

ンのために活用される。現在の評価法は、おもに侵襲的方法による再生組織の組織形態的評価、生化学的分析、ならびに分子生物学的分析が行われている。しかしながら、再生医療が臨床技術として真価を発揮するには、非（または、低）侵襲的に同一個体の経時変化観察が可能な計測・画像技術が必要である。これらの技術により再生医療のパリテーション、すなわち *in vitro*, *in vivo*, *in situ* における一貫した手法によって繰り返し品質・機能評価を実現させることが望まれる。具体的には、*in vitro* で培養・増殖した移植用再生組織そのものの品質管理、治療前の *in vivo*, *in situ* 診断、再生組織を移植したあとの最終的な医療評価が、一連に行える計測・評価システム（図8.1）が求められる。図に示した評価システムでは、従来から発展してきた形態画像技術だけでなく、機能計測技術を新たに確立させることが重要になる。図（a）の治療前診断では、障害や不全を起こしている組織・臓器の障害度（変性度）や周囲組織の機能状態を診断する。図（d）の細胞・組織の品質管理（quality control）では、生物学的構成の三要素である細胞、人工細胞外マトリックスとしての担体（scaffold）、およびシグナル伝達系（調整因子）を組み合わせる組織工学的に構築された移植用再生組織とその構築工程、ならびに生物学的構成の三要素そのものの機能を検定し管理する。図（e）の経過観察および医療評価では、移植後の細胞・組織を *in vivo*, *in situ* で観察することや、移植後の周囲組織との生着状態を評価する。再生医療の評価とは、再生された組織・臓器の機能が生来のものと比べてどの程度機能が修復されたかを経時的に評価することであり、これを実現することで初めて再生医療の臨床医療における効果を評価したことになる^{2),3)}。

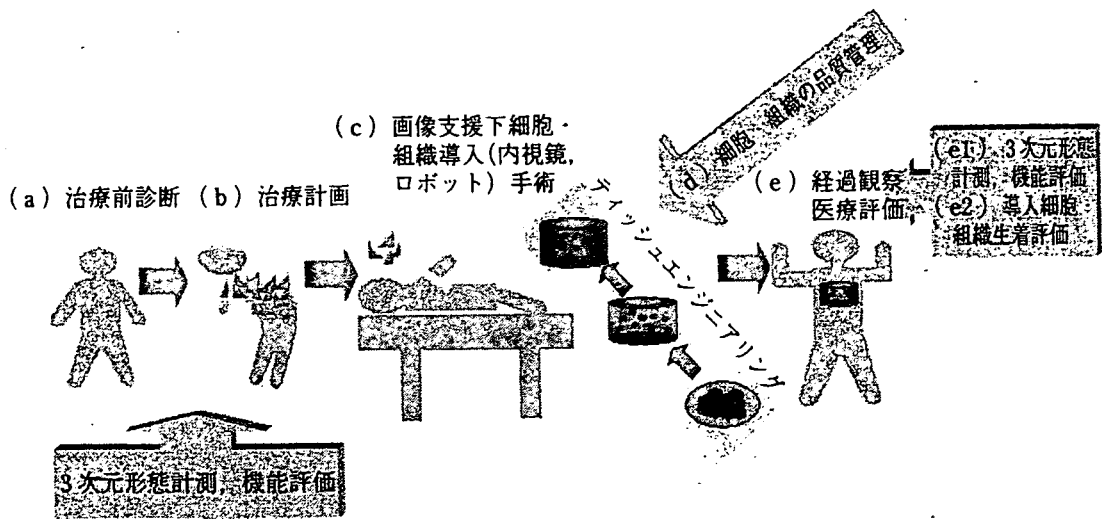


図8.1 再生医療における計測・画像技術が果たす役割と機能

8.3 基盤計測・画像技術

8.3.1 サイトメトリーによる *in vitro* 細胞活性評価法

細胞活性評価は、細胞種により細胞活性形態が異なるため、適切な細胞活性を表す指標を用いる必要がある。例えば、幹細胞のように培養し増幅が必要な細胞では細胞増殖活性が重要となり、膵ランゲルハンス島 β 細胞の場合にはインシュリン産生能が重要となる。治療効果が長期間維持されるためには、移植に用いた細胞が生体内で長期間生存できることも重要となる。細胞活性評価に最適な細胞活性関連物質（遺伝子、抗体、タンパク、シグナル分子など）を選定することは難しい課題であるが重要である。

蛍光物質は、特定の波長の光（励起光）を照射すると照射した光より波長の長い蛍光を放出し、励起光および蛍光の波長は蛍光物質の種類により異なる。

酵素免疫学的な手法などを用いて、細胞活性関連物質に蛍光物質を特異的に結合させ標識することができるので、蛍光標識した細胞活性関連物質の蛍光強度を計測することで、細胞活性関連物質の存在量などを解析することができる。蛍光波長の異なる蛍光物質を使用することにより、同時に複数の細胞活性関連物質の解析を行うこともできる。蛍光標識した細胞活性関連物質の分布（濃度）を細胞毎に数値化し解析できる測定法として、フローサイトメトリーとイメージサイトメトリーがある。

〔1〕 フローサイトメトリー 図8.2に示すように、フローセルと呼ばれる管の中で、

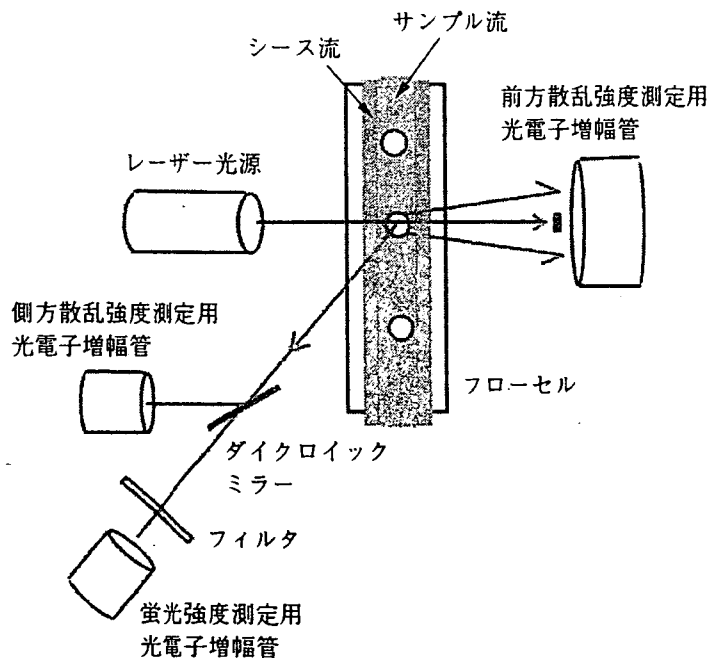


図8.2 フローサイトメトリーの原理

細胞を浮遊させたサンプル液流がシース液流中で細胞が1個ずつ流れる状態になっている。上記サンプル液流に照射されたレーザー光は、細胞表面および細胞内部の構造物において一部は散乱され、光路上にある蛍光物質からは蛍光が放射される。前方散乱強度は、照射方向前方に設置した光電子増幅管により直接光電子増幅管に入射するレーザー光をマスクして測定され、側方散乱強度と蛍光強度は側方に設置した複数の光電子増幅管とダイクロイックミラー（ある波長より短い波長の光は反射し、長い波長の光は透過させるミラー）により構成された検出器で一度に多色の蛍光強度を測定する。ちなみに図8.2は1色の蛍光強度を測定する構成を示している。

レーザー光を横切るようにして細胞が1個ずつ流れるたびに、前方散乱強度、側方散乱強度、蛍光強度が測定され、各細胞の特性値となる。前方散乱強度は細胞の大きさを表す指標として、側方散乱強度は細胞内部の構造の複雑さを表す指標として解析に用いられる。各細胞の特性値をもとに、細胞の大きさや細胞表面抗原、細胞表面タンパク質などを解析し、個々の細胞および細胞集団の細胞状態を評価する。

〔2〕 イメージサイトメトリー 蛍光顕微鏡をベースとした画像解析による細胞解析法である。イメージサイトメトリーでは、培養容器から細胞を単離し浮遊させる必要がないため細胞形態も観察できる。蛍光画像は、レーザー光照射位置（測定ポイント）を測定平面内で走査し、細胞内の蛍光標識プローブから放射される蛍光を、測定ポイントごとに光電子増幅管もしくはCCDカメラで捕捉することにより描画される。レーザー光照射位置を走査する方式には、測定試料を固定しガルバノミラーでレーザー光を走査するもの、レーザー光の焦点を固定しステージを走査するもの、レーザー光の1次元走査とステージの1次元走査を組み合わせたものがある。

