

図 1. 高分子造影剤の合成

ポリビニルアルコールを主鎖とし、側鎖にガドリニウムキレートを有する高分子造影剤を合成した。

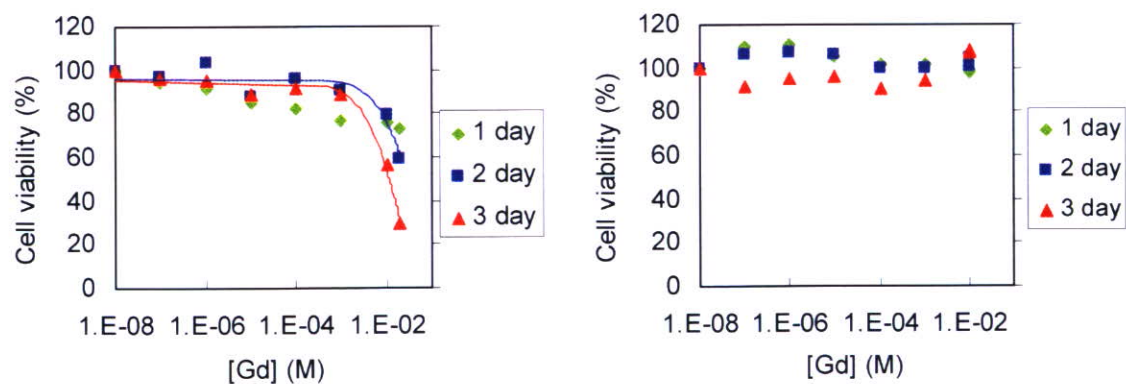


図 2. 造影剤の細胞毒性試験 (a) マグネビスト (b) PVA-DOTA-Gd

市販の造影剤であるマグネビストは、濃度が高い条件で細胞毒性が見られた。本研究で合成した造影剤は同条件でも細胞毒性は見られなかった。

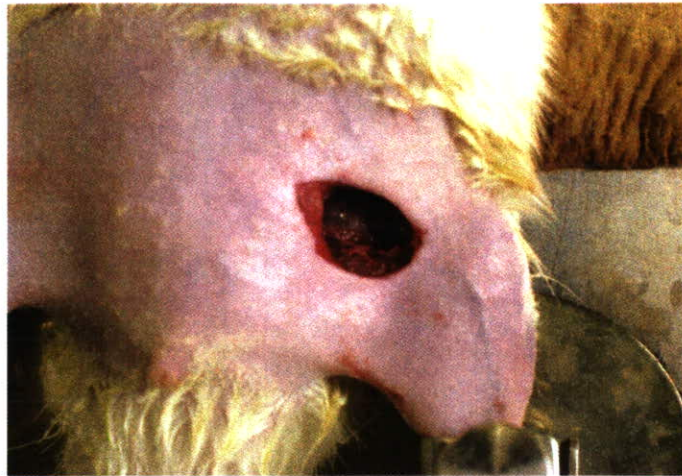


図 3. 下肢虚血モデルラット作製の様子

12 週齢の F344 ラットを用い、3 種モデル(①血管結紮モデル②血管切除モデル③血管塞栓モデル)を作製した。

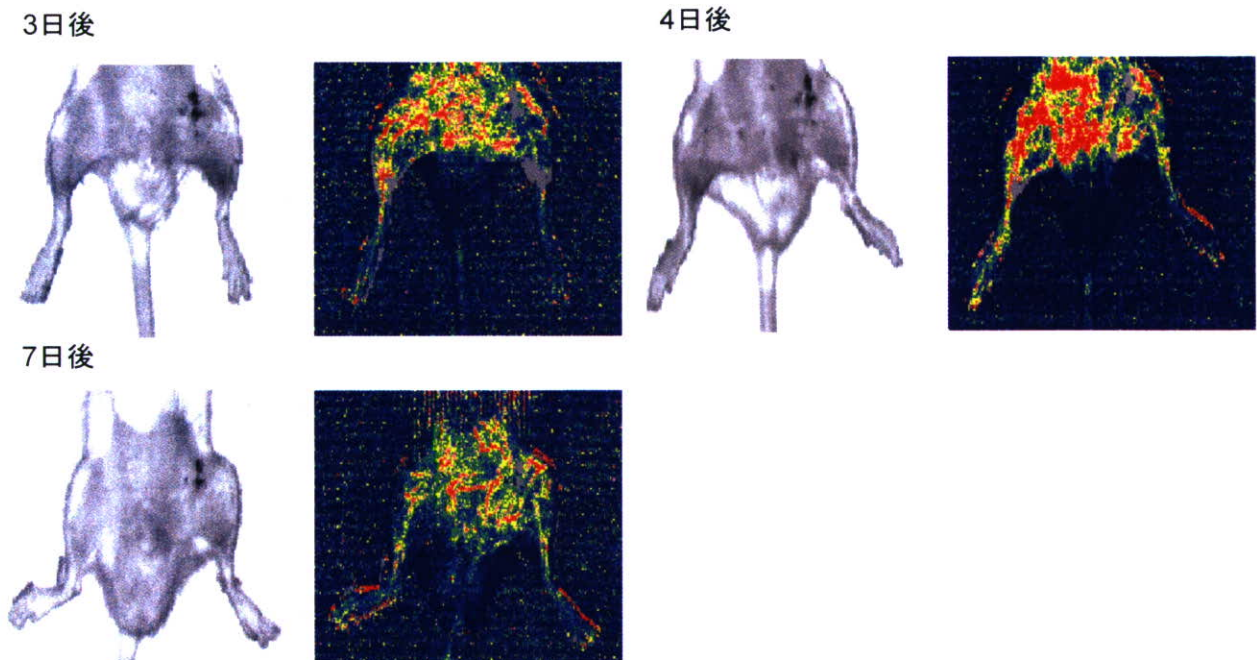


図 4. 血管結紮モデルの回復過程

虚血部作製時では、正常な下肢と比較して血流量の低下が見られたが、1 週間後において、ほとんど同程度の血流量まで回復していた。

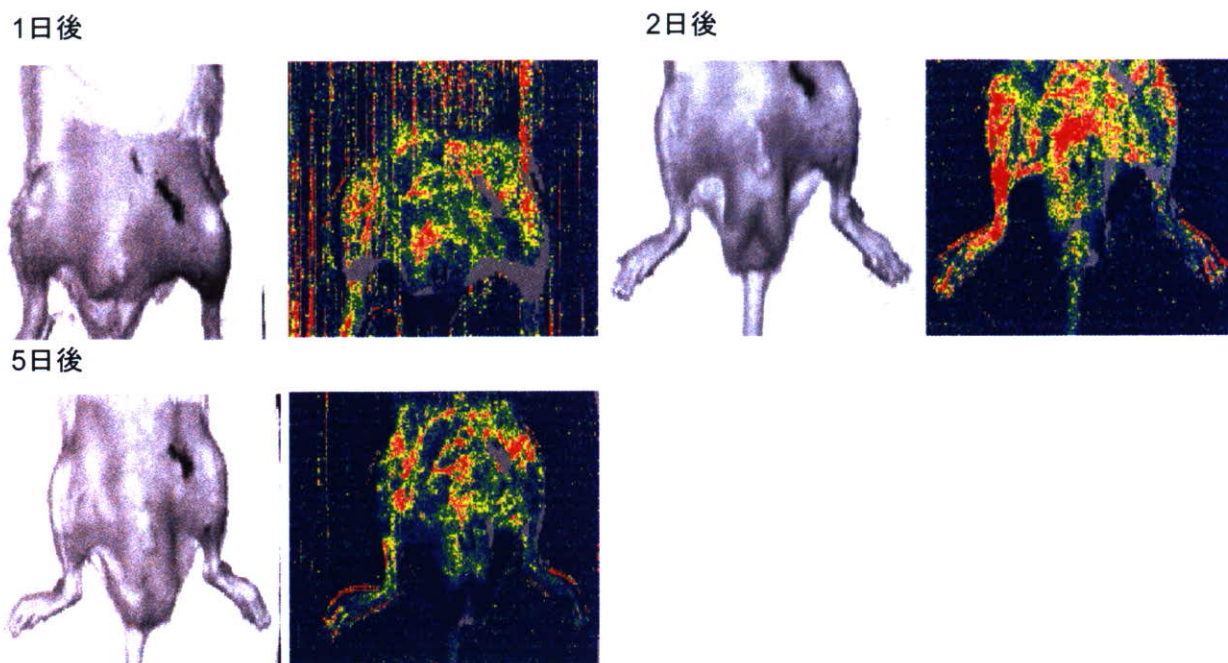


図 5. 血管切除モデルの回復過程

5日後においても、正常な下肢と比較して血流量は低く虚血状態であった。

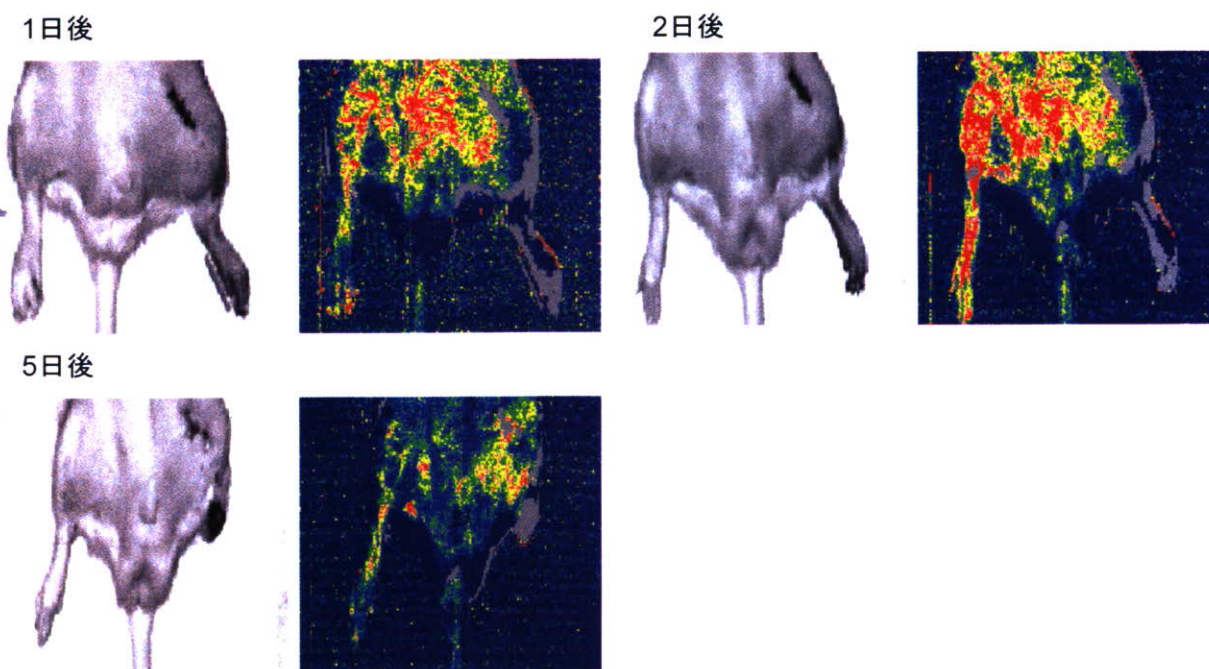


図 6. 血管塞栓モデルの回復過程

モデル作製時において下肢が青紫に変色し、極度の虚血状態であった。また、作成から 5 日目に潰瘍を生じ、壊死に至った。

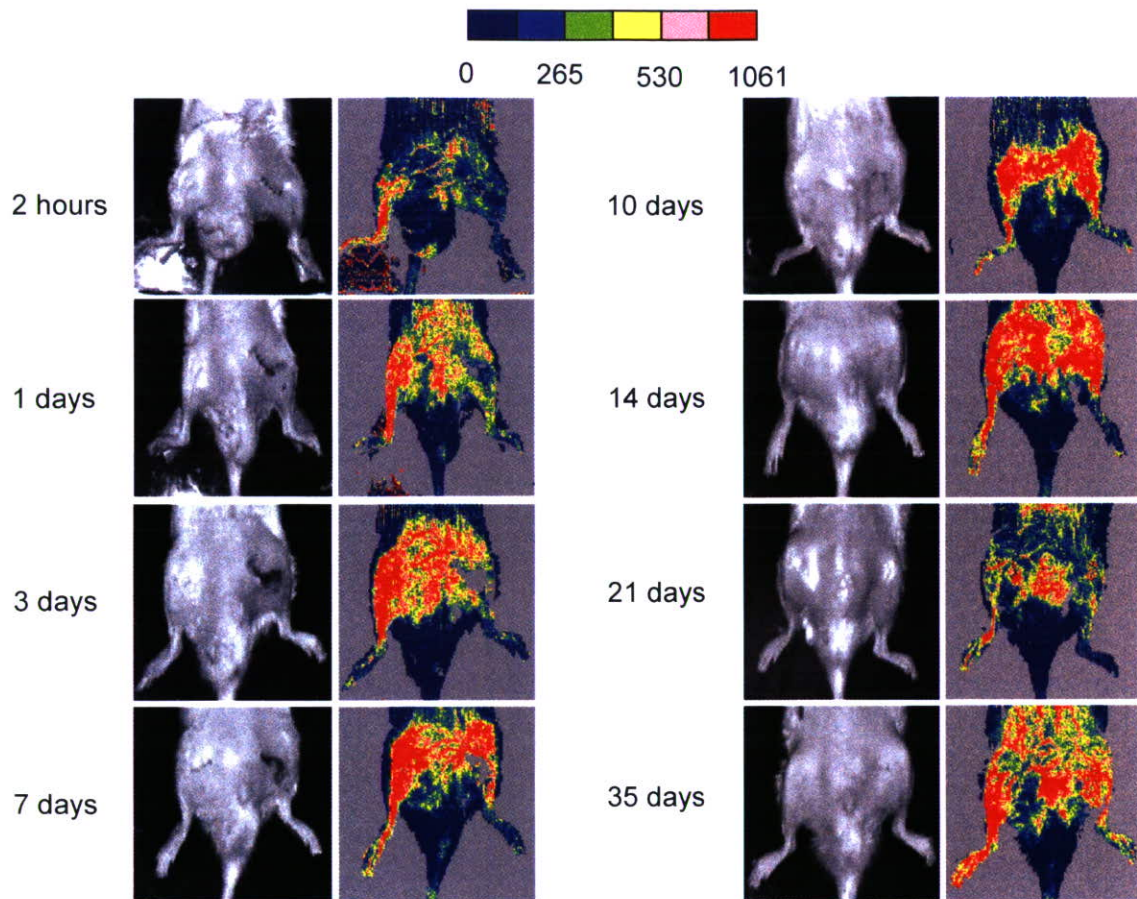


図 7. 血管切除モデルの長期間における経過観察
 日数の経過に従い、下肢虚血部の血流量の回復が見られた。

