

Bio-Techniques, 39(2), 170-171(2005)

蛍光タンパク・ヒト癌マウスモデルの LED*フラッシュライトを使った 手軽な全身イメージング

Meng Yang¹, George Luiken², Eugene Baranov¹, and Robert M. Hoffman¹

¹AntiCancer, Inc., san Diego, and ²Fluoro-Probe, Inc., Coronado, CA, USA

我々は、in vivo で細胞を検出しイメージングするために GFP(緑色蛍光タンパク)を使う方法を開発した。我々は、蛍光装置を使ってマウスの臓器内の生きた腫瘍細胞を顕微鏡下に初めて目に見える形で検出した(1)。全身イメージングに GFP を使う方法も我々が確立したものである(2)。生きたマウスで増殖し、蛍光タンパクでラベルされた転移性の腫瘍がリアル・タイムでイメージングされた。GFP を使った全身イメージングは、動物の体外から非侵襲的に実施でき、基質の注入や麻酔をする必要もなく、生きた動物の体内での腫瘍の増殖や転移を、これまでにない連続的で目に見える形でモニターリングすることを可能にした。内部臓器での腫瘍の生育はデジタル化した全身イメージングを使って定量的に測定できる。イメージングのためには、蛍光実体顕微鏡あるいは蛍光発生用ライト・ボックスと CCD カメラが必要である(2)。

最近、Tyas らは遺伝子組換え GFP マウスを見るのに青色 LED フラッシュライトを使用した(3)。GFP はこのマウスの殆どの臓器で高いレベルで検出された(3)。Tyas らは、遺伝子組換え GFP マウスの赤ん坊を選別するために、青色 LED フラッシュライトと適当な励起フィルターと発光フィルターを組み合わせ使用した(3)。GFP マウスの全身イメージングや同じマウスに移植し増殖した RFP でラベルした腫瘍を蛍光観察するのに、青色フラッシュライト LED(LDPLLC, Woodcliff Lake, NJ, USA; www.maxmax.com/OpticalProducts.htm), 励起フィルター(midpoint wavelength peak470nm; Chroma Technology, Brattleboro, VT, USA), 発光フィルター-D470/40(Chroma Technology, Brattleboro, VT, USA; www.chroma.com)を使用することができる(2)。

図-1A は、二つの腫瘍の全身イメージを示す、一つは脳に移植した GFP でラベルした腫瘍であり、もう一つは同じく脳に移植した RFP(赤色蛍光タンパク)でラベルした脳腫瘍である。また、図-1A は、GFP と RFP の腫瘍が青色 LED フラッシュライトで同時にイメージングできることを示している。図-1B は、マウスの骨に移植された GFP-腫瘍とその腫瘍の LED フラッシュライトによる全身イメージングを示している。

図-2A は、青色 LED フラッシュライトで励起されたマウスの腸に移植された GFP を発現する腫瘍とその全身イメージを示す。図-2B は、同じマウスを開腹した時の腫瘍のイメージを示す。図-2A と図-2B を比較すると、全身イメージングと開腹時の GFP を発現している腫瘍のイメージが良く一致していることがわかる。

*LED: Light-Emitting Diode(発光ダイオード)

図-2C は、肝臓に移植された RFP を発現する腫瘍と同じマウスの膵臓に移植された

GFP を発現している腫瘍を示している。図-1 で脳に移植した RFP-腫瘍や GFP-腫瘍と同じように、肝臓に移植した RFP-腫瘍も脾臓に移植した GFP-腫瘍も、青色 LED フラッシュライトで同時にイメージングできる。図-2D は、脾臓に移植した RFP-腫瘍が転移した様子を青色 LED フラッシュライトで励起したイメージである。