透過画像や蛍光画像を高度な画像処理を施すことにより、画像上にある複数の細胞の中から個々の細胞の輪郭を求め、細胞ごとの細胞形態パラメータ（面積、周長など）および蛍光積分強度などを求める。これら細胞ごとのデータを解析して、細胞の生化学的・細胞学的な状態を数値化し、個々の細胞および細胞集団の細胞状態を評価する。

蛍光標識を利用した上記の細胞評価方法は、細胞の微細な状態変化を定量的に評価できることから、再生医療の基礎研究において非常に有用なツールである。

一方、再生医療の製造プロセスにおいては、移植組織（細胞）の生体内での安全性が重要視される。蛍光標識することにより細胞評価を行う場合は、使用する蛍光標識物質の生体内での安全性を保障する必要がある。また、評価のために細胞の一部をサンプリングし希少な細胞を消費することも好まれない。このため、再生医療の製造プロセスに適した安価で高検出力をもった非破壊かつ無侵襲な評価方法の技術開発が現状でも強く望まれている。

8.3.2 ルシフェラーゼおよび GFP を用いた *in vivo* 細胞機能評価バイオイメージング法
 体の中で起こっているさまざまな現象を観察するのに、いままでは目的の細胞を体外に取り出して観察・実験する *ex vivo* の方法が用いられてきた。しかし、このような人為的な状態は *in vivo* の複雑な状態を反映しておらず、生体内での動態を直接観察できる技術の開発が求められてきた。

生体内の細胞の動きを直接実時間で可視化する技術が、*in vivo* バイオイメージングである。LacZ をマーカー遺伝子とする場合は組織学的観察に適するものの、多数の動物を観察のたびに犠牲にしなければならないという欠点があったが、現在登場したフルオレセンスやルミネセンスを用いたバイオイメージング技術は、生体内の変化を実験動物を屠殺することなく観察することが可能である。

バイオイメージング技術の基となるこの“光”の種類については、現在多く開発・改良が進められている。これらの光は、動物の皮膚を透過して高感度の CCD カメラによりとらえられ、リアルタイムの画像データとして処理される。映し出された画像は、実際の動物の体と重なり合うため、生体内の動態がダイレクトに可視化されたイメージとして描出される。

〔1〕 ルシフェラーゼを用いたバイオイメージング ホタル (firefly) 由来の発光酵素、ルシフェラーゼは、遺伝子のレポーターアッセイに広く利用されている。ルシフェラーゼがルシフェリンと ATP から、酸化ルシフェリンと AMP をつくる反応を触媒する際に発光する光 (最大波長 560 nm) をルミノメーターによって検出する。原法では発光時間が短く感度が低かったが、近年改良され、CoenzymeA を発光基質に加えることにより安定した発光が得られるようになった。ただし、従来は *in vivo*、実時間の観察に利用することはできなかつた。米国 Xenogen 社で開発された IVIS® Imaging System は、ルシフェラーゼ遺伝子を目的とする遺伝子のプロモーターの下流域に組み込んだ細胞や生体から発する微弱な光を超高感度 CCD カメラによりとらえ、デジタル処理をすることで、生体内の動態をリアルタイムに観察できるようにした装置である。ルシフェラーゼを用いることによる長所は、高感度、迅速性、定量性に優れていることに加え、皮膚を透過する 600 nm 以上の光を同定することで体外からの観察が可能であること、ATP 依存性のため生きた細胞でのみ発光が同定できることである。ただし、基質 (ルシフェリン) の投与が必要なこと、発光半減期が短い、黒色の毛の動物ではやや光が透過しにくいなどの短所もある。

図 8.3 は、ラット下肢モデルにおいて、グラフトへの遺伝子導入を行い、遺伝子の発現をルシフェラーゼ活性により同定した例を示す⁹⁾。ルシフェラーゼ遺伝子を導入した臓器をそれぞれ別の個体へ同所性に移植して、移植後 30 日目の下肢グラフトの遺伝子発現の様子がみられる。このイメージから得られた単位面積当りの光の強さ (光子数) をソフトウェア (Living Image®) により定量化することで、経時的な遺伝子発現量の推移も評価すること

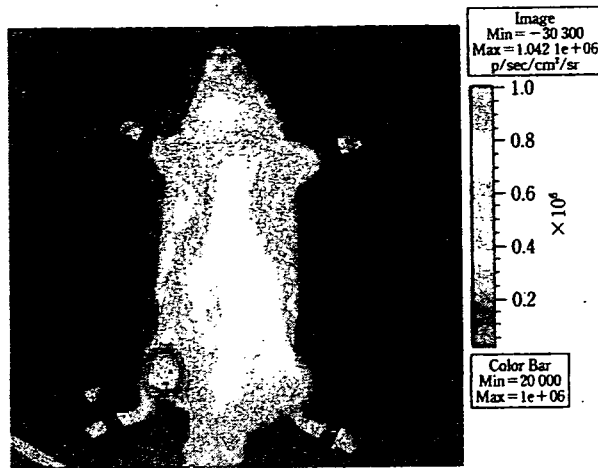


図 8.3 移植 30 日後のラット下肢グラフト
〔Sato : Transplantation, 76, 9, pp.1294-1298 (2003)〕 (口絵 3 参照)

ができる。このようにルシフェラーゼをレポーターとして用いることで、ラットを犠牲死させることなく時間を追って観察することができる。現在、このルシフェラーゼを用いた技術は、その他のがんの転移の研究や抗がん剤の効果判定⁵⁾、アポトーシスの研究などのイメージングにも幅広く用いられている。

〔2〕 GFP を用いたバイオイメージング GFP (green fluorescent protein) は、1962 年下村らによって、オワンクラゲ (*Aequorea Victoria*) の発光器官から発見された。この発光器は普段は発光せず、強い刺激を受けたときだけ緑の光を放つ。その仕組みは、オワンクラゲの化学発光タンパク質 (Aequorin : エクオリン) の短波長光 (emission, 極大 470 nm) を放射する代わりに、その励起エネルギーを蛍光タンパク質 (GFP) にシフトさせ、より長波長の光 (excitation, 極大 508 nm) を放射する⁶⁾。その後、1992 年に Pracher らは、GFP の遺伝子組換えに成功した⁷⁾。さらに、1994 年、井上らが大腸菌の GFP 遺伝子の発現を、また、Chalfie らが線虫における発現をそれぞれ報告した^{8),9)}。これにより *Aequorea* GFP の機能的異所性発現が明らかになった。つまり、*Aequorea* 特有の酵素は必要なく、ただ GFP の遺伝子を導入すれば、どのような種族においても蛍光を発光できるようになった。GFP は、238 個のアミノ酸からなるタンパク質である。この結晶構造は、1996 年に、Ormo ら、Yang らによりそれぞれ大腸菌につくらせたりコンビナント GFP を材料にして解明された^{10),11)}。彼らの発見により、GFP 変異種の研究が容易にできるようになり、GFP 遺伝子はリポーター、またマーカーとして、現在はその研究がますます普及している。この GFP の利用例としては、遺伝子解析、細胞内オルガネラやタンパク質の可視化、細胞種特異的ラベルなどが挙げられるが、以下に GFP をレポーターとして用いた細胞マーキングシステムについて示す。すなわち、細胞種特異的プロモーターの制御下に GFP を発現するような形質転換個体を作製すれば、ある細胞のみをラベルすることができるというものであり、また FACS (fluorescent activated cell sorting) を用いて、GFP 陽性細胞を個体から

分離することもできる。

対象となるラットは、CAGプロモーター制御下にGFP遺伝子を受精卵にマイクロインジェクションさせ誕生させたGFPトランスジェニックラットである。皮膚、骨格筋、骨髄、心臓、肺、肝、膵、脾、末梢血（顆粒球およびリンパ球）にGFPの発現をもつ¹²⁾。この成体では、肺および肝でGFPコントラストが増すという特性を生かして、同一個体内で肺や肝における好中球のイメージングを行うことが可能となる¹³⁾。LPS (lipopolysaccharide) による肝細胞障害をモデルとし好中球の観察を行ったところ、LPS投与直後より輝度の高いGFP陽性細胞（好中球）が、肝類洞を中心にトラッピングされる様子をリアルタイムに観察することができる（図8.4）。