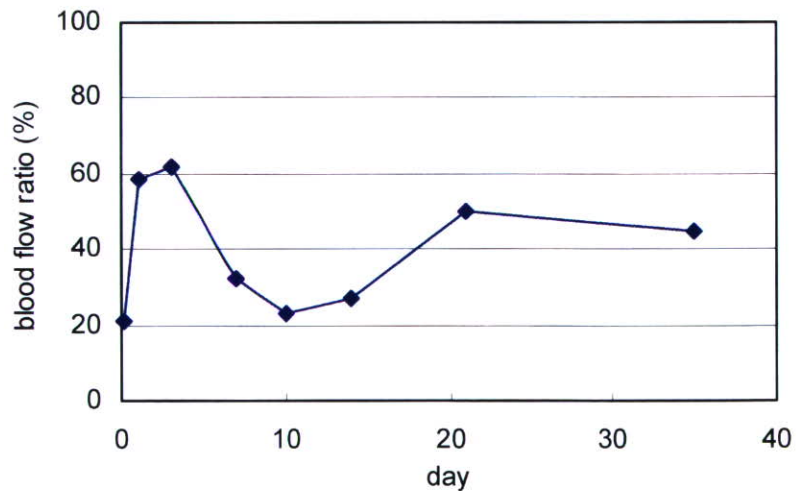


図 8. 正常な下肢(右)と虚血の下肢(左)の血流量を比較検討

虚血モデル作製直後は 20 %程度であった割合が、時間の経過と共に、50 %程度まで回復していることがわかった。

移植細胞の MRI 撮像条件の最適化

分担研究者 飯田 秀博 国立循環器病センター研究所
先進医工学センター 放射線医学部長

研究要旨 合成したポリビニルアルコールを担体とする、細胞ラベル化用の高分子化 MRI 造影剤で標識した細胞の、MRI 撮像を *in vitro* および *in vivo* において詳細に検討した。細胞中の限られた水分子を検出するためには、高分子化造影剤に固有の最適な撮像条件を見出すことが重要である

A. 研究目的

近年の画像診断は、従来の単なる生体の形態情報に基づく診断にとどまらず、疾患の初期における予防診断・生体機能診断へと発展しており、新たな分野として重要視されている。このことは、2003年の米国 NIH のロードマップで、分子・細胞イメージングというキーワードが示されたことが良い例であるといえよう。現在では、画像診断機器 (MRI、CT、PET など) の進歩は目覚しく、画像解析技術・撮像技術・機器の高度化は、研究レベルだけでなく、臨床レベルでも顕著である。

画像診断機器の中でも、MRI は、非侵襲・非破壊的に特定部位を観察できるだけでなく、任意の方向での撮像が可能であり、PET のように大掛かりな装置を必要としないため、汎用性が高いものである。日本における人口 100 万人当たりの MRI の導入状況は、米国や英国など、他の先進諸国より圧倒的に高い状態である (全参加国の MRI の導入状況の

