

2008/2013A

厚生労働科学研究費補助金

医療機器開発推進研究事業

細胞移植医療における細胞の *in vivo* イメージングへ向けた
新規細胞ラベル化用 MRI 造影剤の開発

平成20年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 山岡 哲二

平成21年(2009年) 4月

別添 1

厚生労働科学研究費補助金

医療機器開発推進研究事業

細胞移植医療における細胞の *in vivo* イメージングへ向けた
新規細胞ラベル化用 MRI 造影剤の開発

平成 20 年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 山岡 哲二

平成 21 年 (2009 年) 4 月

目 次

I. 総括研究報告

細胞移植医療における細胞の *in vivo* イメージングへ向けた
新規細胞ラベル化用 MRI 造影剤の開発 1
山岡 哲二

II. 分担研究報告書

1. MRI 用造影剤の分子量による効果とラベル化法の検討 20
山岡 哲二

2. ラット血管内皮前駆細胞移植による下肢虚血治療実験 33
飯田 秀博

3. 細胞移植における 3 次元スキャホールドを用いた移植方法の確立
..... 43
中谷 武嗣

4. ラット間葉系幹細胞を用いた造影剤の *in vitro* 評価と細胞移植 54
橘 洋一

III. 研究成果の刊行に関する一覧表 76

IV. 研究成果の刊行物・別刷 89

厚生労働科学研究費補助金 (医療機器開発推進研究事業)
総括研究報告書

「細胞移植医療における細胞の *in vivo* イメージングへ向けた
新規細胞ラベル化用 MRI 造影剤の開発」

主任研究者 山岡哲二 国立循環器病センター研究所
先進医工学センター生体工学部長

研究要旨 優れた臨床成績が報告されつつある細胞移植療法では、移植細胞の生着率がきわめて低いと考えられ、また、細胞移植による治癒の作用機序もいまだ解明されていない。本研究課題では、細胞移植療法の臨床化のための EBM 構築を目指して、移植細胞の生体内運命を低侵襲的に追跡する MRI 撮像システムを構築する。細胞の長期 *in vivo* イメージングを可能にする細胞ラベル化用 MRI 造影剤によりラベルした幹細胞を下肢虚血や心筋梗塞ラットに移植しそのイメージングと組織機能を回復を検討する。

飯田秀博：国立循環器病センター研究所
放射線医学部・部長
中谷武嗣：国立循環器病センター
移植部・部長
橘 洋一：国立循環器病センター研究所
生体工学部研究員

A. 研究目的

近年、細胞移植治療は再生医療の主要研究となりつつある。これは、臓器移植治療における圧倒的なドナー不足に端を発し、大きな社会問題となっていることが一つの要因である。現在、ほぼすべての組織・臓器の再生が臨床応用を目指して研究されており、皮膚、軟骨、角膜、血管などの再生は技術的には臨床応用

可能な段階に達している。

これまでの研究では、疾患モデル動物に対して細胞を移植し、所定期間後に犠牲死させて、組織・臓器の修復過程を観察してきた。しかしながら、その治癒過程は全く不明であり、臨床応用を目指す上では、経時的、かつ非侵襲・非破壊的に修復過程のイメージングする技術が必須である。細胞移植から組織・臓器の修復への経過プロセス（移植細胞が、移植部位において増殖して組織を再構築しているのか、あるいは、これらの細胞が産生する細胞増殖因子などによるパラクライン効果なのか）の解明なしに、再生医療の EBM 構築は期待できない。細胞移植における経過プロセスを明らかにすることは、病態に合わせたテーラ

ーメイド治療法の構築をも可能にする。さらに、有効なトランスレーショナル研究システムを構築するためには小動物から大動物さらには臨床の場での *in vivo* 細胞イメージングが必須技術である。

移植細胞を標識するための MRI 造影剤は、低毒性で細胞増殖挙動に影響を及ぼさないこと、また、細胞内に安定に長期間滞留すること、さらに、細胞が死滅した場合には速やかに体外に排泄されることが課題となる。我々は、これら全ての性質を有する細胞移植用 MRI 造影剤を開発した（特願 2006-310159、PCT/JP2007/72008）。加えて、下肢虚血モデルラットを作成し、標識した細胞（血管内皮前駆細胞、間葉系幹細胞）の移植を行い、MRI を用いて移植細胞を検出することに成功した。