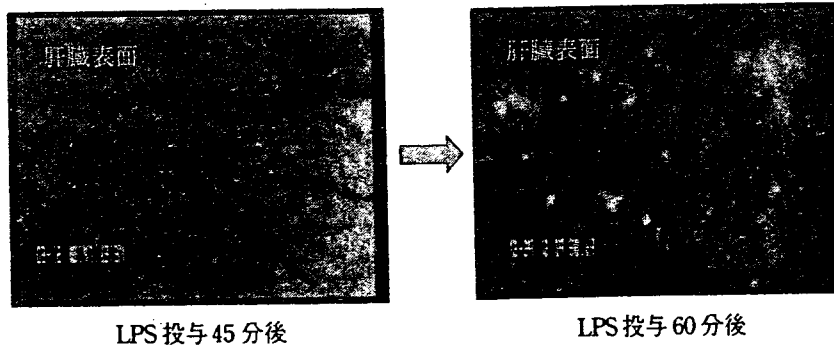
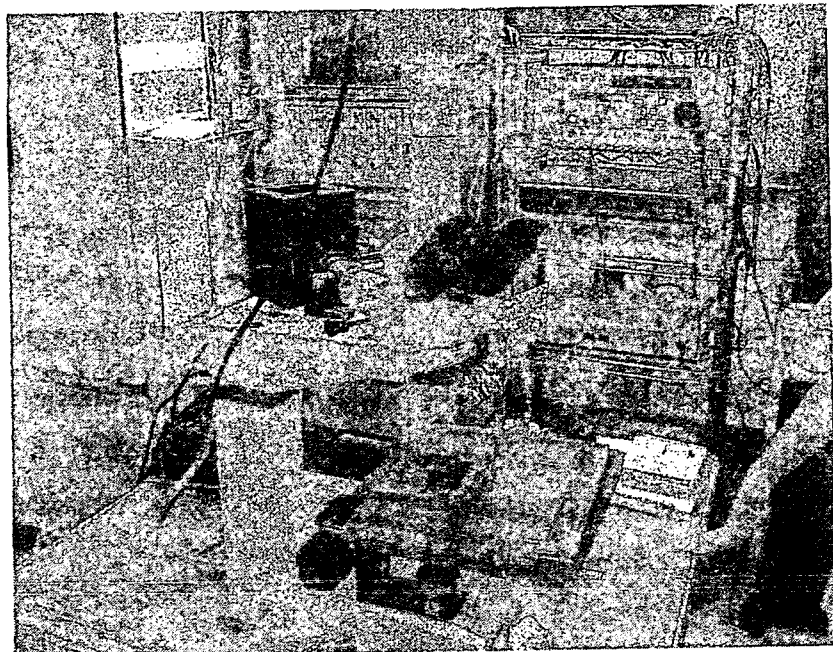


図8.4 CCDカメラ付き蛍光顕微鏡（上），GFP Tg Wistar ラットにより
検出された好中球（下）

GFPを用いることの長所は、基質の投与が不要であること、また、赤色蛍光色素であるDsRedなどと組み合わせることで複数の蛍光色素での多重解析が可能であることが挙げられる。一方、バックグラウンドが高い、自家蛍光の可能性を否定できない、励起光の届く範

囲でしか観察できないという短所もある。また GFP 自体は通常の哺乳類が保持しているタンパク質でないため、生体では“異種”として扱われるという注意が必要である。実際、皮膚移植で確認すると、GFP を持つ皮膚はその遺伝子背景を同じくするラット、マウス上でも拒絶される。しかし、GFP はその迅速性や定量性から需要は高まっており、GFP を用いた *in vivo* イメージングもより広がりを見せると考えられる。

8.3.3 バイオフォトンクスによる *in vivo* 組織機能評価法

再生医療の評価のための計測・画像技術に対しては経ファイバー的かつ非（低）侵襲的・選択的な診断を可能にする光・レーザー計測技術が有効に活用される。これらの計測技術を用いた診断は光・レーザー光と対象である生体の相互作用を利用するものであり、ほぼすべての生体組織が対象となる。そのスケールはマクロな臓器・組織レベルの診断からマイクロ、ナノメートルオーダーの空間分解能を必要とする細胞・分子レベルの診断まで広い。

〔1〕 光音響法を用いた機能計測法 光音響（photoacoustic）法は再生医療における図 8.1 の治療前診断、組織培養の品質管理、経過観察と医療評価の条件をすべて満たす有用な方法と考えられる。本法の基本原理は、一定条件のパルス光を照射すると、吸収体において熱弾性過程により組織内で応力波が発生し、この経時変化を検出するものである。局所で発生した応力波が組織内を伝搬する過程で組織固有の粘弾性により減衰する現象を利用して組織の力学特性を評価することができる。光音響法による力学特性評価は石原美弥、佐藤正人らにより独自の着想に基づいた新たな計測法¹⁴⁾であるので、力学特性を変化させたゼラチンから成る生体モデルファントムを用いた原理実証実験が必要であるが、図 8.5 に示すように光音響法で測定した粘弾性パラメータである組織の粘性と弾性の比と、レオメーター（侵襲的粘弾性分析法）で測定した試料固有の粘弾性特性はほぼ一致する。

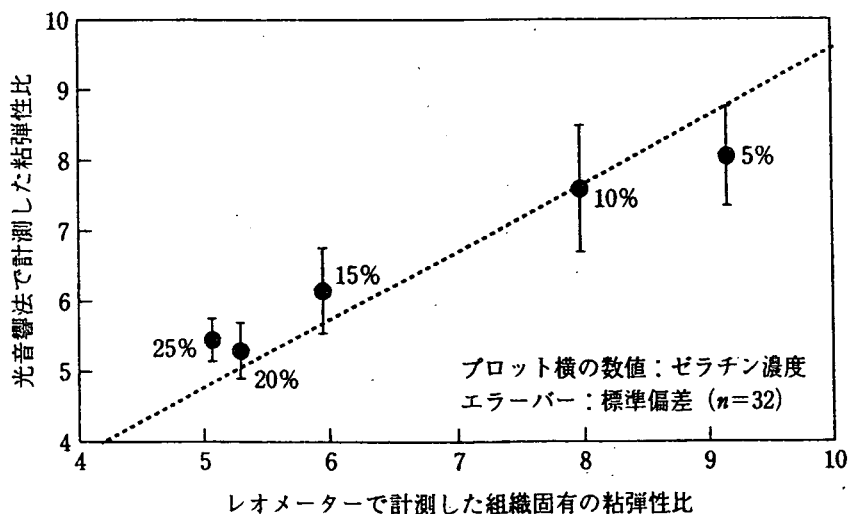
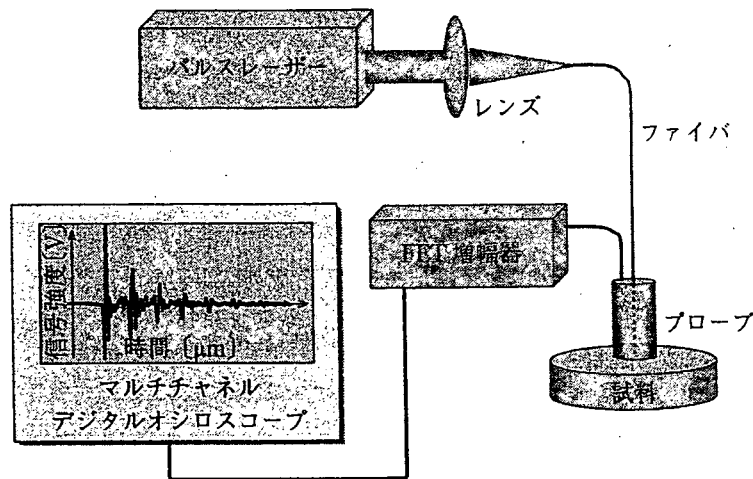
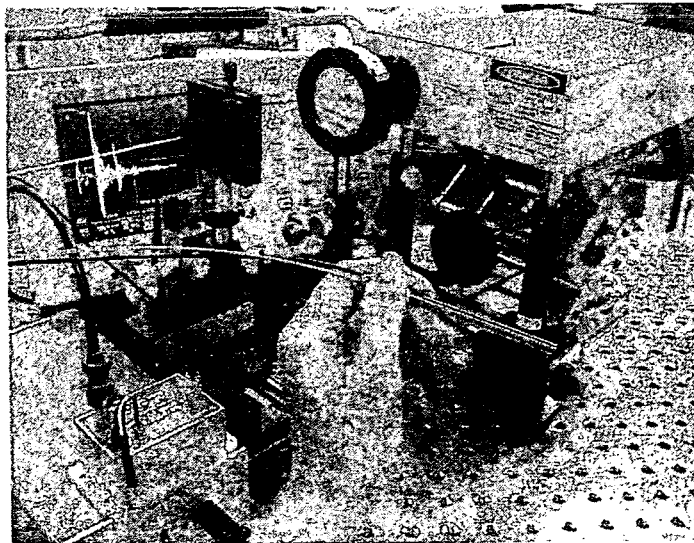