平均は 5.5 台であるのに対し、日本は 35.3 台)。さらに、日本の重点事業として診断・治療システムが採択されていることから、今後、MRI の普及率の増加が見込まれる。

本研究は、移植細胞の可視化を目的としている。MRI 撮像を行いながら、合成された造影剤が有用であるかを判断し、細胞のイメージングについて検討を行った。

B. 研究方法

高分子造影剤として、ポリビニルアルコール (重合度 : 1700、けん化度 : 98 %) を主鎖とし、側鎖にガドリニウムキレートを有するポリビニルアルコール誘導体 (PVA-DOTA-Gd : 側鎖の導入率 8 %) を用いた。細胞として、マウスの胎児皮膚から分離された培養細胞である NIH-3T3 あるいは Balb-3T3 細胞を用いた。培地は、10% bovine calf serum を含んだ Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM-LG) を用いた。造影剤の

細胞内への導入方法はエレクトロポレーション法とした。MRI 撮像は、1.0, 1.5, 2.0, 4.7 T の MR 機器を使用した。

B-1. 造影剤水溶液の *in vitro* における MRI 撮像

造影剤を水に溶解させ、MRI 撮像を行った。濃度は (0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5, 0.6, 0.8, 1.0, 3.0 mM) とした。コントロールとして水のみを測定した。測定シーケンスは、2D-スピンエコー法を用いた。Echo time (TE)は 12 ms とし、Repetition time (TR)を変化させ撮像した。得られた画像のピクセル数は 256 X 128 であり、Field of view (FOV)は 4 cm X 2 cm である (1 ピクセル辺り 156 μ m X 156 μ m)。スライス厚は 1 mm とした。得られた画像より、輝度を求め、Contrast to noise ratio (CNR)を算出した。CNR = (intensity cells-intensity water) / intensity noise

B-2. 造影剤を内包したアガロースゲルの *in vitro* における MRI 撮像

造影剤を任意の濃度で水に溶解させ、アガロース濃度を 2 wt%になるように調整し、造影剤を内包したアガロースゲルを作成した。濃度をそれぞれ 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5, 0.6, 0.8, 1.0, 3.0 mM とし、MRI 撮像を行った。コントロールとしてアガロースゲルのみを測定した。測定シーケンスは、2D-スピンエコー法を用いた。TE は 12 ms とし、TR を変化させ撮像した。得られた画像のピクセル数は 256 X 128 であり、FOV は 4 cm X 2 cm である。スライス厚は 1 mm とした。得られた画像より、輝度を求め、CNR を算出した。

B-3. 造影剤を内包したアガロースゲルの *in vivo* における MRI 撮像

B-2 と同様の手法を用い、2 wt%アガロースゲル (400 μ l) 中に 10 mM となるように造影剤を内包させた。コントロールとしてアガロースゲルのみを作成した。得られたゲルを Balb/c マウス (8 週齢 ♂) の皮下に移植し、MRI 撮像を行った。測定シーケンスは、2D-スピンエコー法を用い、移植から 1, 2, 4, 8 日目に撮像した。TE は 12 ms とし、TR は 500 ms とした。得られた画像のピクセル数は 256 X 128 であり、FOV は 4 cm X 2 cm である。スライス厚は 1 mm とした。また、ゲルのみ輝度を 1 とした場合の造影剤を内包したゲルの輝度の変化をプロットした。

B-4. 造影剤を導入した細胞の *in vitro* における MRI 撮像

エレクトロポレーション後の NIH-3T3 細胞に対してトリプシン処理を行い、 3.0×10^6 個の細胞を回収した。得られた細胞を培地に懸濁させ、十分に時間が経過した後に、試験管上部と下部 (細胞の存在する場所) をスライスするように MRI 撮像を行った。測定シーケンスは、2D-スピンエコー法を用いた。また、対照として、エレクトロポレーションを行っていない細胞及び培地のみを撮像した。

B-5. 造影剤を導入した細胞 + アガロースゲルの *in vitro* における MRI 撮像

エレクトロポレーション後の NIH-3T3 細胞に対してトリプシン処理を行い、造影剤を導入した細胞を回収した。任意の数の細胞を 2 wt%アガロース

ゲル (100 μ l) 中に内包させ MRI 撮像を行った。細胞数は、 1×10^6 , 5×10^6 , 7.5×10^6 , 1×10^7 , 2×10^7 個とした。コントロールとしてアガロースゲルのみを測定した。測定シーケンスは、3D-スピンエコー法を用い、スライス厚は 4.5 mm とした。TE は 12 ms に固定し、TR を変化させ撮像した。撮像は 1.5 T の MRI を用いた。

B-6. 造影剤を導入した細胞+アガロースゲルの *in vivo* における MRI 撮像

B-5 の方法と同様にして、造影剤が導入された 2×10^7 個の Balb-3T3 細胞をアガロースゲル内に内包させた。得られたゲルを Balb/c マウス (8 週齢 ♂) の皮下に移植し、MRI 撮像を行った。測定シーケンスは、2D-スピンエコー法を用いた。TE は 12 ms とし、TR を変化させ撮像した。

(倫理面への配慮)

封じ込めなどの安全性には施設の基準に沿って十分に注意した。動物実験についても、施設における動物実験指針に沿い、動物愛護の精神を持って実施した。

C. 研究結果

C-1. 造影剤水溶液の *in vitro* における MRI 撮像

造影剤水溶液の濃度及び TR を変化させ撮像を行った (図 1)。造影剤の濃度の増加に伴い、コントロールと比較してコントラストが明確となった。濃度が最も低い 0.1 mM の溶液においても、コントラストの差は見られた。これらの画像から輝度を求め、CNR を算出し、TR に対してプロットした (図 2)。TR が短い条件においては、水の縦磁化の回復

がわずかでしかないため、得られるシグナルが低下し、ノイズとの差がなくなるため、CNR は小さくなる。また、TR が長い条件下では、水の縦磁化が十分に回復してしまうため、造影剤による T1 短縮効果が見られなくなる。つまり、CNR は小さい値をとる。従って、TR に対し、CNR をプロットすると、上に凸の放物曲線が得られ、ピークトップを与える TR が撮像の最適条件である。得られた結果から、水溶液中での最適 TR は 1000 ms であることがわかった。

C-2. 造影剤を内包したアガロースゲルの *in vitro* における MRI 撮像

アガロースゲル中における造影剤の濃度及び TR を変化させ撮像を行った (図 3)。図 1 と同様に、造影剤による T1 の短縮効果が見られた。また、これらの画像から輝度を求め、CNR を算出し、TR に対してプロットした (図 4)。水溶液中と比較して、CNR が最も高い TR は短くなり、800 ms であった。以上より、本研究で用いたポリビニルアルコール誘導体は、MRI 用造影剤として有用であることがわかった。

C-3. 造影剤を内包したアガロースゲルの *in vivo* における MRI 撮像

造影剤を内包したゲルとゲルのみをマウスの皮下に移植し、MRI 撮像を行った (図 5)。*In vivo* においても、コントラストの違いが明確に確認できた。また、日数の経過と共に、造影剤を内包したゲルのコントラストは減少した。これは、ゲルから造影剤が漏れ出したことによると考えられる。しかし、造影剤が漏出することによる、マウスへの悪影響は見られ

なかった。さらに、ゲルのみの輝度を1とした場合の造影剤を内包したゲルの輝度の変化をプロットした(図6)。日数の経過と共に、コントラストの減少が見られ、8日後には、コントロールの2倍程度となった。

C-4. 造影剤を導入した細胞の *in vitro* における MRI 撮像

造影剤を導入した細胞の撮像を行った(図7)。試験管上部(a)では、コントラストに変化がないのに対し、下部(b)では細胞の存在する場所にコントラストの上昇が見られた。また、細胞のみと培地のみでは、試験管上部と下部においてコントラストの差は見られなかった。この結果より、コントラスト強く見られることは、細胞に吸着されていた造影剤あるいは細胞から漏れ出した造影剤に起因するのではなく、細胞自体をMRIで観察していることになる。以上より、MRIを用いて細胞をイメージングできることがわかった。

C-5. 造影剤を導入した細胞+アガロースゲルの *in vitro* における MRI 撮像

造影剤が導入された細胞の数とTRを変化させ、MRI撮像を行った(図8)。測定したTRの条件下では、細胞の増加と共に、コントラストの差が明確に現れた。しかし、細胞数が 1×10^6 個の場合、コントロールとほぼ同じであった。この結果より、1.5 TのMRI装置を用いて、ゲルに内包された細胞をイメージングするためには、 5×10^6 個以上が必要であることがわかった。

C-6. 造影剤を導入した細胞+アガロー

スゲルの *in vivo* における MRI 撮像

造影剤が導入された細胞をアガロースゲルに内包させ、マウスの皮下に移植し、MRI撮像を行った(図9)。コントロールであるゲルのみでは、コントラストがつかないのに対し、細胞を内包させたゲルでは、コントラストが強く見られた。TR=300の条件では、2つのゲルにコントラストの差は見られなかった。*In vivo*において、細胞をイメージングするためには、長い(500 ms)以上のTRが必要であることがわかった。

