FAD/NADH の蛍光強度比を用いた心臓細胞中のエネルギー代謝による酸化還元状態の可視化*

長谷川 克也¹⁾, 小笠原 康夫²⁾

Visualizing of mitochondrial redox state in heart by the ratio of FAD/NADH fluorescence intensity

Katsuya HASEGAWA and Yasuo OGASAWARA

ABSTRACT

Mitochondrial redox state in cardiac muscle was visualized by the ratio between fluorescence intensity of FAD and NADH. The ratio of FAD to NADH is an effective index for quantitative analysis of the redox state. Their concentration can be identified by their identical fluorescence properties with different excitation wavelength. Quantitative measurement is difficult to conduct imaging mitochondrial NADH as an index of the redox state, because of fluctuating condition during its measurement. Traditional approach with two cameras for observing fluorescence of each chemical substance had a problem of the parallax. Our new concept is taking two image data of FAD and NADH by single camera. Our system is composed of an EMCCD camera and two excitation light sources for FAD and NADH. The ratio between fluorescence intensity of these two successive video image data of two substances were processed every 1/15sec, and displayed on a monitor screen in real time together with heart image. Performance of this system was successfully demonstrated with rat hearts.

Keywords: Mitochondrial redox state, FAD/NADH ratio

1. はじめに

臨床医学において心臓手術などにおける組織・細胞の酸化還元状態を観察すると、手術の継続可否などを判断するのに重要な情報を与える。梗塞や運動などの影響で、生体組織の酸素濃度が低くなると NADH (reduced nicotinamide adenine dinucleotide, 還元型ニコチンアミドアデニンジヌクレオチド) が多く生成される。これまでの研究では励起光として紫外線を照射し、NADH の蛍光強度を観察することで梗塞部位の確認などがなされてきた。

しかし、NADH の蛍光像を撮像して解析すると、生体組織の酸化還元状態の変化に起因した NADH 映像の変化とともに、撮影状況の変化によるアーチファクトも発生し、細胞内の酸素濃度低下といった動的現象を NADH の発する蛍光像により定量的に評価するのは難しい。

そこで本研究では、撮影状態の変化による影響を排除し、心筋細胞のミトコンドリアの酸化還元状態を可視化してその動態観察を可能とするため、NADH の観察とあわせて組織中に酸素が十分な時に多く存在する、FAD (flavin adenine dinucleotide, フラビンアデニンジヌクレオチド) の蛍光像を撮影し、NADH の蛍光強度との比をもとめて画像とした。この方法により心臓細胞中の酸化還元状態を解析することの妥当性を検討した。NADH と FAD の 2 つの化学種は異なる波長の励起光により蛍光を発する。2 つの蛍光像を撮影するには 2 台のカメラを用いる方法や、波長選択を行う装置を用い 1 台のカメラにより撮影する方法を用いる方法などがあるが、複数台のカメラによる撮影では光学的視差が解析誤差要因となり、波長選択装置等を用いる場合は機器構成が複雑化する欠点があった。そこで本研究では、1 台のカメラにより時分割で 2 波長の蛍光像を撮像し、これにより得られた情報を動的に画像として提供するシステムを開発した。

臨床応用を目的としているが、本稿ではシステムの動作

* 原稿受付 2010 年 4 月 8 日

1) 正会員 宇宙航空研究開発機構宇宙科学研究所 (〒229-8510 神奈川県相模原市由野台 3-1-1)

2) 非会員 川崎医科大学

検証のためにラットの心筋の酸化還元状態の動的観察をした結果を報告する。

2. 生体酸化還元反応の可視化計測の概要

本研究では心臓細胞におけるエネルギー代謝の中で生じる酸化還元状態を可視化する手段として、生体細胞中で酸素と代謝基質の反応からエネルギーを産生するミトコンドリアに含まれる酸化還元酵素(oxidoreductase)の蛍光を用いる。ミトコンドリアは細胞内で起こる酸化還元反応の大部分を行い状態に応じた平衡状態への変化する反応は速い。