以上の結果を基に、組織切片を用いた病理診断と MRI データとを比較して移植細胞の運命を追跡する。同時に、様々な病変に対応すべく、下肢虚血モデルだけでなく心虚血モデルでの実験をラットからブタにおいて細胞移植を行い、MRI による細胞イメージングを実施する(図 1)。移植部位での *in vivo* イメージングが可能となれば、今後の再生医工学の臨床化における評価系としての利用、EBM 構築における基盤技術となる。

B. 研究方法

B-1. 水溶性高分子-DOTA-Gd の合成

主鎖高分子としては、細胞膜との相互作用が極めて小さいために、初年度に選択したポリビニルアルコール (PVA)、および、薬物キャリアーとして広く研究

されているデキストランを選択し、DOTA 導入反応に供した。いずれも、分子内のカルボキシル基をカルボジイミド法により活性化し、1,3-プロパンジアミンを導入した。続いて DOTA と反応させて高分子-diamine-DOTA を合成し、さらに、DOTA に対して 5 倍等量の $GdCl_3 \cdot 6H_2O$ (SIGMA-ALDRICH, Inc.) を添加して最終生成物である高分子-DOTA-Gd を得た。

高分子中のガドリニウムは、誘導結合プラズマ発光分光分析により定量し、縦緩和時間 (T1) は水 (0.625%) / 重水 (99.375%) 混合で測定した

B-2. 造影剤の細胞への送達

標的細胞としては、まず、モデルとしてマウスの胎児皮膚から分離された NIH-3T3 細胞を選択した。次に、虚血モデルへの移植実験を行うために、マウス骨髄由来間葉系幹細胞、および、G-CSF にて誘導を書けた骨髄由来血管内皮前駆細胞 (EPC) を単離し、増殖して用いた。

細胞内への高分子-DOTA-Gd 造影剤の導入方法としては、あらゆる細胞に、簡便に送達できることから、エレクトロポレーション法を選択し、低毒性での導入を達成した。具体的には、電極として 5 mm ギャップのものをを用い、実験条件は、number of pulses 10, pulse duration 5 ms とし field strength を変化させた。細胞内に送達された造影剤分子を定量するとともに、局在を評価、また、長期滞留性についても定量化した。

さらに、導入効率を高めるために、 μ バブルを用いたソノポレーション法、カチオン性リポソーム法について検討し、

その導入効率について比較検討した。

B-3. 疾患モデル動物への移植実験

下肢虚血モデルとして①大腿動脈結紮モデル②大腿動脈切除モデル③大腿動脈塞栓モデルを検討した。血流量の測定はレーザードップラー(株モンテシテム)を用いた。作製したモデルラットに対して、造影剤を内包したラット間葉系幹細胞を移植した。

細胞移植は、切除した血管に沿って、1箇所あたり $3.7 \times 10^5 \sim 20 \times 10^7$ 個の細胞を数箇所に注入し、レーザードップラー測定により、血流の回復を観察した。また、血管新生の確認のために、組織切片解析およびあんじおぐらふイーを導入した。

B-4. 移植細胞のMRIイメージング

標識化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の懸濁液を回収した。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の小動物用MRI、および、3 T臨床用MRIにより移植細胞を追跡した。

C. 研究結果

それぞれの項目における結果の概要を示す。詳細な結果は、各分担研究報告に記す。

C-1. PVA-DOTA-Gdの合成

ポリビニルアルコール、および、デキストランいずれの水溶性高分子を利用した造影剤についても、様々な、Gd導入率を有する造影剤が得られた。得られた生成物は、いずれも白色の粉末であり、水に易溶であった。緩和度測定の結果、緩和度R1は、市販の造影剤を上回る結果となった。

C-2. 造影剤の細胞への送達

エレクトロポレーションにより、NIH-3T3細胞、MSC、EPCいずれも同様に低毒性で標識する事が可能であった。一般的に用いられる食食作用に依存する試薬や、レセプターを介する導入法では、細胞による標識効率の差が大きい。これに対して、今回選択した物理的手法は、いずれの細胞にも利用できる汎用性の高いものであると結論づけられた。さらに、この造影剤は、細胞増殖や細胞分化にもほとんど影響を与えずに、長期間細胞内に滞留できることが、定量的に証明された。また、導入分子のほぼ全てが細胞質画分に分布しており、結果、極めて低毒性の細胞トラッキングシステムであることが明らかとなった。