図 8.5 光音響法およびレオメーターで測定した粘弾性特性の相関

光音響波発生の励起光源としてはパルスレーザー光が用いられ、その出力光は光ファイバで導光し、生体損傷閾値よりも十分に小さい光エネルギーで計測は可能である¹⁵⁾。検出には高分子フィルムから構成される圧電センサを用いる。*in vivo* で使用可能なプローブに改良するため光ファイバと圧電センサを同軸に配置した構造の反射型プローブを作製した^{15),16)}。プローブの出力信号をFET増幅器で増幅して、マルチチャンネルデジタルオシロスコープで観測する。計測システムの全体図を図8.6(a)に示す。なお、臨床用装置として使用するためには可搬式のシステム構成にする必要があり、そのためには最適な波長を設定し、可搬式レーザー装置を光音響波発生の励起源に使用しなければならない。図(b)は、Nd:YAGレーザーの第三高調波(355 nm)を励起源とした可搬式光音響計測システムと反射型プローブの外観



(a) 光音響法による組織粘弾性低侵襲計測システム



(b) Nd:YAGレーザー光源を用いた可搬式光音響計測システムと反射型プローブの外観

図8.6 計測システム

プローブを示す。

軟骨の再生医療のバリデーションに本法を適用することの有用性を検討するため、膜付きアテロコラーゲンハニカムスポンジ (ACHMS-scaffold) を担体として、高密度かつ3次元で組織工学的手法を用いて佐藤正人 (東海大学医学部整形外科学) らにより作製された再生軟骨組織¹⁷⁻¹⁹⁾ を対象に、まず初めに *in vitro* で生体力学特性機能評価を行った (図8.7)。

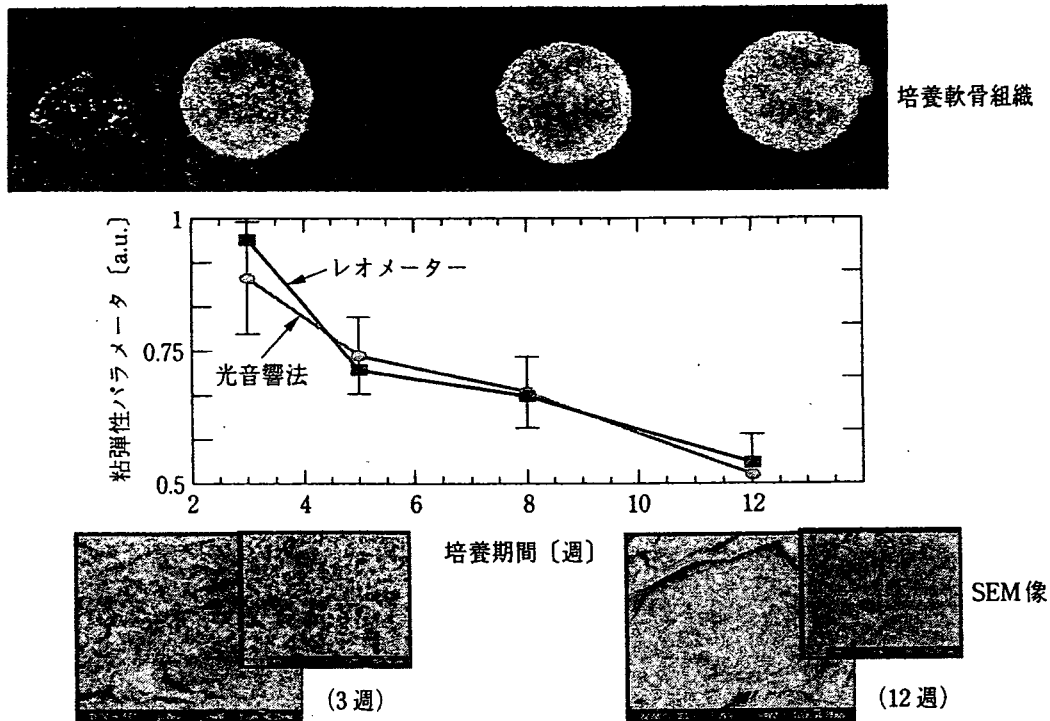


図8.7 光音響法による *in vitro* における培養軟骨組織の生体力学特性機能評価

軟骨の細胞外マトリックスの主要な構成成分であるコラーゲンとプロテオグリカン量を生化学的に分析したところ、培養期間が長くなるにつれてコラーゲンとプロテオグリカンのおのがほぼ単調増加しており、細胞外マトリックスが構築されていることを確認した。さらに、軟骨の成熟度を示す細胞外マトリックスの指標も培養期間に伴って増加していることがわかった。この試料に対して光音響法を培養期間中に繰り返して計測したところ、培養期間に伴って粘弾性パラメータは単調変化を示した²⁰⁾。この培養期間に伴う粘弾性パラメータの変化より、粘弾性を担う軟骨の構成成分の増加を示し、生化学的分析結果とともに軟骨細胞が培養過程において産生されたコラーゲンやプロテオグリカンなどを主要構成成分とする細胞外マトリックスを構築し、その結果、軟骨組織の粘弾性を獲得していることがわかる。すなわち、光音響法により組織性状の経時変化を反映する粘弾性パラメータを測定することが可能になる。さらに組織工学的軟骨組織を対象にした場合でも、レオメーターで測定した試料固有の粘弾性パラメータと光音響法で計測した粘弾性パラメータは一致する²¹⁾。以上の結果から、本計測技術は、移植用再生組織そのものの品質管理に有用である。

さらに再生医療における計測・画像技術が果たす役割と機能（図 8.1）における光音響法による治療前診断の可能性を検討するため、軟骨変性モデルを作製して光音響計測を施行した。軟骨変性モデルは酵素処理により細胞外マトリックスを修飾させた。酵素の処理時間が長いほど変性が進行し、これに伴って粘弾性が変化する様子が評価可能であった^{15),16)}。また、軟骨の細胞外マトリックスであるプロテオグリカンを生化学的に分析した結果と、測定した粘弾性パラメータの相関があることも判明した。酵素処理により軟骨の主要な機能を担う細胞外マトリックスが変性し、それに伴う粘弾性の変化を光音響法で評価できることから、光音響法は同時に治療前診断（変形性関節症の早期診断など）の可能性をもつことも示された。

さらに移植後の導入組織の粘弾性や周囲組織との生着を経時的に計測できるかを検討するために、家兎関節軟骨全層欠損モデルに対し組織工学的手法を用いた再生医療を施行した。家兎では自然治癒しない大きさとして直径 4 mm の関節軟骨全層欠損を作製し、その欠損部に組織工学的軟骨組織を移植する。光音響計測の有用性を検証するために、この過程において *in vitro* 計測と *in vivo* 計測の両者を施行した²²⁾。その結果は図 8.8 に示すように、培養 3 週間の組織工学的手法を用いて作製された軟骨の粘弾性パラメータは、*in vitro* でも *in vivo* でも計測値が一致する。すなわち、本光音響法が *in vitro* でも *in vivo* でも有効に測定できる方法であることがわかる。比較のために細胞培養開始時と全層欠損モデル作製前の家兎の正常関節軟骨を対象に測定した粘弾性パラメータも同図中に示すが、日本白色家兎の正常膝関節軟骨の粘弾性と比較すると、培養期間が長くなるほど生来の家兎膝関節軟骨の粘弾性に近づいている。軟骨組織の主要な機能である粘弾性に関して、組織工学的に作