D. 考察

本研究では、移植細胞の追跡を目的とし、MRIを用いた細胞のイメージングを検討した。初めに、造影剤の水溶液とゲルのMRI撮像を行い、TRについて検討を行った。水溶液中では、至適TRは1000 msであったのに対し、ゲルでは800 msであった。これは、自由水とゲルの水の環境の違いに起因すると考えられる。一方、造影剤を導入した細胞のMRI撮像を行った結果、細胞の存在するところで、コントラスト強く見られたことから、細胞のイメージングを達成したと考える。しかし、解像度の問題から、細胞1つ1つを観察しているのではなく、細胞群を見ていることになる。我々は、細胞群を見ることで十分であると考えているが、解像度を上げる、つまり、磁場強度の高い装置の使用も含め、移植細胞の追跡を行いながら今後の検討課題とする。また、細胞移植モデルを用い、移植細胞の*in vivo*でのMRIによる追跡を進めていく。

E. 結論

造影剤水溶液及びゲルの MRI 測定を行った。造影剤濃度、撮像条件を検討し、コントラストが強く見られる画像を得た。また、*in vivo* においても撮像を行い、造影剤として有用であることを確認した。また、造影剤が導入された細胞を用い MRI 撮像を行ったところ、細胞の存在するところで、コントラスト強く見られたことから、細胞のイメージングをすることができた。さらに、細胞のイメージングへ向けた条件検討を行い、最適条件を見出すことができた。*In vivo* において、細胞のイメージングを達成した。

F. 健康危惧情報

現在までのところ、本研究は人間を対象としたものではないため、健康に対する害は生じない。

G. 研究発表

G-1. 論文発表

- 1) 銭谷 勉, 渡部 浩司, 飯田 秀博. SPECTイメージング. In 遺伝子医学MOOK 9号「分子イメージング技術」. 2008; 75-81.
- 2) Kudomi N, Watabe H, Hayashi T, Iida H. Separation of input function for rapid measurement of quantitative CMRO2 and CBF in a single PET scan with a dual tracer administration method. *Phys Med Biol* 2007;52(7), 1893-1908.
- 3) Sohlberg A, Watabe H, Shidahara M, Iida H. Body-contour versus circular orbit acquisition in cardiac SPECT: Assessment of defect detectability with channelized Hotelling observer. *Nucl Med Commun.* 2007; 28(12) 937-942.
- 4) Zeniya T, Watabe H, Sohlberg A, Iida H. Accelerated 3D-OSEM image reconstruction using a Beowulf PC cluster for pinhole SPECT. *Ann Nucl Med.* 2007; 21 (9) 537-543.
- 5) Shimamura M, Sato N, Sata M, Kurinami H, Takeuchi D, Wakayama K, Hayashi T, Iida H, Morishita R. Delayed Postischemic Treatment With Fluvastatin Improved Cognitive Impairment After Stroke in Rats. *Stroke.* 2007; 38(12)3251-3258.
- 6) 渡部 浩司. 癌診断における PET/SPECT技術—過去・現在・未来. 実験医学増刊号 (分子レベルから迫る癌診断研究). 2007; 25(17) 188-193.
- 7) 渡部 浩司, 寺本 昇, 合瀬 恭幸, 銭谷 勉小動物イメージング最近の動向. In 臨床放射線. 2007; 52 (9) 1108-1113.
- 8) 飯田 秀博, 渡部 浩司, 赤松 哲哉, 中澤 真弓, 松原 圭亮, 竹内 朝子, 岩田 倫明, 林 拓也, 横田 千晶, 福島 和人, 福本 真司. SPECTを使った脳機能画像の定量化と標準化. 脳神経外科ジャーナル. 2007; 16 (10) 742-752.
- 9) Iida H, Eberl S, Kim K-M, Tamura Y, Ono Y, Nakazawa M, Sohlberg S, Zeniya T, Hayashi T, Watabe H. Absolute quantitation of myocardial blood flow with 201Tl and dynamic SPECT in canine: optimisation and validation of kinetic modelling. *Eur J Nucl Med Mol Imaging*, in press. 2008.
- 10) Kudomi N, Slimani L, Jvisalo MJ, Kiss J, Lautam i R, Naum GA, Savunen T, Knuuti J, Iida H, Nuutila P, Iozzo P. Non-invasive estimation of hepatic blood perfusion from H215O PET images using tissue-derived arterial and

- portal input functions. *Eur J Nucl Med Mol Imaging*, in press. 2008
- 11) Yokoyama I, Inoue Y, Kinoshita T, Itoh H, Kanno I, Iida H. Heart and Brain Circulation and CO₂ in Healthy Men. *Acta Physiologica*, in press. 2008
 - 12) SOhlberg A, Watabe H, Iida H. Acceleration of Monte Carlo-based scatter compensation for cardiac SPECT. *Annal Nucl Med*, in press. 2008.
 - 13) 銭谷 勉. マイクロSPECTを用いた小動物イメージングの定量的機能評価. (Quantitative Functional Imaging of Small Animals Using MicroSPECT). *Med Imag Tech*. 2008; 26(1) 14-20.
 - 14) 渡部 浩司, SPECTの定量化と標準化 (Quantitative and Standardized SPECT Imaging). *Medical Imaging Technology*. 2008; 26(1) 9-13.
 - 15) 飯田 秀博. 特集/分子イメージング時代の画像解析・データ解析の新しい視点-特集のねらい (New Image Processing Technologies for Clinical and Pre-clinical Molecular Imaging). *Med Imag Tech*. 2008; 26(1) 1-2.

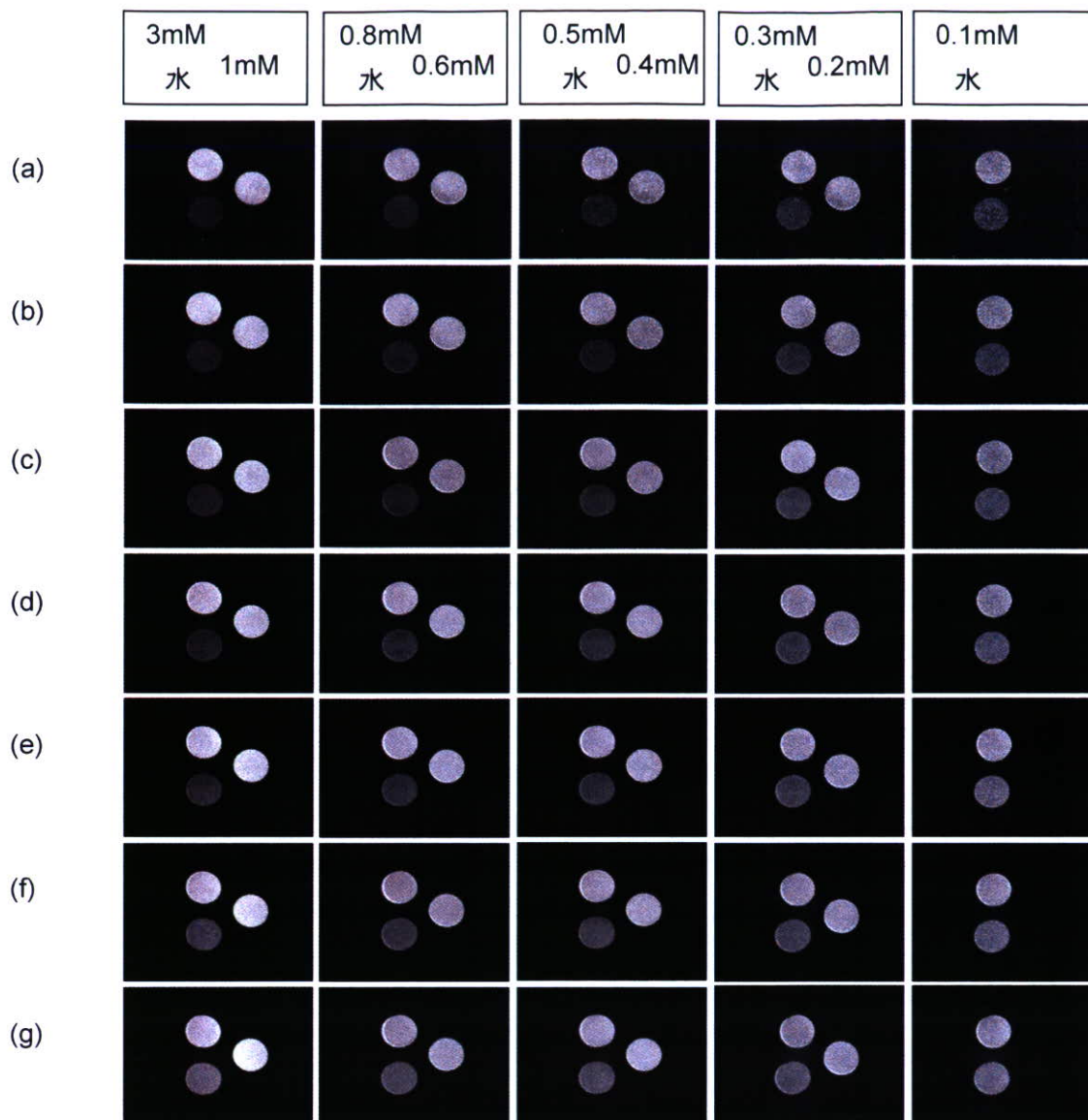


図 1. 造影剤水溶液の濃度及びTRを変化させ撮像したT1強調画像(濃度は0.1 mMから3.0 mMまで変化させた) (a) TR=100 (b) TR=200 (c) TR=500 (d) TR=800 (e) TR=1000 (f) TR=2000 (g) TR=3000