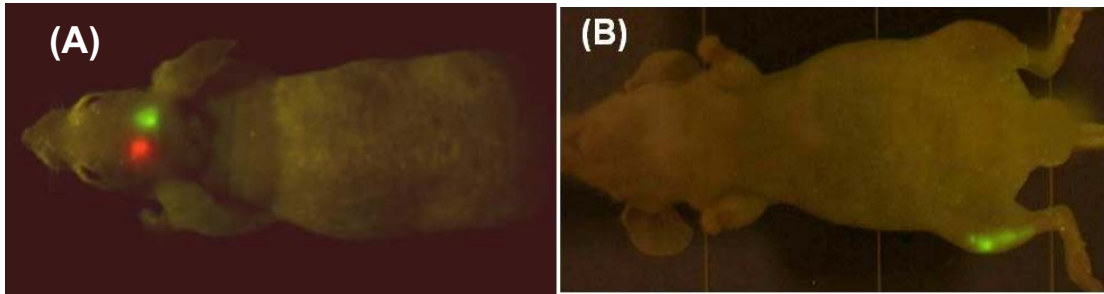


図-1：ヌードマウスの脳に移植した GFP/RFP-腫瘍の全身イメージング

(A)一匹のヌードマウスの脳に移植した GFP- or RFP を発現する腫瘍。励起光は 470nm に中心のあるフィルターを装着した LED フラッシュライトで発生させた。イメージは Hamamatsu Photonics の CCD カメラで撮影した。(B)ヌードマウスの右後ろ脚の脛骨に移植された GFP 発現腫瘍。イメージングと撮影には上記(A)と同じ装置を使用した。

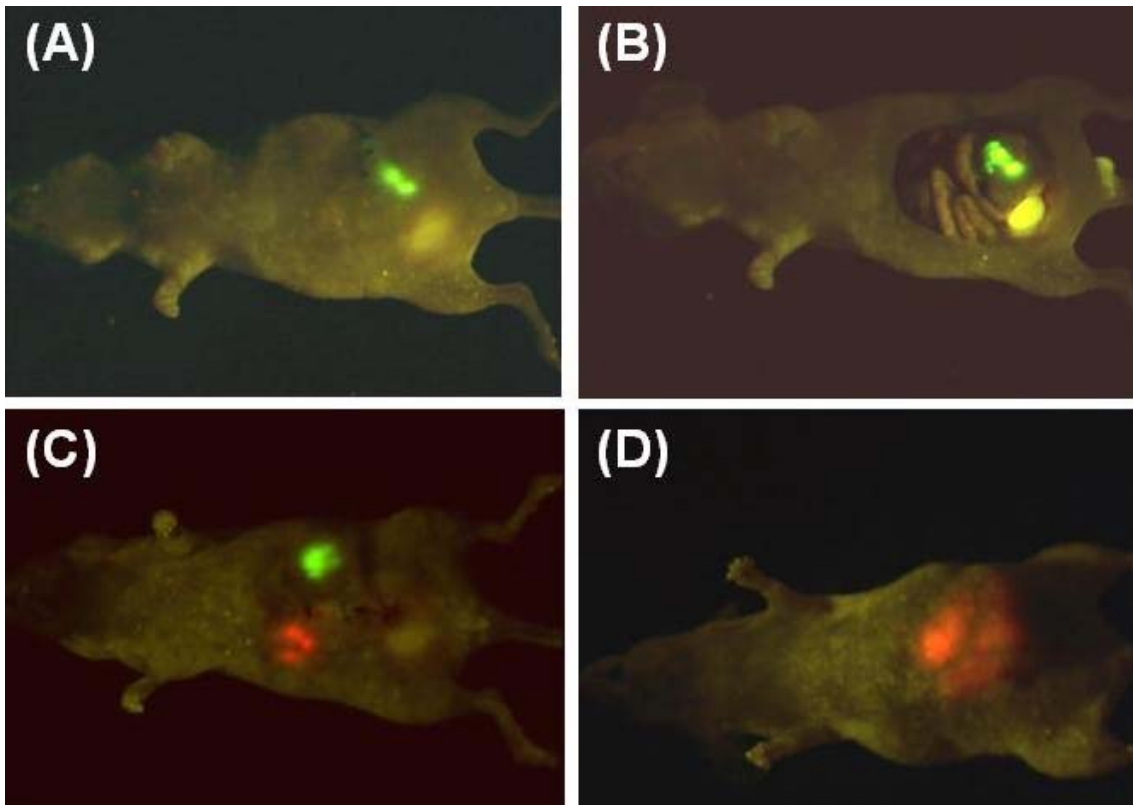


図-2：ヌードマウスに移植した GFP/RFP-腫瘍の全身イメージングと開腹時イメージング

(A)全身イメージは腸で LED フラッシュライトによってイメージされた GFP 発現腫瘍を示す。(B)(A)に示したと同じマウスの開腹時のイメージを示す。(C)肝臓に移植された RFP-腫

