Lights, camera, infection

照明、スタンバイ! カメラ、スタンバイ! 感染開始、アクション!

Nature Vol. 460(568-570)/ 30 July 2009

多光子顕微鏡法の登場により、免疫学者は、細胞レベルでリアルタイムの感染プロセスを観察し、記録できるようになった。Jeanne Erdmann がその「撮影現場」取材した。

ワシントン大学医学系大学院（米国ミズーリ州セントルイス）の Mark Miller は、免疫学者である。彼の研究室には、黒く厚いカーテンで覆われた顕微鏡室がある。これからその中で、ある「アクション映画」の撮影が始まろうとしていた。Miller は研究チームの主幹の 1 人である Vjollca Konjufca とともに、多光子顕微鏡のいろいろな設定をざっと点検し、温めた試料台の上に載っている鎮静処理済みのマウスを入念にチェックした。準備が整い、Miller がスキャナーのスイッチを入れると、コンピューターのモニター画面には、赤、青、緑色の点滅画像が現れた。「ちょうどそこです」、と彼が示した先には、青色に

光るサルモネラが、マウスの小腸内壁にある赤色に標識された指状の絨毛じゅうもうの先端近くに集まっていた。サルモネラはまるで、山すれすれに飛び回るヘリコプターのようなものである。時刻は昼を少し過ぎたくらいだったのだろうか。我々はその後 1 時間、「観客席」につき、これらの細菌を見つめ続けた。Miller の実験もよく似たほかの実験も、カーテンの陰で見つめる、限られた「観客」だけでなく、免疫学者というもっと広い層の「観客」の心を魅了してやまない。

10 年足らず前までは、Miller をはじめとする免疫学者は、試験管内で感染プロセスを研究していた。培養ディッシュ上で、病原体と細胞を混ぜて相互作用させてい

たのである。しかし、こうしたシミュレーションには限界があった。なぜなら、そうした条件下の細胞は、動物園で飼育されている動物のようなもので、その挙動に影響を及ぼす本来の環境から切り離されていて、生体での挙動はわからないからである。そこへ登場したのが、多光子顕微鏡である。これによって、生きている組織の深部を観察したり、「野生状態」の細胞のようすを「ライブ」で観察したりすることが可能になった。多光子顕微鏡は、特に、免疫系の研究に役立つ。免疫系を構成する免疫細胞は、体内のいろいろな環境を動き回り、病原体や周囲の細胞と相互作用するからである。

マウスの腸内で、好中球（緑色）はおおよそ1時間にわたって血管（赤色）からあふれ出てサルモネラ（青色）と戦う。

Miller は、多光子顕微鏡法を例えてこういう。「我々免疫学者は、望遠レンズを使ってサバンナのガゼルの群れを研究する動物学者のようなものです。実際に目で観察した行動から、対象物の機能を推測するわけです」。さらに、「多光子顕微鏡の長所は、自分の探すものが前もってわからなくても構わないことです。それ自身が光って、ありかを示してくれるのですから。予想もしなかったものが見つかることもしょっちゅうです」と語る。その意外なものの1つが、感染後の数分もしくは数時間という、症状が現れるずっと前の段階で起こる劇的な変化だった。その「ドラマ」は研究者をスクリーンに釘付けにした。「目を見張るような現実が、そこにありました」と、この技術を用いて研究している米国立衛生研究所（メリーランド州ベセスダ）の免疫学者、Ronald Germain は話す。

現在、Miller の研究室は、多光子顕微鏡を利用し、生きている動物での感染をリアルタイムで観察する研究において、世界をリードする研究室の1つとなっている。

衣装とメイク

午前11時、撮影に先立ち、いつものように Konjufca は自分の実験を開始した。用意したのは、免疫系の数種類の細胞（好

中球、リンパ球、樹状細胞、マクロファージなど）が蛍光顕微鏡で発光するように遺伝子操作した1匹のマウス、そしてやはり蛍光で標識したおおよそ1万個のサルモネラ。彼女はサルモネラを注射器で吸引し、マウスの腸内に注入した。また、赤色の蛍光標識も腸内に注入し、腸の絨毛表層の上皮細胞に取り込まれて発光するようにした。サルモネラが体内に侵入して食中毒を起こす仕組みを調べるプロジェクトの一環として、彼女はこうした実験を週に2回ほど行っている。