造影剤濃度の増加により、コントロール(水)と比較してコントラストの上昇が見られた。

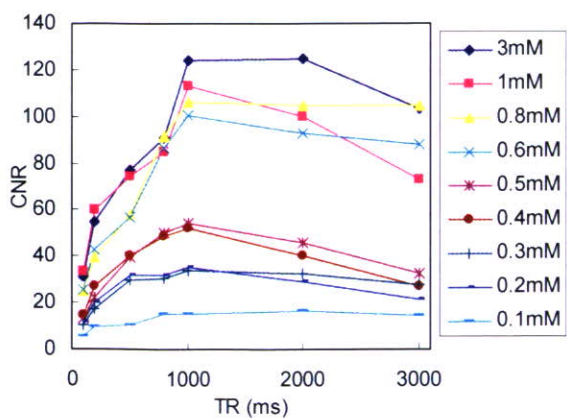


図 2. 図 1 より算出した CNR と TR の相関関係

濃度に依存した CNR の増加が見られた。また、水溶液中での最適 TR は 1000 ms であった。

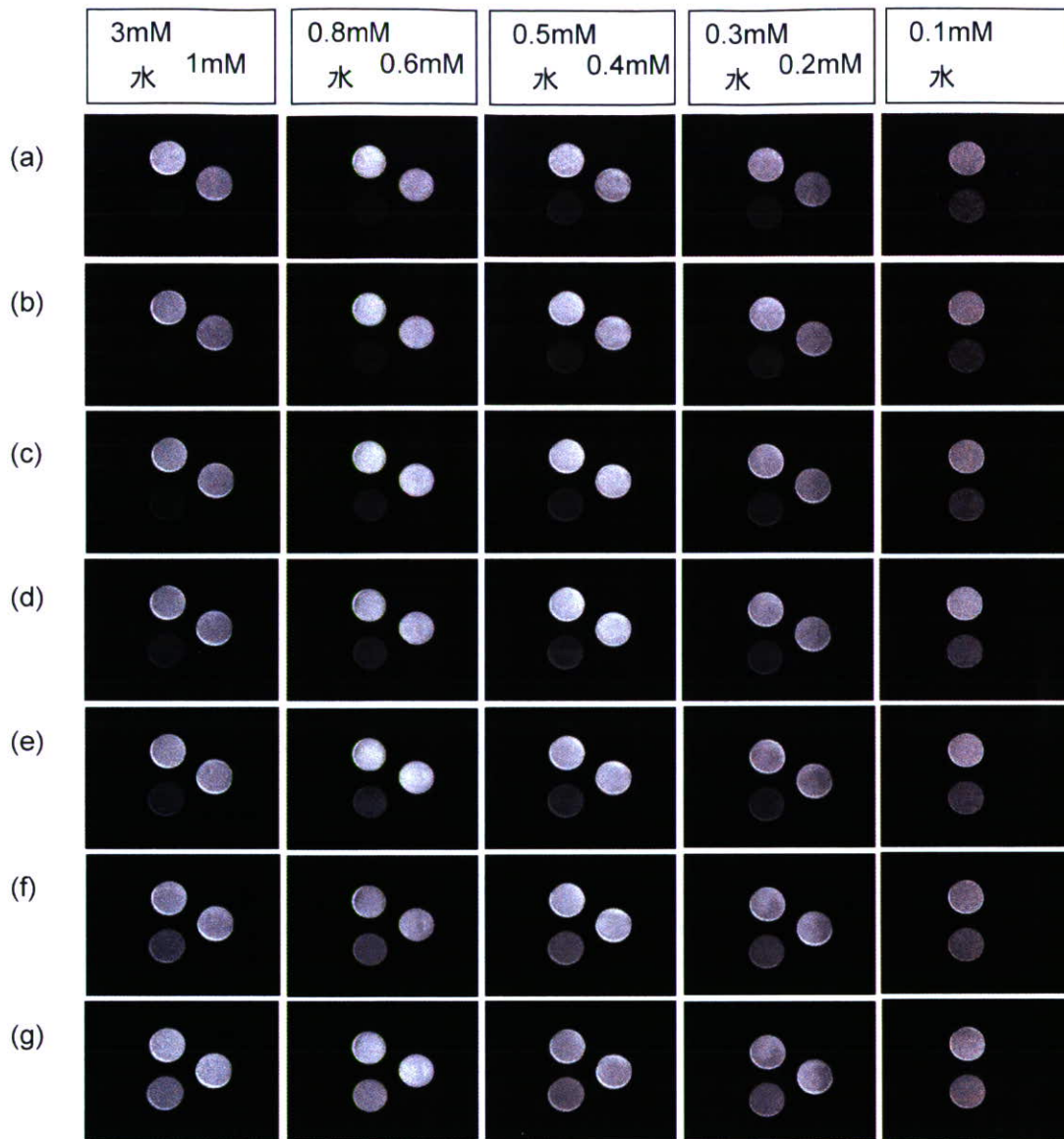


図 3. 造影剤水溶液の濃度を変化させゲルを作成し、得られたゲルを様々なTRで撮像したT1強調画像（濃度は0.1 mMから3.0 mMまで変化させた）(a) TR=100 (b) TR=200 (c) TR=500 (d) TR=800 (e) TR=1000 (f) TR=2000 (g) TR=3000