C-3. 下肢虚血モデルへの移植実験

造影剤を内包したラット間葉系幹細胞を用いて、ラット下肢虚血モデルに対し細胞移植を行い、下肢の血流量の径時変化をレーザードップラーにより測定した結果。移植から3日目までは、移植部の血流量は少なく、正常な下肢における血流量の20-30%程度であった。一方、時間の経過と共に、血流の回復が見られ、25日後には60-70%まで血流が回復し

ていた。しかし、必ずしも満足できる程度ではなかった。

一方、EPC 移植群では、顕著な血流改善が見られ、約1ヶ月にわたって継続的な治癒効果が得られた。阻止し染色の結果、毛細血管密度の上昇も確認され、また、アンジオグラフィーからは、側副血管からの旺盛な新生血管が確認された。今後、移植細胞の生体内動態と血流量の増加との相関関係を検討する。

C-4. 移植細胞の MRI イメージング

MSC, EPC いずれの場合にも、移植後約2週間で細胞に起因するコントラストの消滅が確認された。また、EPCは移植部位から虚血部位へと異動するような挙動が認められ、この現象を正確に把握するために、3T臨床用MRIを導入して検討を続けている。

D. 考察

MSCおよびEPCの移植に関していくつかの新たな知見が得られた。

まず、いずれの場合にも移植細胞に基づくコントラストが2週間程度で消失することである。細胞が移植部位から周囲へと広がって撮像できなくなるというよりも、MRI像からは、10日から14日目あたりで、なにか、急激なイベントが起きて消失したようにも見られる。現在、傾向による細胞ラベルを併用することでさらに詳細な検討を続けている。

また、EPC細胞においては、移植部位から虚血部位への遊走のような現象が認められる。脳虚血モデル等への幹細胞移植では細胞の遊走現象が報告されているが、筋内移植では報告がなく、現

在3Tの臨床用MRIを導入し、さらに、蛍光プローブも併用することでその詳細を把握しようと努力を続けている。

また、幹細胞移植後に、ごく低い確率であるが、腫瘍様の細胞塊を形成する例が認められた。ES細胞等ではテラトーマの形成が危惧されており、体制幹細胞移植においても、細胞の高純度化の重要性が指摘されている。本システムでは、細胞塊を形成する様子がMRIではっきりと追跡でき、我々のシステムが細胞移植後の、イベントの追跡と早期の処置を可能にする可能性がある。

今後、心筋梗塞モデルへの展開を図るべく、ラットおよびブタにおける実験を進めている。

E. 結論

開発したシステムは細胞移植療法前臨床研究における細胞移植療法治療効果のメカニズム解明を可能にするのみでなく、最低限のリスクで、最大の治療効果を発揮させるための定量的指標を示すためのツールとなると期待される。

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) T. H. Ying, D. Ishii, A. Mahara, S. Murakami, T. Yamaoka, K. Sudesh, R. Samian, M. Fujita, M. Maeda, and T. Iwata, Scaffolds from electrospun polyhydroxyalkanoate copolymers: Fabrication, characterization, bioabsorption and tissue response,