Konjufca は、この研究が家畜用経口ワクチンの製造に役立って食料の安定供給につながればと考えており、感染プロセスで起こるさまざまな事象はどんな順序で起きているのか、正確に解明したいと思っている。サルモネラはどうやって腸の内壁を破壊しているのだろうか。さまざまな免疫細胞はどのようにして感染現場に駆けつけるのだろうか。腸絨毛の樹状細胞はどうやってサルモネラの一部を飲み込んで処理しているのだろうか。そして、こうやって分解されて抗原の形になったサルモネラの一部を、どの細胞がリンパ球や脾臓へ運ぶのだろうか。「どの細胞が、いつ、どこへ行くのかは、必ずしもわかっていないのです」と Konjufca はいう。

Konjufca は経験から、野生型の菌株と、変異によりさまざまな毒性遺伝子をもっている菌株の両方を研究に用いている。彼女によれば、ワクチン用の無毒な株を作るためにサルモネラに変異を導入すると、菌が腸内に侵入して免疫系を刺激する能力が、かなりの確率で低下するのだという。めざしているのは、毒性はないが、長続きする強い免疫応答を引き起こせるサルモネラの菌株の作製だ。Konjufca は、いろいろと変異させた菌株に対するマウスの応答を観察して、この問題を解明しようとしているのだ。

この研究については、まだ何も発表されていない。Konjufca は現在、注入すべき菌体数など、技術的な細かい点をさらに詰めているところである。数が少なすぎると、感染に最初に応答する好中球などの白血球が十分動員されない可能性があり、また逆に多すぎても、生理的応答をそっくり模倣できないと考えられる。さらに、サルモネラの注入から観察開始までの適切な待機時間を探り出す必要もある。3～5時間待った場合、小腸は既に刺激を受け終わっている可能性があり、そこで起こった「事件」を見逃しかねない。現在のところ、2時間あれば十分だと彼女は考えている。作業の半分以上は、こうした細かい技術的な問題を解決することで占められている。しかし、これをやらないと何も得られないのだ。

特殊効果

Konjufca は現在、多光子顕微鏡法を日常的に使っているが、この技術がデビューした1990年当時、それは画期的なことだった¹。標準的な共焦点顕微鏡では、レーザー光の光子1個が蛍光色素分子（フルオロフォア）とよばれる蛍光標識内の電子を1個励起し、その電子が基底状態に戻るときに光を発する。しかし、蛍光色素分子を励起させるのに必要な高エネルギーの光が色素分子をすぐに分解して、細胞にダメージを与える。そこで、もっと波長

の長い光の光子を2個以上、蛍光色素分子に同時に到達させて励起させるという革新的方法を編み出したのが、現在マックス・プランク医学研究所（ドイツ・ハイデルベルク）で研究するWinfried Denkだった。長い波長なら細胞に与えるダメージは少なく、しかも免疫学者にとって非常に重要なことに、光子は組織内の200マイクロメートル以上の深さまで普通に到達できるのだ。