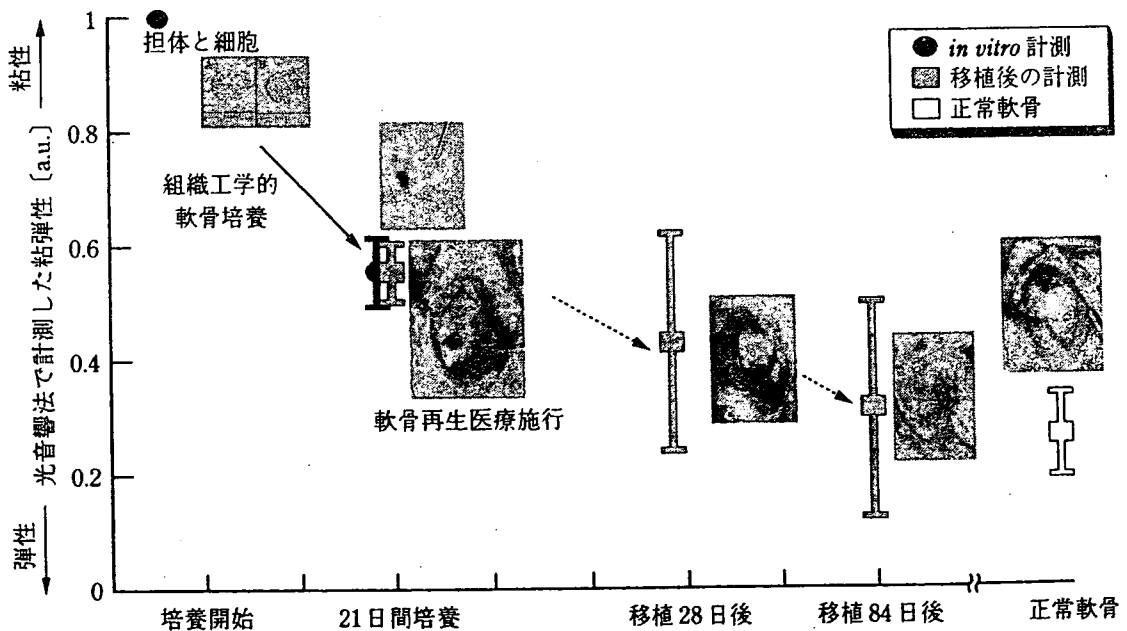


図 8.8 光音響法による家兎関節軟骨全層欠損モデルに対する再生医療の効果判定

製した軟骨組織と生来の軟骨組織を比較することで、再生軟骨組織の機能をどの程度まで獲得しているかを評価することができる。すなわち、光音響法により粘弾性機能の修復過程も評価することができ、組織学的検討結果とも合致した。非移植群では、関節軟骨の再生は組織学的検討からも光音響計測からも認められなかった。このように組織学的検討から裏付けられた関節軟骨再生過程を、非侵襲的な光音響法により、繰り返し同一対象試料の機能を評価することが可能である。

なお、本法は光計測の最大の欠点である散乱の影響を受けず、また後述する超音波計測法よりも高い空間分解能が得られる特色を持つ。一般的に光音響法はここで述べた力学特性計測よりは、むしろ光の吸収体の分布イメージング法として利用されている。したがって、例えば光の波長を血液の吸収波長に設定すれば、血管の深さ方向分布イメージングも可能となり、新生血管画像化技術などへの適用も考えられる。

〔2〕 光コヒーレンストモグラフィーを用いた形態計測法 光コヒーレンストモグラフィー (optical coherence tomography : OCT) は光の干渉現象を用いた断層イメージング技術である^{23)~24)}。OCT は光エコー法とも呼ばれており、イメージング深さは生体表皮下数 mm の範囲内であるが、従来の画像診断よりも格段に高い解像度 (空間分解能) を持つ。OCT の深さ方向の空間分解能は光源のコヒーレンス長によって決まる。すなわち、光源の波長スペクトルが広いほど分解能が高くなる。よく用いられるスーパーluminescentダイオード (SLD) の空間分解能は 10~20 μm である。OCT は光を生体に照射するだけの簡単な検査で生体断面の微細構造を観察できるため、眼科領域における網膜剝離などの眼底検査にいち早く実用化されている²⁵⁾。

OCT の光源には、時間的な一様性 (コヒーレンス) がきわめて低い光が用いられ、このような低コヒーレンス光源は正弦波振動はごく短時間にしか発生していない。具体的には、正弦波振動の持続時間 Δt はわずか 30 fs である。ここで、光速を c として $\Delta l_c = c \times \Delta t$ ($\sim 10 \mu\text{m}$) を SLD のコヒーレンス長と呼び、光源の時間的な一様性の目安となる。ちなみに、レーザー光では Δl_c は数 10 cm から数 m にもなる。

図 8.9 は眼球計測を対象にした OCT の仕組みを示す。基本は SLD を光源としたマイケルソン干渉計であり、光源から出た光は半透明鏡 (ビームスプリッター) によって、透過光と反射光とに二分される。透過した光は測定光と呼ばれ、これは測定対象物に向かって直進し、組織内の深さの異なる点で反射したのち、反射測定光となってビームスプリッターに戻ってくる。この反射測定光は、生体組織の境界 (角膜の表面、水晶体の表面と裏面、網膜面など) からの多くの光エコーから構成される。一方、ビームスプリッターで反射された光は参照光ミラーで反射して、反射参照光となってビームスプリッターに戻ってくる。ここで、ビームスプリッターを基準にして角膜の表面と参照光ミラー位置が光学的に等距離であれ

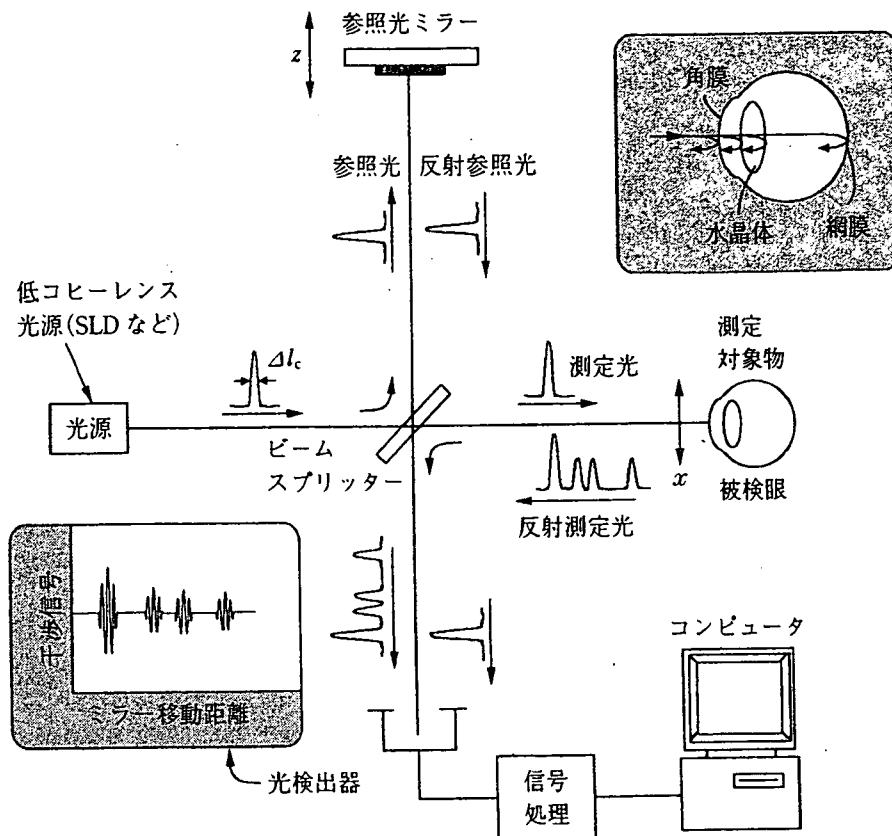


図 8.9 OCT による測定の原理 (大阪大学・近江雅人氏より提供)

ば、光検出器の手前で反射測定光と反射参照光が時間的に一致し、両者は干渉して大きな信号を得る。水晶体や網膜からの干渉信号を得るには、参照光ミラーをうしろに移動して光エコーを時間的にずらしてやればよい。このように干渉現象を利用して、生体内からの反射点を参照光ミラーの走査位置によって特定できる。その精度は光エコーの幅、コヒーレンス長 Δl_c である。断層イメージをつくるには、測定光を紙面の横方向 (x 方向) にステップ状に移動し、各ステップごとにミラーを z 方向に走査し、紙面内 (x - z 面内) のデータを得る。

この OCT の干渉光学系は光ファイバで構成することができ、内視鏡に組み入れることも容易である。したがって、*in vitro* での非侵襲的断層イメージングだけでなく、*in vivo* でのイメージングも可能となり、再生医療への利用が大いに期待されている。