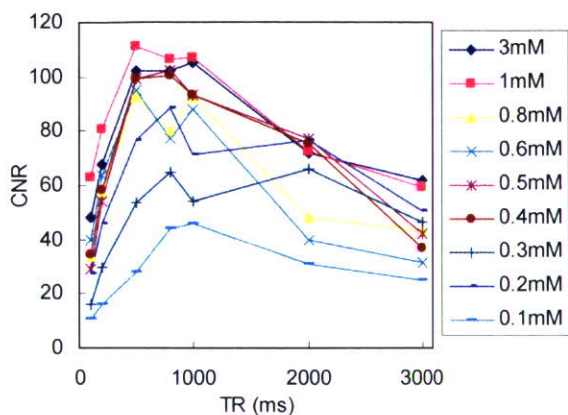


図 4. 図 3 より算出した CNR と TR の相関関係

水溶液中と比較して、ピークトップは TR の短いほうにシフトした。ゲルを用いた場合、最適 TR は 800 ms であった。

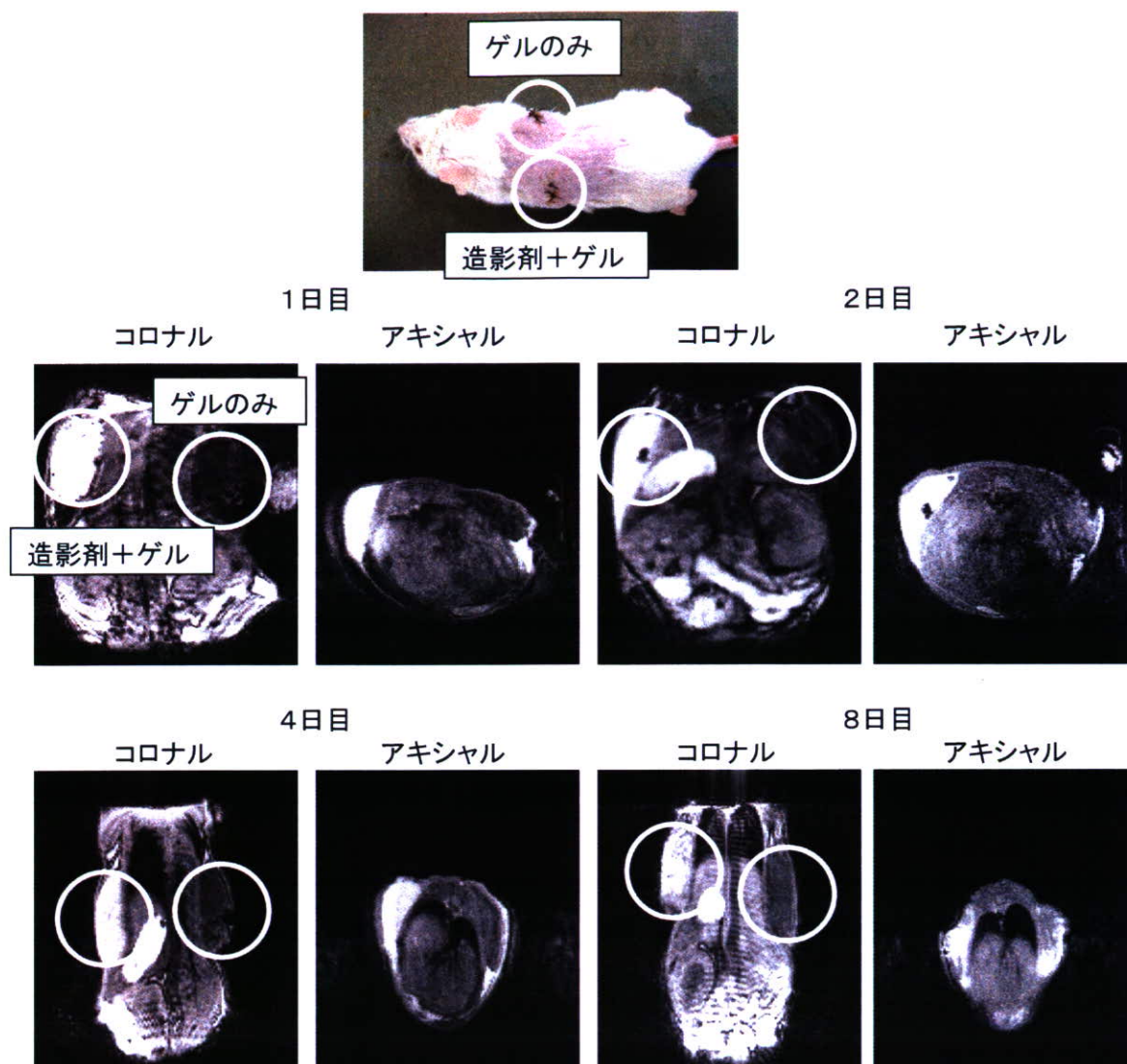


図 5. マウスの皮下に造影剤を内包したゲル及びゲルのみを埋入し、MRI測定による経時変化 (T1強調画像)

In vivoにおいて、造影剤を内包したゲルは、ゲルのみと比較してコントラスト強く造影剤された。日数の経過と共に、造影剤を内包したゲルのコントラストは減少した。

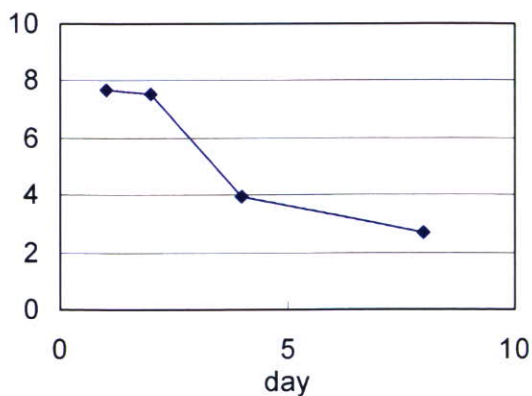


図 6. ゲルのみを1とした場合の造影剤を内包したゲルの輝度の変化

日数の経過と共に、コントラストの減少が見られ、8日後には、2倍程度であった。

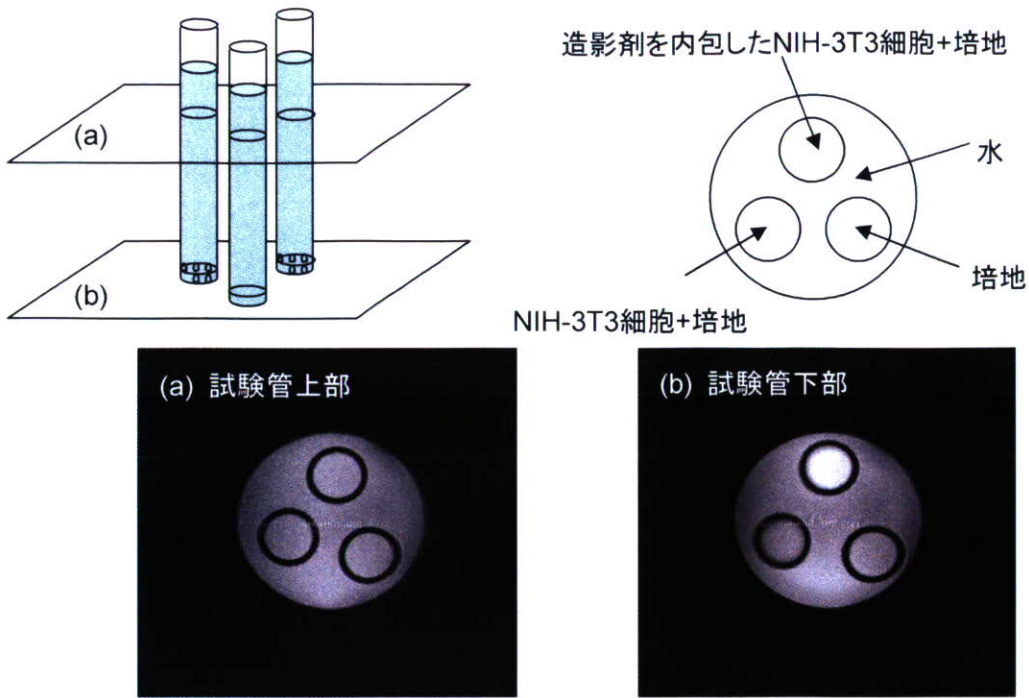


図 7. MRIを用いた細胞の撮像

試験管内で造影剤を内包した細胞及び細胞のみを培地中、沈殿させ、試験管上部、下部(細胞沈殿部)をスライスし、MRI撮像を行った。コントロールとして培地のみも測定した。試験管上部(a)では、コントラストに変化がないのに対し、下部(b)では細胞の存在する場所にコントラストの上昇が見られた。

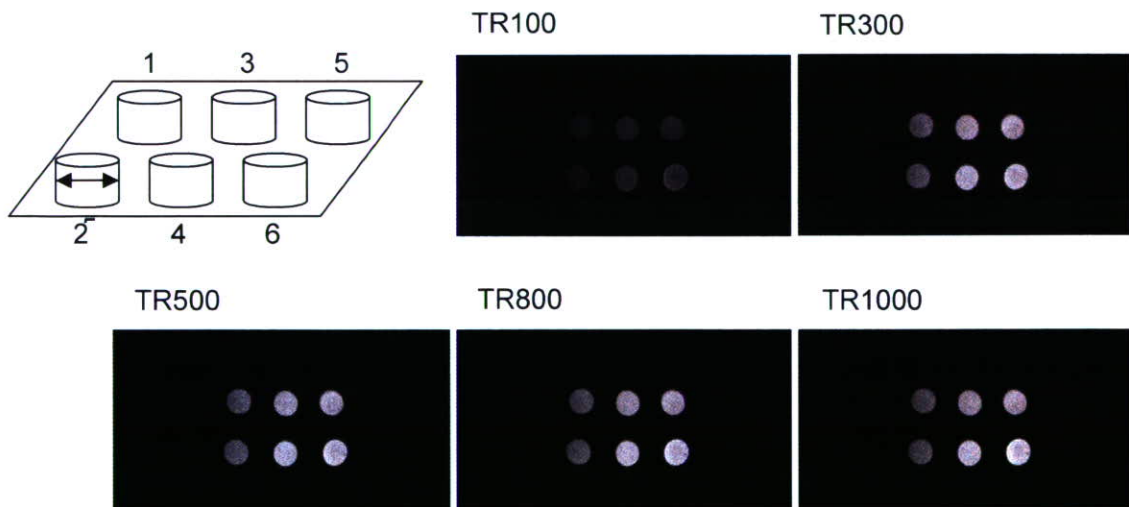


図 8. 細胞数を変化させ撮像したT1強調画像 (1. 2 wt%アガロースゲル(100 μ l), 2. 1×10^6 個+Gel (100 μ l), 3. 5×10^6 個+Gel (100 μ l), 4. 7.5×10^6 個+Gel (100 μ l), 5. 1×10^7 個+Gel (100 μ l), 6. 2×10^7 個+Gel (100 μ l))