生きた状態の脳をもっと奥深くまで見たがっていた神経生物学者は、すぐさまこの技術に飛びついた。もちろん、免疫学者も遅れをとってはいない。Millerは2000年代初め、この技術を使い始めた。当時彼は、カリフォルニア大学アーバイン校のMichael Cahalanの研究室でポストドクとして研究しており、同校にいた神経生物学者のIan Parkerと共同研究をしていた。Millerはリンパ節内の区画を観察していた。そこは、リンパ球の一種であるナイーブT細胞（未感作のT細胞）が抗原を認識して活性化される、その後の感染に備えるうえで必須の段階が起こる場所である。彼は、マウスから切り取ったリンパ節でParkerの多光子システムを試したとき、とにかくびっくりした。それまで彼は、T細胞はサイトカインという化学物質の濃度勾配に沿って、足並みをそろえて移動するものだとばかり思っていた。ところが彼が実際に見たT細胞は、非常にすばやく目の前を通り抜けていった。「T細胞がこれほど速く、しかもランダムに移動するなんて、にわかには信じられませんでした。そのうえ細胞は、しっかりした目的をもって見えて、活発に動いていました」と彼はいう。

Millerはこれらの画像を用いてT細胞の移動速度を計算し、分速25マイクロメートル以上の速度にまで達する場合があることを示した。彼はまた、このランダムな動きには目的があると考えた。つまり、1個のT細胞が広いテリトリー内を歩き回って、自分の認識する正しい抗原を

もつ「抗原提示細胞」を見つけ出すのに、こうしたランダムな動きが役立つというのだ。この研究成果は、2002年、*Science*に発表された²。この号には、Millerの研究を含めた3本が、T細胞の動態を最新の顕微鏡法で調べた論文として連報で掲載された^{3,4}。

Millerの推測によれば、当時、免疫学系の研究室で多光子顕微鏡を使っていたのは、せいぜい数か所程度だったろうという。研究者らが感激したのは、観察するだけで、宿主の防御機構を作り上げる細胞の動態をとらえられる点だ。「多光子顕微鏡は、免疫応答の発生経緯について免疫学者が抱いていた従来の考えに、大変革をもたらしました」と、ハーバード大学医学系大学院（米国マサチューセッツ州ボストン）の免疫学者Ulrich von Andrianはいう。

ライブ映像

今日では、どの大学の免疫学部や学科も多光子顕微鏡を既に導入したか、あるいは導入を強く希望しているようだ、とMillerは話す。「私はびっくりなしにアドバイスを求められていますよ」。また、免疫学研究の多くは、免疫細胞そのものを調べる段階から、感染プロセスの全体像を調べる段階に移ってきている。そうなる実験は一段と複雑になる。心臓のポンプ機能や腸の収縮作用など、生体の機能から切り離されても組織はそのまま保たれていなくてはならず、病原体は周囲の組織を乱すことなく注入されなくてはならないからだ。

カロリンスカ研究所（スウェーデン・ストックホルム）の微生物学者Agneta Richter-Dahlforsは、腎臓感染の最初の数時間を観察する手法を習得する際、ラット腎臓のネフロン1個（腎臓の機能単位で、ヒトのまつ毛1本ほどの大きさ）に細菌を注入するため、外科医を加えて実験を行った。このとき得られた映像は、初めて感染をリアルタイムで示した映像の

うちのいくつかであり、この映像によって、細菌が粘膜に付着してコロニーを築くにはわずか2～3個の菌体で十分なことが明らかになった⁵。そして、感染後3時間以内に、ネフロン内の酸素圧はゼロまで下がり、この部位への血流が停止する。「こうした解析をするには、生きている動物個体を使うほかありません」とRichter-Dahlforsはいう。しかし最近では、さまざまな細菌感染の観察が行われている。マウスの足の裏におけるリステリア（*Listeria monocytogenes*）感染も、その1つだ。リステリア感染モデル系は、MillerがポストドクのBernd Zinselmeyerとともに、免疫細胞が感染の初期段階にどのように動員されるかを見るために開発したものである⁶。

話を本日の「撮影」に戻そう。サルモネラを注入してから2時間半後、Konjufcaはケージに近づいて、鎮静処理したマウスをそっと取り出した。そして、顕微鏡の試料台に載せ、できるだけ居心地のよい状態で安定した体温を維持できるように、マウスの体に合わせたサイズのビロードのようなシートで包んだ。Millerがサルモネラを使った研究を始めたのは、2年前のことである。彼が好んで腸内の細菌感染を研究するのは、これがよくある感染ルートだからだ。また、腸内には病原性のない細菌も棲み着いており、免疫細胞がどうやって敵と味方（病原細菌とそうでない細菌）の区別をつけているかを調べることができるのだ。