8.3.4 超音波による *in vivo* 組織機能評価法

超音波によって物体が加振されるとき抵抗の大きさは音圧を振動の速度で割った値で表現され音響インピーダンス (acoustic impedance) と呼ばれる。等方性材料における縦波 (圧縮波) の伝達を考えると、物質の密度を ρ 、その内部での音速を C とすれば、音響インピーダンス Z は、 $Z = \rho C$ で与えられる。音速 C は物質の密度 ρ と圧縮弾性率 (bulk modulus) K によって、 $C = \sqrt{K/\rho}$ と表現され、両式から C を消去すると、 $Z = \sqrt{\rho K}$ とな

る。媒質1と媒質2の界面に平面波が垂直に入射する場合には反射率 r 、すなわち反射波の強さ（音圧）を入射波の強さで割った値は、各媒質の音響インピーダンス Z_1 と Z_2 によって

$$r = \frac{Z_2 - Z_1}{Z_2 + Z_1} \quad (8.1)$$

で表される。すなわち、超音波の反射は音響インピーダンスの異なる物質の界面で生じ、それらの大きさの違いが大きいほど反射率が高い。

超音波は物体の振動現象であり、電磁波と異なってほとんど非侵襲であるので、簡便な診断法として医療に広く用いられる。医用分野における超音波波形の表示法は、つぎのモード法に分類される。

- ① Aモード法：超音波パルスの反射波形を時間軸上に表示する。
- ② Bモード法：トランスデューサを走査させて超音波パルスの反射波強度を明暗に変えて走査ごとに逐次画面にして2次元画像を表示する。
- ③ Mモード法：トランスデューサを静止状態に保ち、超音波パルスの反射波強度を明暗に変えて逐次画面にして直線上における生体の動きを表示する。

軟組織では音速はほとんど変化しないので、超音波パルスが発生してから反射波が検出されるまでの時間はトランスデューサから反射位置までの距離を示すとみなせる。したがってBモード法の2次元画像は生体内部の断面における組織像を示す。また断面内における反射率の分布から音響インピーダンス、組織の密度、硬さ（圧縮弾性率）のわずかな変化を検出して病変を発見することも可能である。

図8.10は京都大学再生医科学研究所ナノバイオメカニズムの池内健らにより超音波パルス計測における反射波の測定例をAモードで示したものである。試料はブタ膝関節から採取した軟骨であり、超音波の中心周波数は10MHzである。図中において左側の波は軟骨表面から反射した超音波を示し、右側の波は軟骨と軟骨下骨の境界から反射したものであ

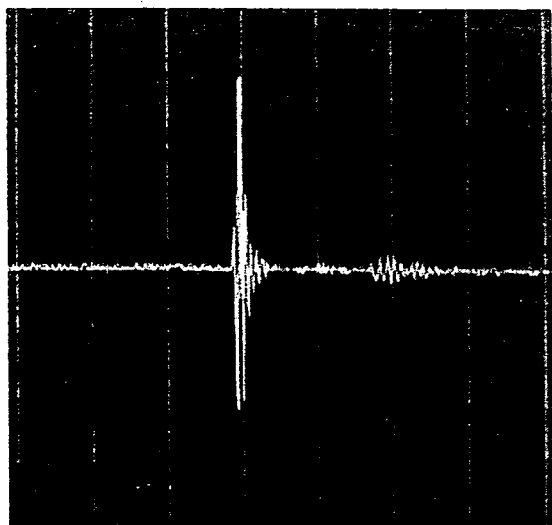


図8.10 Aモードで表示された波形。左の強い波は軟骨表面からの反射波で、右の弱い波は軟骨と軟骨下骨の境界からの反射波である。（京都大学再生医科学研究所・池内健氏より提供）

る。超音波の媒体は生理食塩水なので Z_1 は既知である。そこで軟骨表面からの反射波の振幅すなわち強度から r を確定すれば、 Z_2 の値が決まる。別の方法で ρ_2 を測定すれば C_2 の値が決まるので、2 個の波の間隔から軟骨の厚さがわかる。逆に軟骨の厚さが既知であれば軟骨内部での音速 C_2 を決定できる。また軟骨の表面粗さと不均質性のために乱反射と内部反射が生じるので、反射波の持続時間から組織の性質を推定できる。図の左側に表示された軟骨表面からの反射波は超音波とパルス波が重なった波であるので、図における振幅の最大値が必ずしも最大強度を示すわけではない。また反射波の持続時間を正確に決めるのは意外に困難である。なお、急激に変化する波形を分析して定量化するために超音波パルスを多くの波（ウェーブレット）の集合で表現するウェーブレット変換が考案されている。この方法を用いれば変化する波における周波数分布を求めることができ、反射波の最大強度と持続時間を計算することが可能である。

一般に、再生した組織が成熟するほど密度と圧縮弾性率が高くなるので音響インピーダンスと反射率が高くなる。すなわち反射波の強度が高いほど良好な組織が再生したとみなせる。超音波による再生組織の評価は京都大学再生医科学研究所の池内健、堤定美らにより進められている。例えば関節軟骨では、線維性軟骨から硝子性軟骨に近づくにつれて内部の膨潤圧力が高くなり、体積弾性率が高くなる結果、音響インピーダンスと反射率が高くなる²⁶⁾。上述したように、ウェーブレット変換を利用して、軟骨の欠損に対する再生医療や骨軟骨移植術の成績を評価することができる²⁷⁾。超音波計測により自然に再生する軟骨はすべて線維性であるが、骨髄液や培養軟骨細胞を用いれば良好な軟骨が形成され、実用的な再生技術が実現しつつあることが確認されている。臨床治療においても超音波計測は再生軟骨の診断と評価に適用される²⁸⁾。ただし、軟骨表面とトランスデューサが傾くと測定される反射波の強度が低下するので、関節鏡下でプローブを高い精度で操作する必要がある。

8.3.5 MRI による細胞追跡法

再生医学の発展により、ES 細胞から分化させた細胞やさまざまな種類の幹細胞を投与して治療するという細胞治療が現実味を帯びてきた。こうした細胞治療には、移植した細胞を非侵襲的に可視化してとらえる技術が有効である²⁹⁾。その一つの手段として期待されているのが、核磁気共鳴画像（magnetic resonance imaging : MRI）を用いて細胞を非侵襲的に体内追跡する技術であり、MR トラッキング（MR tracking）法と呼ばれている³⁰⁾。

〔1〕 MR トラッキング用の標識試薬 MR 画像は生体内の水分子の水素原子核に由来する MR 信号を検出して画像化したものであるが、通常の MR 画像法では、移植細胞と非移植細胞を見分けることは難しい。そこで MR トラッキング法では、MR 信号の緩和時間を変化させる造影剤を用いて、移植細胞を磁気標識する手段が用いられている。MR 信号

の信号強度が減少すれば、MR画像では黒く見え、逆に、信号強度が相対的に増強するとMR画像では白く見える画像が得られる³¹⁾。

MRトラッキング法のための細胞標識試薬として、現在最も使われているのは、MRIの陰性造影剤として普及している超常磁性酸化鉄 (super paramagnetic iron oxide : SPIO)、超常磁性を示す酸化鉄粒子で径が小さいUSPIO (ultra-small super paramagnetic iron oxide)、酸化鉄の単結晶であるMION (monocrystalline iron oxide) などである^{31)~33)}。

〔2〕細胞の磁気標識法 MRIを用いて細胞をトラッキングするためには、超常磁性酸化鉄を細胞内に効率よく取り込ませることが必要である。そのため、いくつかの非ウイルス系の遺伝子導入試薬が使用されている^{32),34)}。遺伝子や細胞膜が負の電荷を持っているため、ほとんどの遺伝子導入試薬は、正の電荷を持つポリマーやタンパク質、あるいは脂質などから構成されている。超常磁性酸化鉄と複合体を形成させて、導入試薬の持つ正の電荷を利用して細胞膜に結合したあと、貪食作用によって取り込まれる。これまでに使用されてきた導入試薬としては、carboxy-terminated dendrimer, FuGENE, SuperFect, PolyFect, Plus/Lipofectamine, Effectene, poly-L-lysine^{32)~34)} などがある。しかし、超常磁性酸化鉄はこれらの試薬と同じ正の電荷を持っているため、導入効率が減少する可能性が示唆されている³³⁾。

最近、新たな非ウイルス系の遺伝子導入試薬である、センダイウイルスのベクター・エンベロープ (hemagglutinating virus of Japan-envelope : HVJ-E) を利用し、超常磁性酸化鉄を効率よく細胞の中に取り込ませることに成功している³⁵⁾。HVJ-Eは、細胞膜融合活性を残したままウイルス増殖活性を完全に不活化した低細胞毒性の導入試薬で、プラスミドDNA、低分子核酸、タンパク質だけではなく、超常磁性酸化鉄もHVJ-Eに封入できる^{35),36)}。電荷を利用せず、ウイルスエンベロープのもつ膜融合能を介して目的の物質を細胞内に移送するため、効率よく超常磁性酸化鉄を細胞質内に導入できる。