エネルギー代謝における酸化還元反応は酸化還元酵素と補酵素が重要な機能を持つ。酸化還元酵素は生体の細胞の活動を維持する酸化還元反応を触媒する酵素で、生体内には様々な酸化還元酵素が存在しているが、本研究では酸化型の FAD および還元型の NADH の 2 種類の酸化還元型酵素の補酵素を利用する。補酵素は複合たんぱく質である酵素分子の非たんぱく質部分のことで、酵素作用に寄与する補欠分子族である。

2.1 FAD (flavin adenine dinucleotide)

FAD は生体内の代謝基質分子の酸化還元反応での主要な電子供与媒体であり、分子式は $C_{27}H_{33}N_9O_{15}P_2$ (分子量 782.56) である。この酸化型の担体分子を FAD と呼ぶ。リボフラビン(ビタミン B₂) が生体内でリン酸化されリン酸リボフラビンとなり、アデニル酸と結合して FAD を生成する。FAD は励起光として 435nm に吸収極大をもち、発する蛍光の中心波長は 595nm である。

FAD は細胞中の酸素濃度が高い時に多く生成される。生体組織に酸素が十分供給されているときにその蛍光強度は強く、酸素が多い部位ほど明るい蛍光像が撮影される。

検証実験中に呼吸器が正常に機能しているときは、細胞へ酸素が十分に供給され好気性反応が優位となり FAD の蛍光が強い映像となる。

2.2 NADH

(reduced nicotinamide adenine dinucleotide)

NADH は FAD と同様に酸化還元反応の際の電子媒体の一つで、分子式 $C_{27}H_{27}N_7O_{14}P_2$ (分子量 663.42) で、NAD の還元型の分子が NADH である。梗塞時や運動時など酸素が不足した状態でこの濃度が増加する。NAD は酸化還元反応で水素を受け取り、NADH に還元されると吸収波長が 340nm 付近で極大となり 535nm 付近蛍光を発する。

NADH は FAD とは反対に生体細胞中に酸素が少なくなったときに蛍光強度が増加するため、実験では呼吸器を止め細胞へ酸素の供給が不十分となったときに酸素が少ない部位が明るく撮影される。

2.3 FAD/NADH の蛍光強度比による酸化還元状態の評価

生体組織・細胞中では動的な酸化還元反応が起こっており、実験中に観察している部位の酸化還元状態に応じて FAD と NADH の濃度がきまる。本研究における観察対象の FAD、および NADH は TCA 回路(クエン酸回路)により生成されるが、回路全体の反応は極めて早く、後述のすとおりに本研究のシステムではサンプリングが 1/15sec であり事実上タイムラグなしに細胞の酸化還元状態を観察可能である。

Tatsuya Kajita 他、(2000) 2) の先行研究では NADH のみの観察により静的な状態での酸化還元状態の観察を行い酸化還元状態の観察に成功している。しかしながら、前述のとおりに NADH の蛍光像のみの観察では、酸化還元状態の変化による NADH の変化と、被写体の移動などによる映像強度の変化が判別不能である。特に生体の動的観察では心臓の鼓動によって心臓表面は常に拍動しているため、励起光のあたる角度やレンズの合焦点との位置などの撮影状態が変化し定量的な観察を難しくする。一方、本研究における 2 波長同時観測では NADH と同位置に存在する FAD も同じ撮影条件の変化の影響を受け、上記の外乱があってもその比は酸化還元状態を安定して示す。そのため FAD と NADH の蛍光像を撮影し、その点での比を求めることで、酸化還元状態の分布や時間変化を安定して評価することが可能となる。

3. システム概要

3.1 多波長蛍光観察システム

本システムの信号系統図を Figure 1 に示す。FAD および NADH の蛍光は微弱であるので、微弱光の撮影に有利な EM-CCD カメラ (Electron Multiplying Charge Coupled Device) を使用した。映像信号は NTSC で出力され、ビデオキャプチャーボードを介し画像処理用 PC に送られる。映像信号は同時に Frame Synchronize Signal Generator に入力されフレーム同期信号が取り出される。

フレーム同期信号は Fluorescence Excitation Controller に入力され、カメラのシャッタータイミングに同期させ FAD 用励起光 (460nm) と NADH 用励起光 (360nm) を交互に点灯させる。