Millerは、標準型の蛍光顕微鏡をカスタマイズし、およそ50万ドル（約4500万円；1ドル＝90円で換算）という費用で、自分自身の多光子顕微鏡システムを構築した。このシステムは、組織を数百マイクロメートルの深さまで調べることができ、ビデオ並みの速度で映像を記録できる。今日、彼は、顕微鏡の試料台をいろいろ動かして、未消化の食物がほとんどない小腸領域を見つけようとしている。画面には四角い上皮細胞が、絨毛の円弧に

沿って、きれいにそろった歯のように並んでいる。細菌のうち一部は、既に上皮の防護壁を通過し、固有層へ向かう道を見つけていた。固有層は絨毛の底部にあり、樹状細胞やその他の抗原提示細胞が豊富に存在している場所である。

トーキー映画をめざして

感染に際して、上皮で何が起ころのかははっきりわかっていない。考えられる可能性の1つは、サルモネラが上皮細胞に感染してそれを殺傷すると菌が放出され、次に樹状細胞がその菌を飲み込むというものだ。樹状細胞はサルモネラの成分を分解して自身の表面に抗原として突き出し、それによって免疫応答を引き起こされる。もう1つの考え方は、Germainの研究で提案されたもので、樹状細胞は小腸管腔を横切るように突起を伸ばして細菌を探し出すのだという⁷。

Millerは、複数の絨毛について20～30秒間隔の画像をたくさん集めた。そのデータはコンピューターで三次元の微速度映像にまとめられる。午後2時30分、サルモネラの大部分が絨毛の根元部分にある樹状細胞へ達しているのを観察すると、Millerは顕微鏡のスイッチを切り、明かりをつけ、カーテンを開けた。研究チームは、得られたデータを隣室にあるコンピューターに移した。

顕微鏡で、研究者が求めるような完璧な感染プロセスの画像を得ることはできない。またMillerは、「研究生活の間ずっと、分子生物学的手法で問題を考えて解明しようとする研究者も大勢います。そういう人たちは画像化が定量的なものだとは思っておらず、そのため、画像化が有用な情報を与えてくれるとする考え方に抵抗感をもっています」という。しかし、彼をはじめとする多光子顕微鏡法の支持者は、そうは思っていない。彼らによれば、細胞の動く速度や方向、ほかの細胞に接着するかどうか、するならどのくらいの頻度かを測定することで、定量化できるとい

マウスの小腸の絨毛（赤色）で対決する樹状細胞（緑色）とサルモネラ（青色）。

う。ただ、多光子顕微鏡法に足りないのは、なぜ細胞が感染プロセスにおいて特定の挙動を示すのか、という疑問について、さらなる情報を与えてくれる「質的な面」だという。細胞を感染部位まで見届けることに、もちろん価値はある。しかし、感染部位にたどり着いた後、いったい何が起ころのだろうか。細胞はシグナルを伝達するのだろうか。もしそうなら、どうやって伝達するのだろうか。

パスツール研究所（フランス・パリ）の免疫学者 Phillipe Bousso は、多光子顕微鏡の映像をサイレント映画に例えている。つまり、細胞がどうやって動き、相互作用するのかは見ればわかるが、どう生化学的なコミュニケーションをとっているのかを知ることはできないというのだ⁸。この映像に「音」を入れるには、生化学もしくは遺伝学による解析を多光子顕微鏡法と併用することだろう、と彼はいう。同じくパスツール研究所の生化学者 Jost Enninga は、そうした解析法の開発と特

許取得を行っており、その中には、上皮細胞が病原体に出会ったときに蛍光を発するよう設計された解析法もある。もう1つのアイデアは、多光子顕微鏡に細菌の遺伝子発現のリアルタイム観察を組み合わせる、というものである。この方法では、さまざまな時点で組織をばらばらにして解析する。

