信技術を変え、新しい産業を生み出したように、生物学、医学を変えうるポテンシャルをもつといえる。そして新しい産業、バイオフォトンクス、あるいはメディカルフォトンクスが生まれる可能性に、少なくとも米国は賭けているともいえる。

(2) 光、広い意味の電磁波には、 γ 線からラジオ波まで含まれるが、従来医学分野でほとんど使われなかった紫外-可視-近赤外-赤外域のもつ性質—すなわち、1個の光子、いいかえると1個の分子の検出能力と干渉に基づく波長領域であるナノメートルサイズからメートルサイズまでの空間分解能をもち、最も重要な生体に対する無侵襲性をもつこと—が光イメージングの最大の特色である。この光のもつ本質的な利点は、しかしながら、顕微鏡技術をのぞいて10年来ほとんど認識されてこなかった。いまや、この「光イメージング」は、臨床医学を対象とした2005年のSMIの発表講演の半数近くを占めるに至っている(後述)。

3. 顕微鏡レベルでの光イメージング

一般に計測対象のサイズから分類すると、*in vitro* 1分子レベル、単一細胞レベル、臓器レベル、個体レベルと分けられる。ここで、1分子計測および単一細胞系(培養細胞系)は顕微鏡の世界であり、共焦点レーザー顕微鏡の出現と各種色素(特に蛍光色素)の開発、そして近年GFPに代表される蛍光タンパク質の発現系の開発により、単一

細胞内の標的分子の観察はルーチン化しつつある。これらの中で、近年注目を集めている技術に、「分子ゆらぎ」を利用した蛍光相関分光法がある。この手法は従来のイメージングと少し異なった意味(分子の動的な挙動)をもつので、Kinjoら¹⁾の最新の結果を一部紹介する。

蛍光相関分光法の詳細は他にゆずるが、図1に蛍光相互相関分光(fluorescence cross correlation spectroscopy, FCCS)のブロックダイアグラムを示す。基本的には、レーザー共焦点光学系に、2本の励起用光源と2つの蛍光検出系をもつ。このFCCSは、異なった2つの蛍光分子からの発光の同時性を検出するもので、一部FRET(蛍光エネルギー移動)と同様な情報および相補的な関係がある。ただし、同時に分子の動的挙動の情報が得られることが利点としてあげられる。その一例を図2に示す。われわれの細胞は、ある種の刺激等でみずから死ぬようにセットされる(自殺)システムがあり、アポトーシスとよばれる。この細胞が死にいたる複雑なプロセスの中で、タンパク質分解酵素(カスパーゼ)が細胞内で働く様子を示したものである。いま、蛍光タンパク質(GFPとYFP)をこの酵素が認識するアミノ酸配列のものと、そうでないものを細胞内で発現させて、アポトーシスを引き起こすと、認識配列をもつものの相互相関がなくなり、この2つのタンパクが切れたことを示している。こうして、生きた細胞内での酵素(カスパーゼ)の働きを追うことができた。このような単一細胞系を次に述べる、生きた丸ごとの系へ拡張する方向が次の課題である。

さて、極言すれば、顕微鏡を用いた培養細胞を対象とした*in vivo*観察は、遺伝子プローブや蛍光色素等を用いることにより、実験系として確立しているため、現在細胞生物学分野で大流行である。しかし、技術的にいえば、ツァイスやライカに勝てるだろうか。

分子イメージングの最終目標は、生きた丸ごとでの生体で遺伝子を中心として、その生命活動を分子レベルで解明することである。そこでは、1つの疑問が生じる。すなわち、生体から取り出され培養系に移された細胞が、本来の存在場所、臓器や器官、とまったく同じであろうか。いいかえると、生理的機能を維持した臓器レベルで、細胞内での生理的・生化学的過程を分子レベルで追わなければならない。この目的のため、顕微鏡技術を生体丸ごとへ展開する必要がある。この道には2つの方法があり、1つは臓器レベルの実験系として注目している各種臓器を動物の身体から切り離し、人工血液やクレブスリンゲル液などで灌流し生かしつづける手法である。一般に、灌流臓器やラットなどの小動物をステージへ置く場合、臓器や身体を長時間