- Biomaterials, 29, 1307-1317, 2008
- 2) A. Miskon, T. Yamaoka, S-H. Hyon, M. Kodama, and H. Uyama, Preservation of Porcine Hepatocytes in 3D Bioreactor at Room Temperature using Epigallocatechin-3-gallate, *Tissue Engineering* in press, 2008
 - 3) A. Miskon, T. Ehashi, A. Mahara, H. Uyama, and T. Yamaoka, Beating behavior of primary neonatal cardiomyocytes and cardiac-differentiated P19CL6 cells on different extramatrix components, *Journal of Artificial Organs*, in press, 2009
 - 4) D. Ishii, T. Hui Ying, A. Mahara, S. Murakami, T. Yamaoka, W. Lee, and T. Iwata, In Vivo Tissue Response and Degradation Behavior of PLLA and Stereocomplexed PLA Nanofibers, *Biomacromolecules*, 10(2), 237-242, 2009
 - 5) S. Kakinoki, S. Uchida, T. Ehashi, A. Murakami, and T. Yamaoka, Modification of PLA Scaffolds Using Bioactive Peptide-Oligo(Lactic Acid) Conjugates, *The Japanese Peptide Society*, 449-450, 2009
 - 6) 山岡哲二, 基礎医学「再生医療における工学技術」, 教育セミナーテキスト, 第24号, 5-12, 2008
 - 7) Iida H, Eberl S, Kim KM, Tamura Y, Ono Y, Nakazawa M, Sohlberg A, 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*. 35:896-905, 2008
 - 8) Kudomi N, Slimani L, Jarvisalo M, Kiss J, Lautamaki R, Naum G, 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*. 35:1899-911, 2008
 - 9) Sato H, Enmi J, Teramoto N, Hayashi T, Yamamoto A, Tsuji T, Naito H, Iida H. Comparison of Gd-DTPA-induced signal enhancements in rat brain C6 glioma among different pulse sequences in 3-Tesla magnetic resonance imaging. *Acta Radiol*. 49:172-9, 2008
 - 10) Shidahara M, Watabe H, Kim K, Kudomi N, Ito H, Iida H. Optimal scan time of oxygen-15-labeled gas inhalation autoradiographic method for measurement of cerebral oxygen extraction fraction and cerebral oxygen metabolic rate. *Ann Nucl Med*. 22:667-75, 2008
 - 11) Sohlberg A, Watabe H, Iida H. Three-dimensional SPECT reconstruction with transmission-dependent scatter correction. *Ann Nucl Med*. 22:549-56, 2008
 - 12) Sohlberg A, Watabe H, Iida H. Acceleration of Monte Carlo-based scatter compensation for cardiac SPECT. *Phys Med Biol*. 53:277-85, 2008
 - 13) Yamamoto A, Sato H, Enmi J, Ishida K, Ose T, Kimura A, Fujiwara H, Watabe H, Hayashi T, Iida H. Use of clinical MRI scanner for pre-clinical research on rats. *Radiological Physics and Technology*.

- 2008
- 14) Yokoyama I, Inoue Y, Kinoshita T, Itoh H, Kanno I, Iida H. Heart and Brain Circulation and CO₂ in Healthy Men. *Acta Physiol (Oxf)*. 193:303-8, 2008
 - 15) Zeniya T, Watabe H, Kudo H, Hirano Y, Minato K, Iida H. Clinical usability of a compact high resolution detector for high resolution and quantitative SPECT imaging in a selected small ROI. *EEE 2008 Nuclear Science Symposium Conference Record*.4257-59, 2008
 - 16) 越野 一博, 寺本 昇, 合瀬 恭幸, 福田 肇, 樋掛 正明, 渡部 浩司, 飯田 秀博. 心筋PET検査の有用性. *臨床画像*. 24:157-64, 2008
 - 17) 銭谷 勉, 渡部 浩司, 工藤 博幸, 飯田 秀博. 高解像度定量ピンホール SPECTイメージング—小動物から臨床へ—. *映像情報Medical*. 40:1210-15, 2008
 - 18) 銭谷 勉, 渡部 浩司, 飯田 秀博. SPECTイメージング. *遺伝子医学M O O K 9号「分子イメージング技術」*. 75-81, 2008
 - 19) 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*. 26:1-2, 2008
 - 20) 林 拓也, 武信 洋平, 久富 信之, 渡部 浩司, 寺本 昇, 佐藤 博司, 越野 一博, 岩西 雄大, 永沼 雅基, 森脇 博, 横田 千晶, 成富 博章, 峰松 一夫, 飯田 秀博. 神経画像法を用いた虚血性脳疾患の前臨床・臨床試験と病態把握. *循環器病研究の進歩*. 48:79-86, 2008
 - 21) Mano A, Nakatani T, Oda N, Kato T, Niwaya K, Tagusari O, Nakajima H, Funatsu T, Hashimoto S, Komamura K, Hanatani A, Ueda I.H, Kitakaze M, Kobayashi J, Yagihara T, Kitamura S: Which factors predict the recovery of natural heart function after insertion of a left ventricular assist system? *Journal of Heart and Lung Transplantation* 27:869-874, 2008
 - 22) Miyata S, Yamamoto H, Kamei M, Nakatani T, Kobayashi J, Tsuji T, Minematsu K, Tomoike H. Heparin-induced thrombocytopenia clinical studies and the efficacy of argatroban in Japan. *Semin Thromb Hemost* 34:37-47, 2008
 - 23) Morimoto Y, DDS PhD, Niwa H, DDS, PhD, Hanatani A, MD, PhD and Nakatani T, MD PhD: Hemostatic management during oral surgery in patients with a left-ventricular assist system undergoing high-level anticoagulant therapy: efficacy of low molecular weight heparin. *Surg J Oral Maxillofac* 66:568-571, 2008
 - 24) 小林奈歩, 津田悦子, 小野安生, 塚野真也, 矢崎 論, 山田 修, 越後茂之, 中谷武嗣, 八木原俊克: 心臓移植適応について検討した患者の予後—院内臓器移植医学的適応症例検討会に小児科から提示した症例—. *日本小児循環器学会雑誌* 24:628-635, 2008
 - 25) 中谷武嗣: 補助人工心臓の現状と今後の展望. *呼吸と循環* 56:377-382, 2008
 - 26) 中谷武嗣, 築瀬正伸: 循環動態維持