異なる細胞数をアガロースゲルに内包させ、MRI撮像を行った。。細胞数の増加と共に、コントラストがはっきりと見られた。

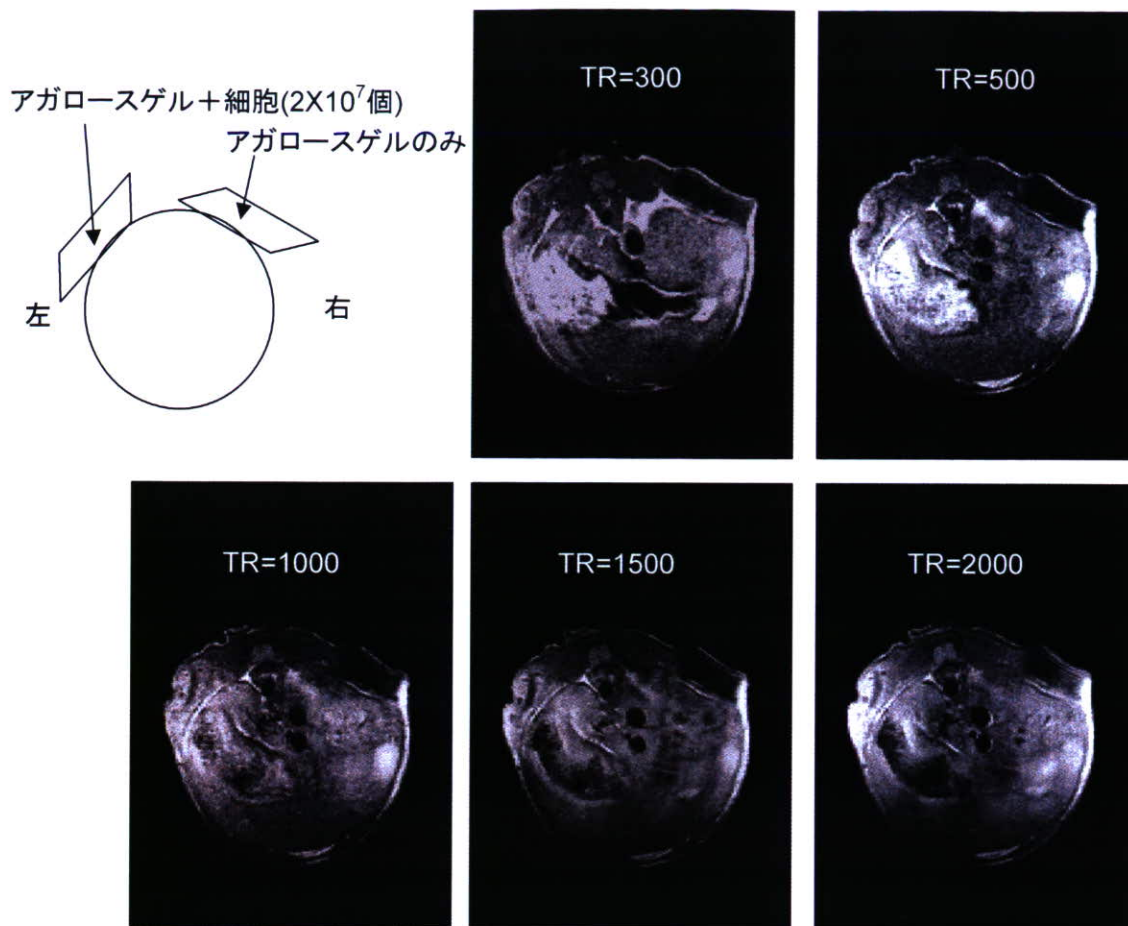


図 9. 細胞のin vivo撮像

造影剤を導入した細胞をアガロースゲル中に内包し、マウスの皮下へ移植した。コントロールとして、アガロースゲルのみを用いた。コントロールと比較して、細胞が存在するところで、コントラストの上昇が見られた。

MRI プローブ標識化細胞の移植システム

分担研究者 中谷 武嗣 国立循環器病センター研究所
臓器移植部長

研究要旨 従来の細胞移植の手法、すなわち、細胞懸濁液を局所に注入する方法は、その正着効率が問題とされている。そこで、インジェクタブルスキャホールドの利用などが検討されている。本研究では、疾患モデル動物に対する移植システムとして、細胞シートを選択した、開発した新規 MRI 造影剤を利用した細胞シートの作製に成功し、その移植実験を進めた。

A. 研究目的

患者自身の組織から採取される幹細胞を用いた組織再生治療法は、免疫拒絶反応の可能性が低く目的組織を再生できる治療法として着目されており、組織変性や欠失を伴う疾患に対する新規治療法として大きな期待が寄せられている。細胞シートを用いた組織再生治療法は、移植細胞の取扱いの簡便さや効率的に疾患組織へ細胞を移植できるなどの臨床面からの利点も多いことから、種々の臨床試験で検討が進められている。特に、虚血性心疾患の治療においては、患者自身の骨格筋細胞シートを虚血部位に移植することで有意な機能改善効果が報告されている。さらに、移植した細胞の生着率が悪いことから、インジェクタブルスキャホールドの利用や、細胞シートや細胞塊などの移植戦略が検討されている。

本研究では、新規 MRI プローブとしてキレート剤に配位したガドリニウム

分子を導入したポリビニルアルコール誘導体 (PVA-DOTA-Gd) を造影剤として採用し、*in vivo* における細胞シートのイメージング技術の開発をした。骨格筋芽細胞に対する PVA-DOTA-Gd の導入条件の検討ならびに、導入した細胞懸濁液の MRI イメージング効率を検討した。さらに、PVA-DOTA-Gd を導入した細胞シートを作製して *in vivo* における細胞シートの造影効果について評価することで、MRI による細胞シートイメージングの可能性について検討した。

B. 研究方法

B-1. 骨格筋芽細胞に対する PVA-DOTA-Gd の導入条件検討

ラット由来骨格筋芽細胞 (L6 cell) に対して、PVA-DOTA-Gd を導入するためエレクトロポレーション法を用いた。エレクトロポレーションによる PVA-DOTA-Gd の細胞内導入条件を検討するため、Fluorescein で標識した

PVA-DOTA-Gd を用いて実験を行った。6cm 培養皿に対して 2×10^5 cells / dish の L6 cell を播種した。24 時間後、接着した細胞を 1xPBS 1 mL で 3 回洗浄し、血清不含培地を加え CO₂ インキュベータで 30 分インキュベートした。その後、血清不含培地へ終濃度が 100mM, 200mM, 300mM になるように PVA-DOTA-Gd 溶液を添加し、印加電圧 300V、ON 時間 5 msec+OFF 時間 995 msec を 1 サイクルとして、これを複数回繰り返した。1 時間 CO₂ インキュベータ内で静置させたのちに、1 mL の PBS で 5 回洗浄した。その後、蛍光顕微鏡により細胞内への導入を確認した。

B-2. PVA-DOTA-Gd を導入した骨格筋芽細胞の MRI 撮像と細胞内導入量の検討

エレクトロポレーションにより PVA-G を導入できる条件が確立したので、次に PVA-DOTA-Gd を導入した L6 細胞の MRI の撮像を行った。PVA-DOTA-Gd を導入する条件は、B-1 に従う。PVA-DOTA-Gd を導入後、細胞をトリプシンで処理して 1×10^5 cells/50 μ L の細胞懸濁液を調整した。直径 5 mm のキュベットの中に細胞懸濁液を入れて、グラジエントエコーのプログラムで TR=500 ms として MRI 撮像を行った。

細胞内への PVA-DOTA-Gd 導入量を定量的に解析するため、エレクトロポレーションにより PVA-DOTA-Gd を導入した細胞を TritonX-100 を含む細胞溶解液により処理し、蛍光分光光度計で PVA-DOTA-Gd 量を測定し、検量線より導入量を定量した。

B-3. マウスに移植した細胞シートの MRI イメージング

6 cm の NIPPAm コートディッシュ (Upcell, セルシード社) に対して、 2×10^5 cells/dish で細胞を播種した。48 時間後、1mL の PBS で 3 回洗浄して、血清不含培地 1mL を加え、30 分 CO₂ インキュベータ内で静置した。その後、終濃度 300 mM となるように PVA-DOTA-Gd を添加して、印加電圧 300 V、ON 時間 5 ms+OFF 時間 995 ms を 1 サイクルとして、これを 30 回繰り返した。CO₂ インキュベータ内で 1 時間静置した後で 1mL の PBS で 5 回洗浄し過剰量の PVA-DOTA-Gd を除いて PVA-DOTA-Gd 導入細胞シートを作製した。その後、細胞シートに支持体 (ϕ 35 mm, Cellshifter, セルシード社) を張り付け室温で 20-30 分静置することで細胞シートを回収した。回収した細胞シートは 8 等分に分割し、8 枚重ね合わせて C57BL6 マウスの皮下へ移植した。

C. 結果

C-1. 骨格筋芽細胞に対する Gd の導入条件検討

エレクトロポレーションの繰り返し回数を 30 回と固定して、PVA-DOTA-Gd の濃度に対する細胞内導入効果を調べた (図 1 (A-F))。その結果、PVA-DOTA-Gd が 300 mM の場合、細胞内で最も強い輝度を確認した (図 2)。しかし、PVA-DOTA-Gd を 600 mM まで増加させても細胞内へ導入される PVA-DOTA-Gd の量は増加しなかった (Data not shown)。次に、エレクトロポレーションの回数に対する細胞内導入効率を調べた (図 1(G-K))。その結果、

繰り返し回数が 30 回の場合、最も細胞内への PVA-DOTA-Gd 導入量が多かった。繰り返し回数を 30 回以上にした場合、生細胞率の有意な低下が認められた。以上の結果より、L6 細胞に対して PVA-DOTA-Gd を電極ポレーションで導入する場合、300 mM の PVA-DOTA-Gd 濃度において 300 V の印加電圧を 30 回繰り返すことで最も導入率が高く、細胞に対しても低毒性であることが判明した。