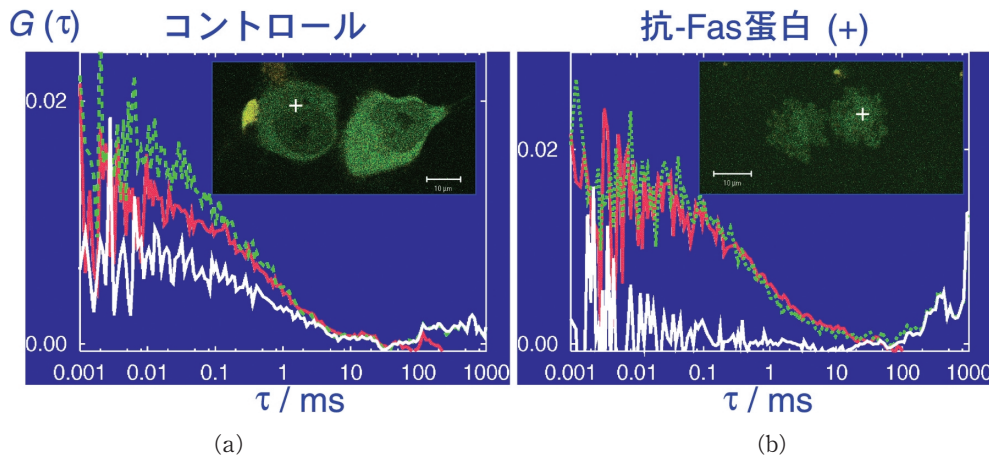


図2 細胞内カスパーゼ-3の活性の検出。相関比：(a) 0.39 ± 0.04 ，(b) 0.05 ± 0.01 。

レンズやステージに密着させることができない（血流圧迫は数分で起こり、その部位の細胞は死ぬ）。また、少なくとも20 cm程度のワーキングディスタンスがある。さらに重要なことは、われわれの臓器は常に動いている（例えば心臓の拍動による血液の動き）。したがって、500~1000倍の倍率で共焦点系を組んだとき、この動きのアーティファクトをいかにのぞくかなどである。さらに、臓器レベルで生きたまま特異的な染色をいかに行うか、例えば遺伝的手法やベクターを用いる手法で蛍光ラベルタンパク質を発現させる遺伝子改変動物の作製など難問山積である。このようにして、例えば肝細胞の行う生理的役割のひとつである糖新生を直接測りながら、同時に細胞内の出来事を分子レベルで追う道が開かれよう²⁾。同様に、例えばわれわれはクラニアルウィンドウを用いて脳組織を直接観察できる。したがって、この系に1分子検出手法を応用すれば、脳組織内の1個のニューロンの中の1分子追跡も、生きたラット脳で可能となろう³⁾。

4. 光イメージングの小動物への応用

現在、前臨床研究（preclinic study）や創薬の分野で脚光を浴びているのが、ラット、マウスを対象とした光イメージングである。このラットやマウスを対象とした小動物イメージングは、光吸収を測定するものと、発光（蛍光）に大別される。現在では、原理および装置の簡便さから、実用化（市販）されているのは発光イメージングである。最も簡単なのは、高感度カメラを用いて動物体内に生じた発光（蛍光）を撮影するもので、基本的に二次元画像である。注意すべきは、基本的に二次元検出なので発光部位が体表近くと数mm下で見かけの光強度は2~5倍も変わる

（単純に言えば、皮膚や筋肉の散乱係数 μ'_s は $\sim 1 \text{ mm}^{-1}$ 程度）ことで、したがって定量的比較は、その発光部位（深さ）がわからない限り定性的なものである。