を目的とした薬物療法と補助循環法。
ICUとCCU 31:1061-1067, 2008

- 27) 中谷武嗣：対外設置型補助人工心臓-東洋紡補助人工心臓-。Clinical Engineering 19:618-622, 2008
- 28) 中谷武嗣：心不全の機械的補助最前線。Current Therapy 26:955-958, 2008
- 29) 中谷武嗣：心臓移植における保存法。移植 43:336-341, 2008
- 30) 橘 洋一、山岡哲二、展望 心臓疾患における幹細胞移植治療の現状とその追跡法, ISOTPOE NEWS, No.649, 2-7, 2008
- 31) 山岡哲二、橘 洋一、最近の進歩「細胞移植と分子イメージング」、人工臓器, 37巻3号, 2008
- 32) 中谷武嗣：心臓移植医療。ビジュアル版「3大疾病の教科書 がん・心臓病・脳卒中をストップ！」[国立がんセンター・国立循環器病センター編] (三省堂、東京) :118-119, 2008
- 33) 中谷武嗣：人工心臓。ビジュアル版「3大疾病の教科書 がん・心臓病・脳卒中をストップ！」[国立がんセンター・国立循環器病センター編] (三省堂、東京) :120-121, 2008
- 34) 馬原 淳、山岡哲二、「幹細胞分離法とポピュレーション解析」, In 次世代医療のための高分子材料工学, シーエムシー出版, 168-177, 2008