撮影に用いるカメラ出力の NTSC 規格の映像は 30fps であり、交互に撮影される NADH と FAD の映像はそれぞれ 15fps となる。FAD と NADH の映像相互の強度比を演算することで酸化還元反応の状態を 15Hz で画像情報化する。

演算された結果をディスプレイ上に表示し、心筋とその周囲の組織の酸化還元状態の像を 15fps で可視化する。実験に用いるラットの心拍数は約 180 拍/分=3 拍/秒であり、15fps の画像情報によれば 1 拍中の変化の観察も可能

である。

本システムを臨床に用いる場合に、正常なヒトの心拍数は 60～90 拍/分＝1～1.5 拍/秒であり、15fps は 10～15 サンプル/拍となり十分な時間分解能を有している。

Figure 1 Signal Diagram

3.2 励起光源

本システムでは、FAD, NADH の 2 つの蛍光を撮影するため、2 波長の励起光を必要とする。励起用光源は点・消灯の立ち上がり、立ち下り時間特性を重視し LED を使用した。2 つの励起光による蛍光映像強度の比により酸化還元状態を評価するため、両蛍光映像の撮像条件はほぼ同一である必要がある。

励起光を発生する LED を同心円状に配置し、FAD および NADH 用の励起光の照射条件が同一になるようにした。

また、蛍光像の強度比を解析するため、撮像対象に対する光源の相対的な位置の違いによる影の相違は誤差の要因となるため、多数の LED をカメラの撮影レンズを中心に円形に配列することで影の発生を防止し、照明に起因する映像解析誤差を抑制している。

本研究に使用している励起 LED 光源の一例を Figure 2 に示す。

Figure 2 Excitation LED

図において点灯しているのは FAD 蛍光像撮影時の励起光 LED である。NADH 蛍光像撮影時には図中の点灯している LED は消灯し、暗部に配置された LED が紫外線を発光する。

FAD と NADH の蛍光強度は使用する LED とカメラ等の撮影条件により変わるが、光源を作成する前に生体組織に含まれる濃度の FAD と NADH の標準試料を用い後述する校正作業を行い、ほぼ同じ強度の蛍光像が得られるように紫外線 LED と青色 LED の数と点灯電流をきめた。

その結果、Figure 2 に示す光源ユニットでは紫外線との青色 LED の数の比を 4:1 とし、本装置では紫外線 LED 800 個、青色 LED 200 個の計 1000 個の LED を使用している。LED 点灯用の電源電圧を 48V とし、使用電力はそれぞれ紫外線 LED 72W, 青色 LED 18W とした。

3.3 励起光源用 LED

励起光に使用した LED 素子の諸元を Table 1 に示す。励起光源ユニットを製作するにあたり試薬を用い異なる波長の LED により蛍光像撮影を試験し、検出効率の良い発光波長の LED を選定した。使用している LED の発光中心波長は FAD, NADH の双方とも極大吸収波長と異なるが、励起波長スペクトルは比較的広く分布するため、蛍光像を得ることができる。LED には様々な波長の素子があるが、実効的な発光効率を加味すると、この計測系では Table 1 に示す素子と、使用するカメラとの組み合わせで蛍光を検出することがわかった。

Table 1 Specification of Excitation LED

励起分子	形式	中心発光波長	出力 /1 個	製造会社
FAD	NSPB500AS	465 nm	90mW	日亜化学工業
NADH	NS375L-ERLM	375 nm	99mW	ナイトライドセミコンダクター

3.4 カメラ

本システムでは 1/30 秒ごとに FAD と NADH 励起光を切り替える必要があり、励起光の早い立ち上がり立ち下り特性を実現するために光源素子として LED を使用している。励起用 LED の発光強度はさほど高くはなく、蛍光像の強度は微弱である。LED 励起光源による微弱な蛍光像を撮像するため EM-CCD カメラを用いた。

EM-CCD は撮像素子に入射した光を電荷に変換し、CCD が電荷を読みだし部にまで転送するまでに電氣的に電子数を増倍することで感度を向上させる。EM-CCD カメラは電子増倍機能を使うことで通常のカメラと比較して高い低照度条件での撮像が可能な特性を有している。また、従来

から使用されている電子増倍管（イメージ・インテンシファイア）に比べ残像がなく，作動中の焼き付きや電子増倍管の寿命の問題もなく取り扱いが簡単であるという利点がある。