図8.11にマウスの神経幹細胞をSPIOで標識しラットの線条体に移植したあとに、2T

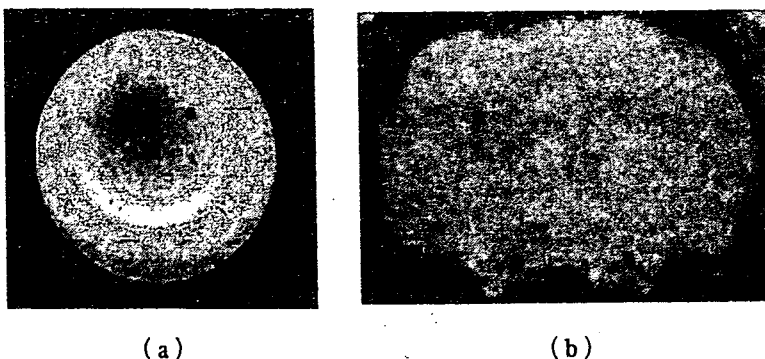


図8.11 磁気標識したマウス神経幹細胞を模擬組織 (a) およびラット線条体 (b) に移植後、2TのMRI装置で画像化したもの。模擬組織には700個、ラット線条体には1250個移植した。

(テスラ) の MRI 装置で観察した結果を示す。MR 造影剤と細胞標識法の進歩により、臨床で多く使われている MRI 装置とほぼ同じ 2 T の MRI 装置で、数百個から 1 000 個の移植細胞を明りょうに観察できる。また、強い造影効果が得られるようになり、従来の T2 強調画像のみならず、T1 強調画像での追跡も可能になっている。その結果、解剖学的構造もよく把握できるようになり、マウスのような小動物でも MRI による細胞追跡が可能になった (図 8.12)。



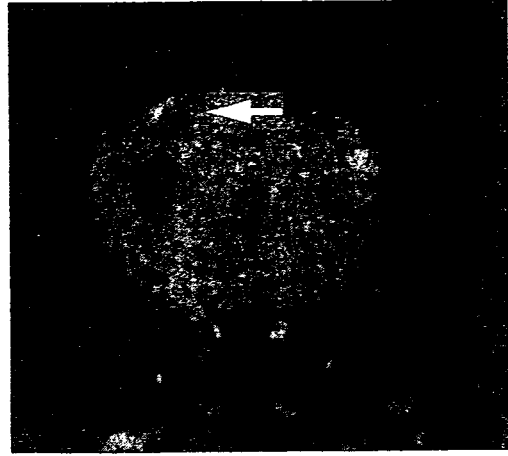
図 8.12 磁気標識したマウス神経幹細胞をマウス海馬に移植し、2 T の MRI 装置で画像化

現在、疾患モデルとして遺伝子改変マウスが多数開発されている。MR トラッキング法がマウスに応用可能になったことにより、遺伝子改変モデルマウスを用いた細胞治療研究に貢献できると期待される。図 8.13 は、マウスの神経幹細胞とアストロサイトを SPIO で標識し、ラットの線条体に移植し、移植 1 日目と 3 週間後に MRI 装置で観察した結果を示している。移植 1 日目には、移植した神経幹細胞 (図 (a))、アストロサイト (図 (c)) とともに、線条体に局在している。3 週間後になると、移植した神経幹細胞の一部が傷ついた脳表に向かって移動している所見が明りょうに観察される (図 (b) の矢印)。一方、移植したアストロサイトは移植部位にとどまっている (図 (d))。この結果は、神経幹細胞が傷害された脳領域に向かって脳内を移動する性質を強く持つことを示している。このように MR トラッキング法により、動物を殺傷することなく移植細胞を追跡することができる。

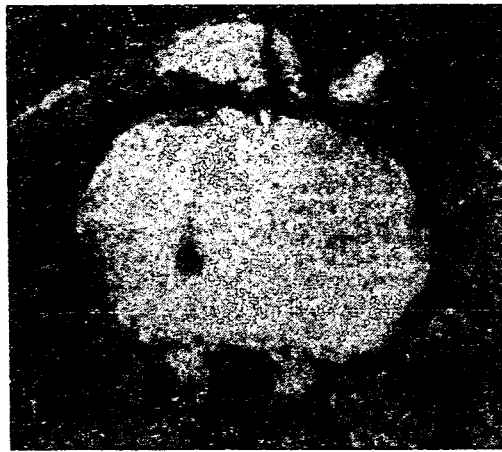
MR 画像による細胞追跡法は、再生医療や細胞治療研究に重要な画像法になると期待される。しかしながら、いくつかの問題点も指摘されている。超常磁性酸化鉄による細胞標識は、標識方法の改善により、培養細胞の段階での毒性をかなり減弱できるようになった。しかしながら、移植後に生体内に多量に存在する酸素を活性化させるなど、毒性を示す可能性は否定できない。移植細胞が死亡したあとに、細胞外に出た鉄粒子が比較的長期間、残存する点も欠点である。さらに陰性造影剤であるため、もともと MR 信号が低い骨組織などでの追跡には不向きである。また、本来 MR で検出されるはずの代謝産物の MR 信号まで減



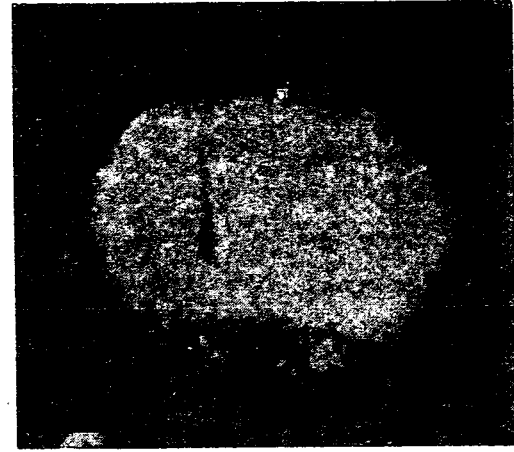
(a) 神経幹細胞, 1日目



(b) 神経幹細胞, 3週間後



(c) アストロサイト, 1日目



(d) アストロサイト, 3週間後

図 8.13 磁気標識したマウスの神経幹細胞とアストロサイトをラット線条体に移植後, MRI で経時的に追跡

弱さしてしまう。これらの問題を解決するために、新たな細胞標識剤の開発が強く望まれており、とりわけ安全で高感度な陽性の標識剤の登場が待たれる。陽性の標識剤としては、従来から使われているガドリニウム製剤に加え、最近では、フッ素 (^{19}F) 画像を利用した標識剤が報告されている^{37),38)}。

再生医療の進展に伴い、再生医療技術や細胞治療法を臨床応用する段階にきている。人体への負担を軽減するためにも、本項で述べた MR トラッキング法を含めた非侵襲的画像診断法は、今後ますます重要になってくると思われる。

8.4 おわりに

再生医療の基盤技術としての計測・画像工学と題した本章は、再生医療にすでに応用され

ている計測・画像技術，将来再生医療での活用が期待される技術，おのおのを掲載した。これらの技術により再生医療の質の担保（バリデーション）が確立されることになり，同時に安全性が確保されることから，再生医療を実現させるためにはきわめて重要な役割と理解していただきたい。また今後，この分野が益々発展していくことを切望する。