瘍と膵臓に移植された GFP-腫瘍のイメージ。腫瘍は青色 LED フラッシュライトでイメージされた。(D)肝臓に移植され、膵臓に転移した RFP-腫瘍の全身イメージング。

これらのイメージは、Hamamatsu C5810 CCD カメラ(Hamamatsu Photonics, Hamamatsu City, Japan)で撮影された。しかし、もっと簡単なデジタル・カメラで撮影しても使用可能な写真が撮影できる。図-1 および図-2 に示したようなイメージは、ルシフェラーゼ・モデルでは欠かせない作業である“基質や麻酔の注入および動物の拘束”をしないで、容易に肉眼で観察できる。

各々の画像のピクセルの数と強度を計算するため画像処理ソフトウェアが使われる、計算結果は、 $\text{pixels}/\text{mm}^2$ に換算され、表-1 に要約した。蛍光の強度は、全ての検出可能な GFP シグナルの平均値である。蛍光強度は、CCD カメラの green channel の gray scale で定義した単位で測定した。目に見えるバックグラウンド値以上の値が限界値として採用された。図-2 では、大腸に移植された腫瘍の大きさと強さを全身イメージと回復時のイメージについて比較している。イメージとして得られた腫瘍のイメージの大きさは、全身イメージでも開腹時のイメージでもほぼ同じであることが表-2 から分かる。そして、全身イメージが開腹時のイメージの 70%であることの方がもっと驚くべきことである。全身イメージの場合、光の散乱のために、幾つかの情報は失われてはいるけれども、このような簡単な装置を使ってもかなりの情報は得ることが出来る。全身イメージと実際の腫瘍の体積の相関性については既に報告済みである(4)。しかしながら、腫瘍から発する蛍光が弱い場合は、より高性能の装置が必要である。

この論文に報告した data から、次のような結論が得られる：(i)動物内部の GFP-腫瘍 あるいは RFP-腫瘍から非常に強い蛍光が放出される(ii)イメージは簡単に定量できる(iii)自家蛍光による妨害は無視小である(iv)非常に簡単で安価な装置で、RFP/GFP-腫瘍の全身イメージングが可能である。

これらの data は、in vivo での薬効評価の大量処理をするために、蛍光タンパクを使った全身画像イメージングが大きな可能性を持っていることを示している。更に、これらの data は、in vivo での蛍光タンパクを使ったイメージングには限界があるという間違った考えを正すものである(5,6)。

表-1 腫瘍イメージの定量性

腫瘍のある臓器	ピクセル	平方mm
GFP-brain	912	6.00
RFP-brain	811	5.34
GFP-bone	3561	23.42
GFP-colon(全身イメージング)	2465	16.22
GFP-colon(体内イメージング)	2731	17.97
GFP-pancreas	2813	18.51
RFP-liver	2254	14.83
RFP-pancreas	25103	165.15

GFP: green fluorescent protein ; RFP: red fluorescent protein

表-2 腸の GFP-腫瘍の全身イメージと体内イメージの比較

イメージのタイプ	腫瘍のサイズ(ピクセル)	蛍光の強さ
全身イメージング	2465	137
開腹時のイメージング	2731	196

イメージングは、青色 LED フラッシュライトによる励起で行った。

蛍光強度は、CCD カメラの green channel の gray scale で定義した単位で測定した。

References:

1. Chishima, T., et al., 1997. Cancer invasion and micrometastasis visualized in live tissue by green fluorescent protein expression. *Cancer Res.*, 57:2042-2047
2. Yang, M., et al., 2000. Whole-body optical imaging of green fluorescent protein-expressing tumors and metastasis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97:1206-1211
3. Tyas, D.A., 2003. Identifying GFP-transgenic animals by flashlight. *BioTechniques* 34:474-476.
4. Kazt, M.H., et al, 2003. A novel red fluorescent protein orthotopic pancreatic cancer model for the preclinical evaluation of chemotherapeutics. *J. Surg. Res.* 113:151-160.
5. Gross, S., 2005. Spying on cancer: molecular imaging in vivo with genetically encoded reporters. *Cancer Cell* 7:5-15.
6. Weissleder, R. and Ntziachristos. 2003. Shedding light onto live molecular targets. *Nat. Med.* 9:123-128.