多光子顕微鏡のもう1つの弱みは、「場面状況」が不完全なことだ。蛍光を発するよう遺伝子操作されていない細胞は、いずれも、黒い背景の中にまぎれて姿が見えなくなってしまう。しかし、von Andrianはこういう。「確かにそこに細胞があることはわかっています。ただ、それらを見られないことが必ずしも不都合だとは思いません。もしすべてのものが見えてしまったら、混乱が生じるでしょうから」。

撮影終了

MillerとKonjufcaは、その日の午後遅くから翌週にわたって実験のビデオを見直

し、以前に撮ったものと比較した。そして、最も絨毛が明瞭なのは最新の映像で、上皮の両側にサルモネラが見られることがわかり、大いに喜んだ。つまり、彼らの設定が正しかったこと、そして細菌注入から撮像までのタイミングがぴったりだったことが証明されたのである。また以前の実験映像から、局所の血管内にある好中球の中には毎秒数百マイクロメートルという速度で突進するものがある一方で、炎症シグナルに応答して速度を下げるものもあることが明らかになった。速度を落としたこれらの好中球は、血管内をのろのろと進んで1か所にたどり着き、ハチの群れがフェンスの割れ目を通り抜けるときのように、そこで血管壁を無理やり通り抜けていくように見える。

次の実験では Konjufca は、もっと長い時間待ってから撮影する予定である。免疫細胞が腸上皮を通り抜ける仕組みや、ど

の免疫細胞がサルモネラ抗原を腸から運び出すのかをもっと詳しく調査したいからである。そして彼女は、肝臓や脾臓まで追跡し、そこでサルモネラ抗原とT細胞や樹状細胞がどのように相互作用するかを調べる予定である。Konjufca は、こうした現象のすべてが、弱毒ワクチン株ではどう違うのかを解明したいと考えている。また Miller は現在、コンピューター研究者とともに、視野外の細胞を追跡するソフトウェアを開発しているところである。多光子顕微鏡の視野は小さく、細胞はうろろうして視野を出たり入ったりするからだ。さらに、細胞が移動している時の挙動を解析したいとも考えている。

しかし、こうした「特殊効果」を抜きにしても、ひとつひとつの映像には、いつも驚きと発見が潜んでいる。それだからこそ、研究が続けられるのだと Miller はいう。「研究の原動力は、研究室で得

られるぞくぞくするような高揚感です。それがモチベーションになっているのです。今日は何が見られるだろうか。こうじゃないかな、とある程度考えていても、予想が外れて本当に驚くことがあるんですよ」。(船田晶子 訳)

Jeanne Erdmann は、米国ミズーリ州ウェンツビルを拠点に活動するフリーランスのライター

1. Denk, W., Strickler, J. H. & Webb, W. W. *Science* **248**, 73-76 (1990).
2. Miller, M. J., Wei, S. H., Parker, I. & Cahalan, M. D. *Science* **296**, 1869-1873 (2002).
3. Stoll, S., Delon, J., Brotz, T. M. & Germain, R. N. *Science* **296**, 1873-1876 (2002).
4. Bousso, P., Bhakta, N. R., Lewis, R. S. & Robey, E. *Science* **296**, 1876-1880 (2002).
5. Månsson, L. E. et al. *Cell. Microbiol.* **9**, 413-424 (2007).
6. Zinselmeyer, B. H. et al. *Inflamm. Res.* **57**, 93-96 (2008).
7. Chieppa, M., Rescigno, M., Huang, A. Y. & Germain, R. N. *J. Exp. Med.* **203**, 2841-2852 (2006).
8. Bousso, P. *Nature Rev. Immunol.* **8**, 675-684 (2008).

多光子顕微鏡による映像は <http://tinyurl.com/n35ufp> および <http://tinyurl.com/mb6l45> で見ることができる。