この場をお借りして，執筆にご協力いただきました先生方に感謝いたします。

引用・参考文献

- 1) 石原美弥, 佐藤正人, 菊地 眞: 再生医療における機能評価とバリデーションのための計測・画像技術, 再生医療, 2, 4, pp.47-54 (2003)
- 2) 石原美弥, 佐藤正人, 持田譲治, 菊地 眞: 再生医療を具現化するための基盤技術としての光計測・評価技術, 「遺伝子医学」MOOK「再生医療へのプレイクスルー——その革新技術と今後の方向性——」, 田畑泰彦編, pp.228-232, (株)メディカルドゥ (2004)
- 3) 石原美弥, 佐藤正人, 菊地 眞: 臓器の評価技術, 図解再生医療工学, 立石哲也他 編著, pp.225-232, 工業調査会 (2004)
- 4) Sato, Y. and Ajiki, T. et al.: A novel gene therapy to the graft organ by a rapid injection of naked DNA I: Long-lasting gene expression in a rat model of limb transplantation, *Transplantation*, 76, pp.1294-1298 (2003)
- 5) Sweeney, T. J. et al.: Visualizing the kinetics of tumor-cell clearance in living animals, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 12, 96, pp.12044-12049 (1999)
- 6) Shimomura, O. et al.: Extraction, purification and properties of aequorin, a bioluminescent protein from the luminous hydromedusan, *Aequorea*, *J. Cell Comp. Physiol.*, 59, pp.223-239 (1962)
- 7) Prasher, D. C. et al.: Primary structure of the *Aequorea Victoria* green-fluorescent protein, *Gene.*, 15, 111, pp.229-233 (1992)
- 8) Inoue, S. and Tsuji, F. I.: Evidence for redox forms of the *Aequorea* green fluorescent protein, *FEBS lett.*, 5, 351, pp.277-280 (1994)
- 9) Chalfie, M. et al.: Green fluorescent protein as a marker for gene expression, *Science*, 11, 263, pp.802-805 (1994)
- 10) Ormo, M. et al.: Crystal structure of the *Aequorea victoria* green fluorescent protein, *Science*, 6, 273, pp.1392-1395 (1996)
- 11) Yang, F. et al.: The molecular structure of green fluorescent protein, *Nature Biotech.*, 14, pp.1246-1251 (1996)
- 12) Hakamata, Y. et al.: Green fluorescent protein-transgenic rat: a tool for organ transplantation research, *BBRC*, 286, pp.779-785 (2001)
- 13) Sakuma, Y. and Sato, Y. et al.: Lympho-myeloid chimerism achieved by spleen graft of green fluorescent protein transgenic rat in a combined pancreas transplant model, *Transplant Immunol.*, 12, pp.115-122 (2004)
- 14) Ishihara, M. et al.: Viscoelastic characterization of biological tissue by photoacoustic

- measurement, *Jpn. J. Appl. Phys.*, **42**, 5 B, pp.556-558 (2003)
- 15) Ishihara, M. et al. : Development of Diagnostic System for Osteoarthritis Using the Photoacoustic Measurement Method, *Lasers in Surgery & Medicine*, **38**, pp.249-255 (2006)
 - 16) Ishihara, M. et al. : Applicability of photoacoustic measurement for biomechanical characterization ; from in vitro engineered tissue characterization to in vivo diagnosis, *Proc. of SPIE*, **5319**, pp.11-14 (2004)
 - 17) Sato, M. et al. : An experimental study of the regeneration of the intervertebral disc with an allograft of cultured annulus fibrosus cells using a tissue-engineering method, *Spine*, **28**, 6, pp.548-553 (2003)
 - 18) Sato, M. et al. : An atelocollagen honeycomb-shaped scaffold with a membrane seal (ACHMS-scaffold) for the culture of annulus fibrosus cells from an intervertebral disc, *J. Biomed. Mater. Res.*, **64**, 2, pp.248-56 (2003)
 - 19) Sato, M. et al. : Tissue engineering of the intervertebral disc with cultured annulus fibrosus cells using atelocollagen honeycomb-shaped scaffold with a membrane seal (ACHMS scaffold), *Medical & Biological Engineering & Computing*, **41**, 3, pp.365-371 (2003)
 - 20) 石原美弥 ほか：軟骨再生医療のための光音響法を用いた粘弾性評価システムの開発, *レーザー研究*, **32**, 10, pp.640-644 (2004)
 - 21) Ishihara, M. et al. : Usefulness of photoacoustic measurements for evaluation of the biomechanical properties of tissue-engineered cartilage, *Tissue Engineering*, **11**, 7-8, pp.1234-1243 (2005)
 - 22) 石原美弥 ほか：軟骨再生医療の評価に用いる光音響法の開発, *レーザー医学会誌*, **26**, 1, pp.53-59 (2005)
 - 23) Huang, D., Swanson, E. A., Lin, C. P., Schuman, J. S., Stinson, W. G., Chang, W., Hee, M. R., Flotte, T., Gregory, K., Puliafito, C. A. and Fujimoto, J. G. : Optical coherence tomography, *Science*, **254**, pp.1178-1181 (1991)
 - 24) 春名正光, 近江雅人 : 医療を中心とする光コヒーレンストモグラフィーの技術展開, *レーザー研究*, **31**, pp.654-662 (2003)
 - 25) Puliafito, C. A., Hee, M. R., Lin, C. P., Reichel, E., Schuman, J. S., Duker, J. S., Izatt, J. A., Swanson, E. A. and Fujimoto, J. G. : Imaging of macular disease with optical coherence tomography (OCT), *Ophthalmology*, **102**, pp.217-229 (1995)
 - 26) Hattori, K. et al. : Measurement of the mechanical condition of articular cartilage with an ultrasonic probe ; quantitative evaluation using wavelet transformation, *Clinical Biomechanics*, **18**, pp.553-557 (2003)
 - 27) Kuroki, H., Nakagawa, Y., Mori, K., Ikeuchi, K. and Nakamura, T. : Mechanical effects of autogenous osteochondral surgical grafting procedures and instrumentation on grafts of articular cartilage, *Am. J. Sports Med.*, **32**, 3, pp.612-620 (2004)
 - 28) Hattori, K. et al. : Quantitative arthroscopic ultrasound evaluation of living human cartilage, *Clinical Biomechanics*, **19**, pp.213-216 (2004)
 - 29) 犬伏俊郎 : MR (核磁気共鳴) 分子・細胞画像——生体内幹細胞の無侵襲追跡技術——, *月刊バイオインダストリー*, **21**, pp.36-42 (2004)
 - 30) Bulte, J. W. M., Zhang, S.-C., Van Gelderen, P., Herynek, V., Jordan, E. K., Duncan, I. D.

- and Frank, J. A. : Neurotransplantation of magnetically labeled oligodendrocyte progenitors : magnetic resonance tracking of cell migration and myelination, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **96**, 22, pp.15256-15261 (1999)
- 31) Bulte, J. W. M., Douglas, T., Witwer, B., Zhang, S.-C., Lewis, B. K., van Gelderen, P., Zywicke, H., Duncan, I. D. and Frank, J. A. : Monitoring stem cell therapy in vitro using magnetodendrimers as a new class of cellular MR contrast agent, *Acad. Radiol.*, **9**, suppl. 2, pp.S 332-S 335 (2002)
- 32) Frank, J. A., Zywicke, H., Jordan, E. K., Mitchell, E. J., Lewis, B. K., Miller, B., Bryant, H. and Bulte, J. W. M. : Magnetic intracellular labeling of mammalian cells by combining (FDA-approved) superparamagnetic iron oxide MR contrast agents and commonly used transfection agents, *Acad. Radiol.*, **9**, suppl. 2, pp.484-487 (2002)
- 33) Hoehn, M., Kustermann, E., Blunk, J., Wiedermann, D., Trapp, T., Wecker, S., Focking, M., Arnold, H., Hescheler, J., Fleischmann, B. K., Schwint, W. and Buhle, C. : Monitoring of implanted stem cell migration in vivo : Magnetic resonance imaging investigation of experimental stroke in rat, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **99**, 25, pp.16267-16272 (2002)
- 34) Frank, J. A., Miller, B. R., Arbab, A. S., Zywicke, H. A., Jordan, E. K., Lewis, B. K., Bryant, L. H. and Bulte, J. W. H. : Clinically applicable labeling of mammalian and stem cells by combining superparamagnetic iron oxides and transfection agents, *Radiology*, **228**, 2, pp. 480-487 (2003)
- 35) Toyoda, K., Tooyama, I., Kato, M., Sato, H., Morikawa, S., Hisa, Y. and Inubushi, T. : Effective magnetic labeling of transplanted cells with HVJ-E for magnetic resonance imaging, *Neuroreport*, **15**, 4, pp.589-592 (2004)
- 36) 加藤雅也 : 高機能トランスフェクションキット HVJ-Envelope VECTOR KIT (Genom ONE™), *BIO Clinica*, **17**, 7, pp.615-619 (2002)
- 37) Ahrens, E. T., Flores, R., Xu, H. and Morel, P. A. : In vivo imaging platform for tracking immunotherapeutic cells, *Nat. Biotechnol.*, **23**, 8, pp.983-987 (2005)
- 38) Maki, J., Masuda, C., Morikawa, S., Morita, M., Inubushi, T., Matsusue, Y., Taguchi, H. and Tooyama, I. : A novel reagent, poly-L-lysine-CF₃, for MR tracking of transplanted ATDC5 cells, *Biomaterials*, **28**, 3, pp.434-440 (2007)