実験では増倍率を4～24倍で使用している．撮影の際に増倍率を上げることでレンズ絞りを絞る事が可能となり，被写界深度が深くなり拍動する心臓にも対応できる広範囲に焦点のあった鮮明な映像を取得することができるが，増倍率の増加により画像中にノイズが大きくなる．そのため被写体となる心臓の曲率や拍動の状態を観察しながら映像の調整を行う．

使用するカメラは設定によりカラーと白黒の撮像モードの切り替えができるが，本実験において蛍光波長は既知であり映像の色情報は必要ないため低照度での撮像感度がより高い白黒撮像モードに設定している．使用したカメラの特性を以下に示す．

撮影装置諸元

日立国際電気製 KP-D E 500

1/2 インチ 33 万画素電子増倍機能付 CCD

最低被写体照度 カラー0.0009 lux

白黒 0.00005 lux

出力 NTSC 30fps

実験時には白黒にて使用

使用レンズ

シグマ光機 VTTV 50mm/F1.3

実験時絞り値 F5.6

f500mm close-up lens 使用

撮影時はレンズ前面に2つの蛍光（NADH535nm, FAD595nm）が透過する透過波長帯域をもつバンドパスフィルタを取り付け，計測に不要な波長の光を遮断し撮影した．

3.5 校正

本研究ではFADおよびNADHの絶対濃度を測定するシステムではなく，FAD/NADHの蛍光比から相対的に酸化還元状態変化を相対的に表示させることを目的としている．しかし，濃度と蛍光強度などの装置の特性を調べるた

Figure 3 FAD Reagent for Calibration

め試薬により映像校正を行った．Figure 3 に校正時の映像の一例を示す．図はFADの試薬を撮影したものであり，Table 2のとおり濃度調整をした．

映像校正は実験に用いる励起光を使用し試薬の蛍光を撮影する．Figure 3 の映像は濃度に従って蛍光強度の変化が確認できる．観察対象の濃度と撮影される蛍光強度の関係は，シャッター速度，レンズの絞りおよびEMCCDの増倍率により決定される．FAD および NADH 溶液は透明であり取得される蛍光強度は観察している液の厚みにも影響されるため，溶液濃度の定量観察を難しくしている．

また，同条件でNADHによる校正を行い映像機器の特性を把握した．

Table 2 Concentration of Reagent (Figure 4)

No.	1	2	3	4	5	6	7
濃度	1	1/3	1/10	3/100	1/100	3/1000	1/1000

Unit: mM

3.6 解析アルゴリズム

映像は視差を発生させないために1台のカメラにより撮影し，FADとNADHの映像を交互に連続で撮影する．NTSC信号には交互に切り替わる一連の映像として出力される．

この信号を通常のモニタに出力すると人間の視覚では明暗の映像が加算された映像としてとらえられる．酸化還

Figure 4 Image processing flow diagram Display calculated Image data

元状態の解析のためには連続した映像を FAD と NADH の蛍光像に分離し、それぞれを時系列で処理しなくてはならない。そのための映像解析フローを Figure 4 に示す。撮影された映像の画像ピクセルの強度は PC 内部で 1 フレームごとに数値に変換された後に、偶数フレームと奇数フレームで識別され FAD 映像と NADH 映像に分けられる。FAD/NADH の蛍光強度比を計算するために、演算に適した数値範囲になるように数値補正を行う。また、計算結果を画像変換した時に見やすい画像となるように画像の演算補正を別に行う。それぞれの補正を行った後に演算し、その結果を映像に変換しディスプレイ上に表示する。

4. 実験

本研究においては臨床に用いる前段階として、システムの機能を検証するためラットを用いて実験した。本研究は動物を使用する実験のため、宇宙航空研究開発機構および川崎医科大学における動物実験規定に従い、実験動物に対する苦痛等に配慮し実験を行った。