この問題は、蛍光トモグラフィーの断層像として出すことで解決される⁴⁾。実際に、マウス脳に移植したGFPでラベルしたがん細胞（グリオーマ）の出す蛍光断層像に、X線CT画像を重ねたものが報告されている。次に、時間分解計測を導入した断層イメージングも試みられている（GE Healthcareカタログ）。断層像の原理は、 ~ 100 ピコ秒程度の励起用パルス光をラットやマウスに照射し、検出光を時間分解すると、発光部位が体表から深くなるにつれ、励起光が到達する時間および発光の時間も、散乱によって光路長が長くなることにより遅れて検出されることである。したがって、この発光ピークが現れる時間は深さの関数のため、各時間ごとに強度を求める。次に、目的の範囲内でスキャンし、励起光が照射された時間を基準として、時間スライスによって断層像となる。この装置は、少なくとも二次元検出に比べ、蛍光強度の深さ方向の差によるあいまいさを克服し定量化が可能となる。物理化学ではなじみ深い、時間分解計測の基礎医学応用の一例である。なお、光イメージングで、蛍光と異なり、化学発光（ホタルの発光現象）で特定の細胞やタンパク質を光らせる手法も広く使われている。この場合の、発光部位を三次元で観測する方法は非常に難しい。いまのところ、平面的な発光画像のみである。

次に、顕微鏡や内視鏡の技術を応用して、小動物の生きた丸ごとの分子レベルの計測も、活発に行われつつある。例えば、ラット頭部に装着した二光子励起顕微鏡を用いて、動物（ラット）が自由に動き回る状態で脳表の蛍光画

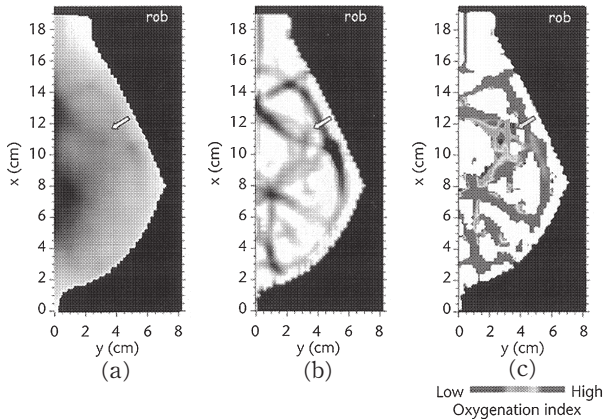


図3 光マンモグラフィ。 (a) エッジ補正 (N -イメージ), (b) 二次微分 (N'' -イメージ), (c) 酸素化 (oxygenation) イメージ。47歳, がん組織: 0.5 cm 以下, 矢印で示す。

像が報告されている⁵⁾。このシステムは、無麻酔、非拘束ラットでの計測例である。前に示した、クラニアルウィンドウの画像 (麻酔、固定) から一歩進めたものである。光とのマルチモダリティー画像の例として、ラットの頭部での超音響画像が報告されている⁶⁾。

5. 人への応用

分子イメージングの臨床現場のターゲットのひとつに、乳がん診断がある。乳がんは、NIHが克服すべきがんの第1位に挙げられている。光によるマンモグラフィの一例を図3に示す⁷⁾。基本的には、強度変調を利用した周波数領域の計測である。図からみられるように、直径 ~ 5 mm程度のがんが検出される。この画像は血液の酸素飽和度を画像化しているが、ここに近赤外領域の吸収や発光をもつ造影剤、あるいは光プローブが利用できれば、より診断精度は上がるであろう。また、最近になり、時間領域の人頭部の賦活時のトモグラフィもはじめて示された⁸⁾。

6. 光を利用したマルチモダリティーイメージングとまとめ

近年のPET-CTの成功は、異なったイメージング技術の融合のよい例である。光は他のすべてのモダリティーと原理的に干渉しないため有効な手法であるが、“光”は検出感度は高いが空間分解能はあまり期待できない。しかし、位置は特定できなくても、そこに病変部があることが何らかの手法 (例えば発光) で検出できればよい。現在、この方向で、小動物レベルではPET+光イメージング、MRI+光イメージング等が試みられている。最近では、内視鏡とMRIの併用も報告されている。今後の進むべき