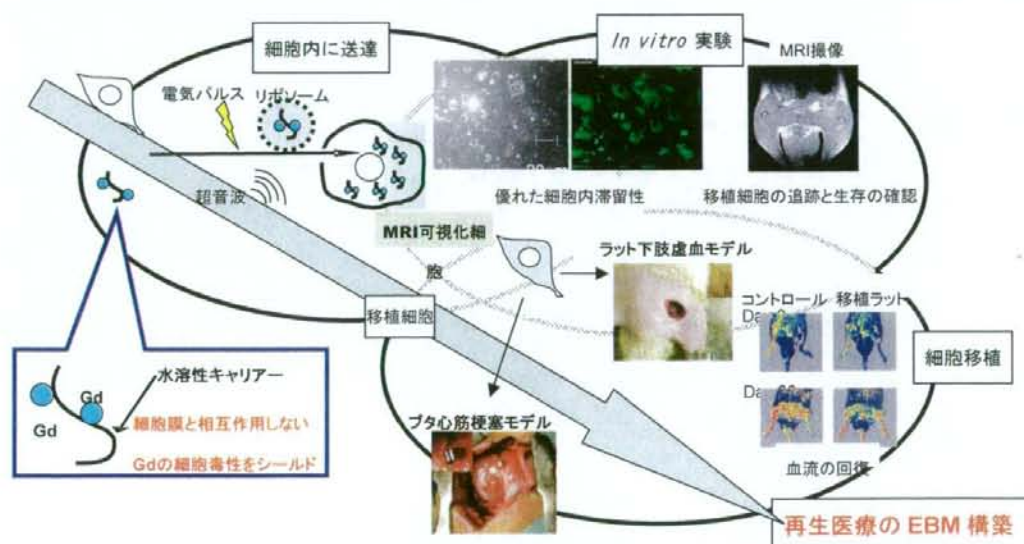
G-2. 学会発表

- 1) 藤里俊哉、寺田堂彦、湊谷謙司、山崎健一、林 宏行、近藤英雄、江橋具、小林尚俊、岸田晶夫、山岡哲二、中谷武嗣、北村惣一郎：生体由来素材スキャフォールドを用いた臓組織再生。第36回人工心臓と補助循環懇話会、越後湯沢、2008.3.7-8
- 2) 橘 洋一、野寄 久枝、橋本 朋子、村上 章、山岡 哲二：感温性ポリエチレンイミン誘導体を用いた遺伝子導入, 第8回 遺伝子・デリバリー研究会シンポジウム, 大阪, 2008.5.9
- 3) 橘 洋一、寺本 昇、Carlos Alberto Agudelo Garcia、圓見純一郎、飯田秀博、山岡哲二：MRI細胞トラッキング技術を用いた下肢虚血細胞移植におけるEBMの確立, 第3回日本分子イメージング学会, 2008.5.22-23
- 4) 東 晃至、橘 洋一、飯田 秀博、平野 義明、山岡哲二：ソノポレーション法を用いた高分子造影剤の細胞内導入, 第57回高分子学会年次大会, 2008.5.28-30
- 5) Tetsuji Yamaoka, Yoichi Tachibana, Junichiro Ennmi, Hidehiro Iida, In Vivo Tracking of the Transplanted Cells Using a Novel Polyric Contrast Agent, 8th World Biomaterials Congress, 2008.5.28-6.1
- 6) 山岡哲二、橘 洋一、ガルシア カルロス、圓見純一郎、馬原 淳、飯田秀博：新規な生細胞追跡MRIプローブによる移植幹細胞のin vivo イメージング, 第24回日本DDS学会, 2008.6.29-30
- 7) 橘 洋一、圓見純一郎、飯田秀博、山岡哲二：移植細胞の長期追跡を目的とした高分子MR用造影剤の開発, 第24回日本DDS学会, 2008.6.29-30
- 8) 橘 洋一、圓見純一郎、飯田秀博、山岡哲二：ポリエチレングリコールを担体とした細胞追跡用MRI造影剤の開発, 第36回日本磁気共鳴医学会大会, 2008.9.11-13

- 9) 中谷武嗣、加藤倫子、築瀬正伸、山本 賢、瀬口 周、船津俊宏、小林順二郎、植田初江、佐田正晴：心移植：既存抗体、産生抗体のモニタリングと移植後の管理。シンポジウム、第44回日本移植学会総会、大阪、2008.9.19-21
- 10) 橋 洋一、圓見純一郎、飯田秀博、山岡哲二：下肢虚血ラットへのMSC移植におけるMRI細胞トラッキング、第57回高分子討論会、2008.9.24-26
- 11) 東 晃至、橋 洋一、平野 義明、山岡 哲二：分子量の異なる高分子化MRI造影剤を用いた細胞標識とin vivoイメージング、高分子討論会、2008.9.24-26
- 12) T. Yamaoka, Novel biomaterials for cell transplantation, Tissue Engineering and Regenerative Medicine International Society Asia-Pacific Chapter Meeting 2008, (TERMIS-AP 2008) (2008.11.6-8, Taipei)
- 13) 中谷武嗣、古川克子：「再生医学・生体組織工学1」。座長、第46回日本人工臓器学会大会、東京、2008.11.27-29
- 14) 中谷武嗣、船津俊宏、加藤倫子、築瀬正伸、村田欣洋、伊庭 裕、堀 由美子、西岡 宏、林 輝行、北風政史、小林順二郎：わが国における補助人工心臓の将来。シンポジウム、第46回日本人工臓器学会大会、東京、2008.11.27-29
- 15) 山岡哲二：細胞移植医療における細胞のin vivoイメージングへ向けた新規細胞ラベル化用MRI造影剤の開発、第三回 ナノバイオテクノロジー連携 携群 成果報告会、2009.1.28

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし



MRI 用造影剤の分子量による効果とラベル化法の検討

(分担) 研究者 山岡 哲二
国立循環器病センター研究所 生体工学部

研究要旨 細胞ラベル化用造影剤の最適化を目指し、MRI 用造影剤の分子量による効果とラベル化法の検討を行った。4 種類の異なる分子量のポリビニルアルコールを出発物質とし、造影剤の合成を行った。得られた造影剤の物性評価を行い、in vivo で MRI による評価を行った。更に、より効率の良いラベル化法を目標として、細胞内への送達手法の検討を行った。

A. 研究目的

臓器移植は患者に恩恵をもたらす医療として非常に重要となってきた。しかし移植が必要な患者数に対する臓器提供者が圧倒的に少ないことや、移植後の免疫反応といった副作用などさまざまな問題がある。そこで臓器移植に代わる医療として失ってしまった組織の再生を促す再生医療の技術が発展し、細胞移植療法が注目されるようになった。細胞移植療法では自家細胞を移植するので免疫や拒絶反応などのような生体反応をクリアすることができ、自己細胞移植では認可等の問題も少なくなる。