麻酔手順

(1) セボフルランによる吸入麻酔

セボフルラン (sevoflurane, 丸石製薬株式会社) 2ml

(2) 注射剤による持続麻酔

ソムノペンチル, 成分名: ペントバルビタールナトリウム, 共立製薬株式会社
ソムノペンチル 0.1ml + 生理食塩水 0.1ml 尾静脈から注射

ラットは上記の手順で麻酔を施したうえ手術台に固定し呼吸器をセットする。開胸手術を行い心筋組織の蛍光画像観察に障害となる心膜等を除去し、心臓を露出させる。撮像対象のラットの心筋に合わせ励起光源、カメラ等の撮影システムをセットする。励起光源先端部分から被写体までのワーキングディスタンスは約 30cm で、心臓の可動範囲等も考慮し撮影範囲の 50% 程度に心臓の像が写るよう画角を調整する。

解析のため画像中の心臓を観察領域に設定し、関心領域内の FAD および NADH の蛍光強度の平均値が 1:1 となるように映像を調整する。この状態を標準状態とし、標準状態からの映像変化により酸化還元状態の変化を表示する。

Figure 5 は撮影対象のラットに励起光用照明器材およびカメラがセットされた状態である。図は準備中の記録のため周囲の外光をそのままにして撮影しているが、実験中は外乱光の影響を無くするため器材の準備終了後周囲の照明を消灯し励起光源のみで撮影する。

Figure 5 Configuration of FAD/NADH Fluorescence Imaging System

評価実験では呼吸器によりラットの呼吸を確保し心筋細胞に酸素が十分な状態から実験をはじめ、以下に示すようなプロトコルにより条件を変更して撮影し、それぞれの状態での酸化還元状態を観察・評価する。

評価実験プロトコル

- (1) 定常状態で 120 秒間 FAD/NADH の撮影を行いコントロール映像とする。
- (2) その後呼吸器を停止し心筋細胞に酸素が少ない状態として 120 秒間撮影する。
- (3) 呼吸器の運転を再開し心筋細胞への酸素供給が回復した状態で撮影する。

ラットの生理状態と心臓の機能を監視しながら、上記の手順を数回繰り返して映像データを取得する。

5. 実験結果

5.1 FAD, NADH 蛍光画像

Figure 6 (a) に得られた FAD 蛍光映像, Figure 6 (b) に NADH 蛍光映像を示す。この映像は評価プロトコル①の状態のコントロール映像である。FAD 画像では観察する細胞活動の酸化状態が優位になるほど明るくなるため、明部が細胞中に酸素が多い状態といえ、同様に NADH 蛍光映像は NADH が多いほど明るいことから、Figure 6(a) とは反対に明部が還元状態が優位となり結果として酸素が少ない事を示す。

両画像は 1/30 秒の時間差で連続した画像である。励起光の違いにより映像に差が生じているが、ラットは麻酔下で手術台に固定されているためほとんど動かず、さらに心臓の鼓動に対して十分に早いサンプリングを行っているため、ほぼ同一画面の異なる蛍光波長像を撮影できている。

Figure 6 (a) FAD Image

Figure 6 (b) NADH image

両映像を比較すると, Figure 6(a)のFADの映像と比べ, Figure 6(b)のNADHの映像はコントラストが低い. Figure 6の両画像は, 画像処理をしていない画像を示しているが, 前述のとおり最終的な演算結果が最適となるように画像の階調の処理を行ってから演算する.

Figure 6 (a), (b)の両画像をみると, 心臓中心部の明部に差が見られ, 酸化還元反応の指標であるFADとNADHの濃度分布に差があることがわかる. Figure 6 図中の点線 a-a', b-b' の輝度をそれぞれ Figure 7(a)および(b)に示す. 縦軸に輝度を 256 階調で表した数字, 横軸は a-a' b-b' のピクセル位置を示す. 両チャートとも心臓周囲部の映像は暗く沈んでいる. Figure 6 の映像, および Figure 7 のチャートでは心臓周囲の部分は暗く, FAD および NADH の蛍光輝度は低い, FAD/NADH の比をとることで NADH 単独では解析できない心臓周囲部の酸化還元状態の変化を評価することができる.

(a) a-a' FAD Image

(b) b-b' NADH Image

Figure 7 Line Intensity of Figure 6

5.2 FAD/NADH の比の解析画像

Figure 8 に酸化還元状態を示す FAD/NADH の比の映像の一例を示す. これは前出の Figure 6(a)および(b)を演算して得られた画像である. Figure 8 の明部は FAD が多く酸化反応が優位な部位, 暗部は NADH が多く還元反応が優位な部位を表している.