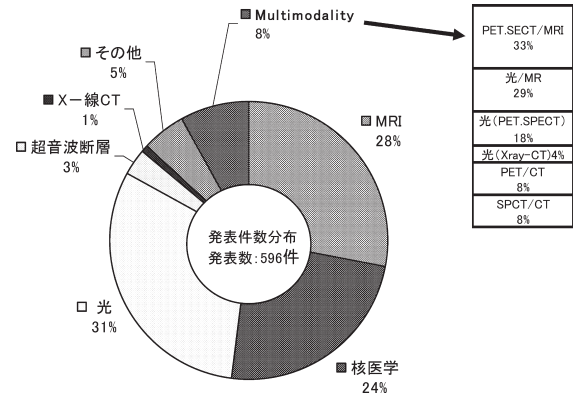


図4 2005年, SMIでの発表内容の分布。

方向である。

図4は、2005年のSMIのテーマをグラフにしたものである⁹⁾。このグラフから光単独、およびマルチモダリティーでの光を含めると、光に関連したテーマが40%近くになり第1位である。いかに“光”が分子イメージングの中心課題であるかが理解されるであろう。特筆すべきことは、繰り返しになるが、“光のポテンシャル”が次の分子イメージング、そして分子ライブラリーの中心であるということである。

この世界の流れに日本は完全に立ち遅れている。特に分子イメージングがPETの臨床応用として国のプロジェクトとして動いているいまの状況を、10年後を見据えた諸外国の“光とバイオの時代”に対応するために、早急な研究体制の整備が必須である。

文 献

- 1) K. Saito, I. Wada, M. Tamura and M. Kinjo: “Direct detection of caspase-3 activation in single live cells by cross-correlation analysis,” *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **324** (2004) 849-854.
- 2) 齋藤有香, 田村 守, 金城政孝: “ラット灌流肝臓を用いた蛍光相関分光法の実験系の確立”, *生物物理予稿集* (2005) 1p209.
- 3) H. Shichinohe, S. Kuroda, J. Lee, G. Nishimura, S. Yano, T. Seki, J. Ikeda, M. Tamura and Y. Iwasaki: “In vivo tracking of bone marrow stromal cells transplanted into mice cerebral infarct by fluorescence optical imaging,” *Brain Res. Protoc.*, **13** (2004) 166-175.
- 4) V. Ntziachristos, C.-H. Tung, C. Bremer and R. Weissleder: “Fluorescence molecular tomography resolves protease activity in vivo,” *Nature Med.*, **8**, (2002) 756-762.
- 5) F. Helmchen, M. S. Fee, D. W. Tank and W. Denk: “A miniature head-mounted two-photon microscope: High resolution brain imaging in freely moving animals,” *Neuron*, **31** (2001) 903-912.
- 6) X. Wang, Y. Pang, G. Ku, S. Xie, G. Stoica and L. V. Wang: “Noninvasive laser-induced photoacoustic tomography for structural and functional in vivo imaging of the brain,” *Nature Biotechnol.*, **21** (2003) 803-806.

- 7) S. Fantini, E. L. Heffer, H. Siebold and O. Shultz: "Using near-infrared light to detect breast cancer," Opt. Photonics News, **14** (2003) 24-29.
- 8) Y. Ueda, T. Yamanaka, D. Yamashita, T. Suzuki, E. Ohomae, M. Oda and Y. Yamashita: "Reflectance diffuse tomography: Its application to human brain mapping," J. Jpn. Appl. Phys., **44** (2005) 1203-1206.
- 9) 技術研究組合・医療福祉機器研究所：分子イメージング研究開発動向調査，平成 17 年 11 月。
(2005 年 12 月 8 日受理)