現在では、移植した細胞がどのようにして組織を形成していくのか、どの細胞によって再生が誘導されているのか、といった細胞による組織修復の過程や必要不可欠な因子は明らかになっていない。そこで移植細胞の追跡が懸命に研究されている。移植細胞の行方を明らかにすることで移植細胞の挙動、必要な細胞群といったような重要なポイントが明らかとなるかもしれないからである。そのため

には、マクロな観点からだけでなく、細胞レベルで起こっている現象を明らかにする必要があり、細胞トラッキングシステムの開発が必須である。

細胞の標識化法は大きく分けて2種類あり、細胞内へ輸送したいものに化学修飾をほどこす化学的な方法か、外因的な力を用いて細胞質、または核内に導入する物理的な方法に大別されている。前者にはリポソーム法、リン酸カルシウム法、DEAE デキストラン法、ウイルスベクター法などがあり、後者には電圧や光、音波などの物理的な力で一時的に細胞に微細な孔を開けて DNA の浸透をはかるエレクトロポレーション(電気穿孔)法、マイクロインジェクション法、遺伝子銃(ガス圧)法、超音波法などがあり、最近ではレーザーを用いるものも出てきている。それぞれ一長一短があり対象とする組織、使用目的、導入する遺伝子の大きさなどによって使い分けられている。ベクターによる遺伝子導入が臨床化は停滞しているが、機器による遺伝子導入は実用化に向けて着実に前進している。どの導入法

も一長一短を持っているが、細胞に対して毒性が低く、かつ効率のよい標識方法が重要となってくる。

本研究では、分子量の異なるポリビニルアルコールを用い造影剤の合成を行った。得られた造影剤の物性評価(緩和度・細胞内滞在性)を検討した。更に、*in vivo*での評価を行った。ラベル化法についても検討した。

B. 研究方法

B-1. 分子量の異なる造影剤の合成と物性評価

出発物質として、4つの異なる分子量のポリビニルアルコールを用いた。それぞれ、 $DP=522$ 、 1700 、 3300 、 6700 、 $DS=98$ 、 8 、 98 、 98 、 5 、 99% である。合成方法は前年度に確立させた方法を用いた。得られた4つのサンプルの導入率はNMRにより算出した。Gdの含有量はICP-AESにより求めた。具体的には、合成した4種類のFITC-PVA-Gdを所定量、秤量し、HClおよび HNO_3 を加え、5mLの王水を作成し、 $100\text{ }^\circ\text{C}$ 、1時間加熱した。加熱後、溶液の酸濃度が 1 mol/L になるように調整してICP測定に用いた。既知濃度のGd溶液を使用した検量線法によりGdの定量を行った。

作製した4種類の造影剤を量り取り、Mill-Q水 $650\text{ }\mu\text{L}$ に溶かした。作製した水溶液を内径 5 mm NMRチューブに加え、ベンゼン- d_6 $50\text{ }\mu\text{L}$ 加えた内径 1 mm のNMRチューブをその中に装着させ、二重構造のNMRチューブを作成した。 300 MHz NMRを用いて縦緩和時間 T_1 を測定した。NMRより得られた縦緩和時間 T_1 およびICPより得られたGdの導入量より緩和度 R_1 を算出した。

B-2. *In vivo*における造影剤の挙動

①溶液のインジェクション

合成した4種類のFITC-PVA-Gd(Gdとして 50 nmol)を量り取り、 $100\text{ }\mu\text{L}$ のイオン交換水に溶かし、 $0.2\text{ }\mu\text{m}$ のフィルターでろ過を行った。 29 G の針とシリンジを使い、F344ラット(♂, 8weeks)の大腿部筋肉に対してインジェクトした。コントロールとして生理食塩水を大腿部筋肉に対して $100\text{ }\mu\text{L}$ インジェクトした。インジェクト後、 T_1 強調($TR=500\text{ ms}$ 、 $TE=9\text{ ms}$)で撮像を行い、径時変化で造影剤の行方を追跡した。

②造影剤内包ゲルの皮下埋入

$4\text{ wt\% Agarose gel}$ と 40 mM の各分子量の造影剤を用いて、造影剤ユニットで 20 mM 含有の 2 wt\% ゲルを作製した。作製したゲルをF344ラット(♂, 12weeks)の背部皮下に埋入した。コントロールとしてAgarose gelのみを固めたものを同様に背部皮下に埋入し、 T_1 強調($TR=500\text{ ms}$ 、 $TE=9\text{ ms}$)で経時的にMRI撮像を行った。