C-2. PVA-DOTA-Gd を導入した骨格筋芽細胞の MRI 撮像と細胞内導入量の検討

電極ポレーションにより PVA-DOTA-Gd を導入した L6 細胞の懸濁液をキュベットに入れて、MRI 撮像を行った。その結果を図 3 に示す。電極ポレーションの繰り返し回数依存的に MRI のシグナルが増加していることが示された。これは、繰り返し回数に依存して PVA-DOTA-Gd 導入量が増加する傾向と一致している(図 2)。また、PBS 溶液のみの場合と比較して、繰り返し回数が 30 回で電極ポレーションすることで PVA-DOTA-Gd を導入した L6 細胞のシグナルは明らかに大きく、2 倍の輝度が示された。このようなことから、L6 細胞内に導入された PVA-DOTA-Gd は MRI によりイメージングできる可能性が示された。

次に、細胞に導入されている PVA-DOTA-Gd 量を蛍光強度より算出した(図 4)。その結果、繰り返し回数が 30 回で 1 細胞あたり 8 ng の PVA-DOTA-Gd が導入されており、8 mg/cm² の密度で細胞内に導入された

PVA-DOTA-Gd が存在すると MRI によりイメージングできることが算出できた。この取り込み量は、培養皿へ仕込んだ PVA-DOTA-Gd 量の 0.6%となる。PVA-DOTA-Gd 単体を PBS で希釈して MRI で撮像した結果と比較すると、細胞内に PVA-DOTA-Gd が導入されることで検出感度は 1/1000 程度に減少した。

C-3. マウスに移植した細胞シートの MRI イメージング

細胞シートに対して PVA-DOTA-Gd を導入し、細胞シートを回収した様子を図 5 に示す。電極ポレーション処理をした場合においても細胞シートの構造を形成しており、細胞移植できることを確認した。次いで、マウス皮下に 8 枚重ねた細胞シートを移植し、MRI 撮像を行った(図 6)。MRI により皮下領域を撮像した結果、PVA-DOTA-Gd を導入した細胞シートを移植した部分では、PVA-DOTA-Gd を含まない細胞シートの移植部と比較して強い MRI シグナルが示された。また、その場所を変えて、同様の撮像を行った場合においても、PVA-DOTA-Gd を導入した細胞シートを移植した領域から MRI シグナルが示された。これらの結果より、PVA-DOTA-Gd を導入した細胞シートを 8 枚重ねて皮下に移植した場合、その細胞シートを *in vivo* において MRI によりイメージングできることが示された。

D. 考察

骨格筋芽細胞に対する PVA-DOTA-Gd の導入法では、電極ポレーション法を用いることで細胞に対して非常に低毒性でかつ効率的に

PVA-DOTA-Gd の導入が達成できた。また、導入した PVA-DOTA-Gd は細胞からの漏出も認められないことより、移植細胞をトラッキングするための極めて有効な分子であること考えている。MRI の撮像を行った結果、エレクトロポレーションにより PVA-DOTA-Gd を導入した細胞は MRI によりイメージングできることが示された。この手法により PVA-DOTA-Gd は分子の構造を保った状態で細胞内へ導入され、細胞内環境においても MRI シグナルを与えることが可能であった。しかし、細胞内と細胞外での PVA-DOTA-Gd による MRI シグナルを比較すると、細胞内においてそのシグナルが 1/1000 に減少していた。つまり細胞内における PVA-DOTA-Gd 近傍の水分子の状態は均一な水溶液における水分子の状態と大きく異なっていることを示唆しているものと考えている。細胞内ではタンパク質や糖などの分子が極めて高濃度で存在する為、水分子のエントロピーは水溶液中と比べ大きく異なる。このような水分子の状態は MRI シグナルに大きく影響を与えるものと考えており、その詳細については現在検討を進めている。

現在の条件で 1 細胞当たり導入できる PVA-DOTA-Gd 量から、MRI によりイメージングするために必要な細胞シートは、シートを 5 枚以上重ねて移植する必要がある。臨床においては 1 枚の細胞シートを用いて治療効果が報告されているので、今後 PVA-DOTA-Gd を細胞に導入するための条件検討および、低濃度においても強い MRI シグナルを与えることが可能な造影剤の開発が必要となる。この 2 つの検討から現在の 5 倍

以上の造影効果が得られれば、臨床で使用されている細胞シートを MRI によりイメージングできるものと考えている。またマウスを用いた実験より、8 枚重ねた細胞シートを *in vivo* においてイメージングすることにも成功した。細胞シートの皮下移植においては、現段階における細胞の造影効果によりイメージングすることが可能である。しかし他の臓器へ細胞を移植した場合にはもう少し造影効果の高い分子を導入した細胞シートを作成する必要があると考えている。

E. 結論

本研究では、PVA-DOTA-Gd を導入することで移植細胞シートを MRI によりイメージングできる可能性について検討した。その結果、エレクトロポレーション法により PVA-DOTA-Gd 導入した細胞シートは、マウスの皮下において MRI シグナルとしてイメージングできることが明らかとなった。さらに、PVA-DOTA-Gd を導入した場合においても細胞シートはそのシート構造を保持した状態であった。イメージングするためには細胞シートを 8 枚重ねて移植する必要がある。高効率に MRI シグナルを与える造影剤の開発や、造影剤の細胞内導入効率を増加させることで、臨床で使用される 1 枚の細胞シートを *in vivo* でイメージングできる可能性がある。今後、移植された細胞シートによる臨床での治療効果と、細胞シートのイメージング技術の相関を解析することで細胞シートによる再生治療効果の定量的な解析と、そのメカニズムの解明が可能になるものと考えている。

F. 健康危惧情報

現在までのところ、本研究は人間を対象としたものではないため、健康に対する害は生じない。

G. 研究発表

G-1. 論文発表

- 1) 中谷武嗣, 心臓移植. 「新 目でみる循環器病シリーズ15 心筋症」. メジカルレビュー社, 東京. 2007; 89-94.
- 2) 田中秀治, 篠崎尚史, 浅水健志, 青木大, 中谷武嗣. 組織移植の現状と今後の展望. 移植. 2007; 42(3):242-252.
- 3) 中谷武嗣, 加藤倫子, 眞野暁子, 船津俊宏. 移植医療—機械的循環補助も含めて—. 循環器科. 2007; 62(1):67-73.
- 4) 高内裕司, 今中秀光, 竹内宗之, 西田朋代, 橘 一也, 中谷武嗣. 心臓移植の術後急性期管理. 日集中医誌. 2007; 14:551-554.
- 5) 今中秀光, 中谷武嗣, 北村惣一郎. 心臓移植術後急性期の合併症と問題点. 胸部外科. 2007; 60:958-962.
- 6) 中谷武嗣, 加藤倫子, 船津俊宏. 心臓移植(heart transplantation). 臨床検査. 2007; 51:1735-1744.
- 7) Wada K, Takada M, Kotake T, Ochi H, Morishita H, Komamura K, Oda N, Mano A, Kato T, Hanatani A, Nakatani T. Limited sampling strategy for mycophenolic acid in Japanese heart transplant recipients. - Comparison of cyclosporin and tacrolimus treatment - . Circulation Journal. 2007; 71:1022-1028.
- 8) Wada K, Takada M, Ueda T, Ochi H, Kotake T, Morishita H, Hanatani A, Nakatani T. Relationship between acute

rejection and cyclosporine or mycophenolic acid levels in Japanese heart transplantation. Circ J. 2007; 71:289-293.

- 9) Wada K, Takada M, Ueda T, Ochi H, Kotake T, Morishita H, Hanatani A and Nakatani T. Drug interactions between tacrolimus and phenytoin in Japanese heart transplant recipients.: 2 case reports. International Journal of Clinical Pharmacology and Therapeutics. 2007; 45: 524-528.

G-2. 学会発表

- 1) Oda N, Kato T.S., Hashimoto K, Kamiya C, Hashimura K, Mano A, Ueda H.I., Kitakaze M, Nakatani T. Time lapse analysis of changes in Doppler-derived index of coronary flow reserve over time could reduce frequency of endomyocardial biopsy. International Society for Heart and Lung Transplantation 24th Annual Meeting and Scientific Sessions. San Francisco, CA, U.S.A. 2007年4月25日～28日.
- 2) Kato T.S., Hashimoto S, Oda N, Mano A, Nakatani T, Hashimura K, Ueda H.I., Kitakaze M, Kitamura S. Clinical utility of coronary perfusion reserve and strain rate imaging obtained by echocardiography as a noninvasive evaluation for sub-clinical acute rejection in heart transplant recipients. International Society for Heart and Lung Transplantation 24th Annual Meeting and Scientific Sessions. San Francisco, CA, U.S.A. 2007年4月25日～28日.
- 3) Wada K, Kato T.S., Oda N, Ochi I, Maeda Y, Mano A, Kotake T, Nakatani T.