Figure 8 Processed Image of FAD/NADH Ratio
Analyzing Image (Control Image)

H: Heart A: Atrium V: Ventricle

F: FAD rich area N: NADH rich area

図中の H の点線で囲まれた部分が露出した心筋である. 心筋の表面には明暗の分布がみられ, 経時的には脈状に明部が表れる. F に示す部位では FAD が多く存在し観察している細胞中に酸化反応が多く占められ, 結果として細胞中に酸素が多い状態を示す. また, N に示す心室付近に大きく暗部が見られ, NADH が多く観察細胞中で還元状態へと変化し, 酸素濃度が低い部位である. Figure 8 の解析映像は Figure 6 の FAD と NADH 輝度が等しければ同じ輝度を表示し, 仮に厳密な校正をおこなない Figure 6 の画像が定量的な濃度を示しても, その解析画像の濃淡は比をとるため無次元となり定量性を示さない.

評価プロトコル(2)の呼吸器を止めた状態の映像を Figure 9 に示す. 図は呼吸器を止めて 60 秒経過した状態で, 呼吸器を止めたことで心筋細胞に酸素の供給が不十分となるため, 細胞中の還元反応が支配的となり, NADH が増加した. 解析画像は Figure 8 に比べ全体的に暗く変化し, 特に画像関心領域である心臓に強く変化が現れている. Figure 9 は Figure 8 とほぼ同一の映像であるが, 心臓の拍動などで完全に同一な映像ではない.

Figure 9 Processed Image (NADH Rich)
60sec after the artificial respirator is stopped

Monitoring the Changes of Interstitial pH and FAD /NADH ratio by Fluorescence Spectroscopy in Healing Skin Wounds. : Photochemistry and Photobiology. 2006.82 pp. 793-797

- 4) プラクティカル医学略号辞典 第5版, 南山堂
- 5) 南山堂 医学大辞典, 南山堂
- 6) 基礎生化学 第2版, Donald Voet 他, 東京化学同人, 2010
- 7) Molecular Biology of the CELL, 細胞の分子生物学 第2版, Bruce Alberts 他, KYOIKUSYA, 1987

6. まとめ

1台のカメラでFADとNADHの蛍光像を撮影し、その演算処理データから酸化還元状態に関する可視化情報を表示することに成功した。Figure 6(a)および Figure 6(b)の映像の観察では暗くFADとNADHの存在を確認できなかった部分や、両映像の差が見られなかった部分も、画像ピクセルの強度の比をとることにより酸化還元状態を評価することができた。

FAD または NADH 単独の蛍光画像から酸化・還元状態を評価する場合よりも、FAD/NADH 両方の蛍光画像を撮影し演算処理してその結果を画像として提示することにより、生体組織の酸化還元状態の変化を実時間で適切に可視化し画像として表示可能である事がわかった。拍動する心臓組織の状態の動的な評価画像を得るなど、臨床応用で求められる機能を本システムが実現できることを実証できた。

謝辞

本研究を遂行するにあたり宇宙航空研究開発機構宇宙科学研究所工作工場, 工作員 河本正光氏に協力をいただいた。ここに感謝の意を表す。

本研究の一部は「科学研究費補助金基盤研究(B)-19300166」により実施された。

参 考 文 献

- 1) 長谷川克也, 川崎朋実, 小林清和, 筒井雅夫, 可変波長フィルタを利用した固体推進薬燃焼表面の解析技術の開発:2007年火薬学会秋期公演要旨集, pp39-40
- 2) Tatsuya Kajita, Takashi Matsumoto, Yasuo Ogasawara, Seiichi Mochizuki, Hiroshi Nakamoto, Hiroyuki Tachibana, Fumihiko Kajiya: Heterogeneity of Microcirculatory Flow and Mitochondrial Redox State in Isolated Rat Hearts during Dysoxia. :Heart Vessels, Supplement 13(2000) p. 37
- 3) Michal Mokry, Peter Gal, Boris Vidinsky, Jarosiav Kusnir, Katarina Dubayoba, Stefan Mozes, Jan Sbo, In Vivo