B-3. 高ラベル化手法の検討

①ソノポレーション法

15 mL 遠沈管に 1.0×10^6 個の細胞ペレットを作成し、DMEM培地(無血清)を $200\text{ }\mu\text{L}$ 、造影剤を $100\text{ }\mu\text{L}$ 、マイクロバブル $200\text{ }\mu\text{L}$ を加え、全量 $500\text{ }\mu\text{L}$ になるよう調製した。作製した溶液を内径 5 mm のNMRチューブに加え、恒温相中で超音波を照射した。基本条件をマイクロバブル 1.0×10^8 個、出力 1.5 W/cm^2 、Duty比 20% 、時間 30 秒 、造影剤濃度 40 mM とし、マイクロバブルの量および種類、出力、Duty比、時間、造影剤濃度を変化させて、最適条件の検討を行った。

超音波照射後、 15 mL 遠沈管に回収し1

時間、37°C、5% CO₂ 下でインキュベーターとした。1 時間後、1000 r.p.m、3 分間遠心し、上清を捨て、PBS を 1 mL 添加し洗浄した。この操作を 2 回行った後、Trypan blue 溶液を用いてソノポレーションにより死亡した細胞をカウントし、細胞の生存率を算出した。カウントした細胞は 6 cm dish にすべて播種し、37°C インキュベーターにて 1 日インキュベートした。

1 日後、再度 PBS で 3 回洗浄し、蛍光顕微鏡観察を行った。その後、トリプシンを用いて細胞をはがし、細胞数をカウントした。カウントしたすべての細胞に対して、細胞溶解液を 1 mL 添加し 1 時間 37°C インキュベートした。1 時間後、溶液を 96 well plate に 100 μ L 加え、蛍光強度を測定した。得られた蛍光強度より細胞内に導入された造影剤の質量を算出した。

②膜融合化リポソーム法

2-1. Lipofectamine2000

Opti-MEM(無血清) を 250 μ L と 10mg/mL 造影剤/Opti-MEM 溶液を 10 μ L 混ぜ、5 分間、室温でインキュベートし、1 液を作った。Opti-MEM(無血清) を 250 μ L と Lipofectamine2000 を 10 μ L と混ぜ 5 分間、室温でインキュベートし、2 液を作った。1 液と 2 液を混合し、20 分間、室温でインキュベート、3 液を作製した。3 液を 1.0×10^6 個の細胞懸濁液に対して添加した。

2-2. GenomONE

HVJ を 37 °C 恒温槽で溶かし、40 μ L 採取し、10000 r.p.m、5 分間、4 °C で遠心した。上清を捨て、10 mg/mL 造影剤/Opti-MEM 溶液を 10 μ L 添加し、付属の

B 液を 1 μ L 添加し、10000 r.p.m、5 分間、4 °C で遠心した。遠心後、上清を捨て、付属の緩衝液を 30 μ L 添加し、付属の C 液を 5 μ L 添加した。作製した HVJ 溶液全量と 1.0×10^6 個/0.465 μ L の細胞懸濁液に対して添加した。その後 3000 r.p.m、20 分間、20 °C で遠心した。

2-3. 導入後の共通操作

細胞は 6 well plate にすべて播種し、4 時間後にメディアムチェンジを行い、37°C インキュベーターにて 1 日インキュベートした。1 日後、再度 PBS で 3 回洗浄し、蛍光顕微鏡観察を行った。その後、トリプシンを用いて細胞をはがし、細胞数をカウントした。カウントしたすべての細胞に対して、細胞溶解液を 1 mL 添加し 1 時間、37°C インキュベートした。1 時間後、溶液を 96 well plate に 100 μ L 加え、蛍光強度を測定した。得られた蛍光強度より細胞内に導入された造影剤の質量を算出した。

(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. 分子量の異なる造影剤の合成と物性評価

重合度の低いものから FITC-PVA522-Gd、FITC-PVA-1700-Gd、FITC-PVA3300-Gd、FITC-PVA-6740-Gd とした(表 1)。凍結乾燥法によって回収した物質は綿状で、水に溶けやすい物質だった。凍結する時に液体窒素で十分に

凍結を行わないと、回収する際にゲル化している部分があり水に対して不溶になるときがあった。ICP 測定の結果から合成した FITC-PVA-Gd はおよそ 4 wt% の Gd を含んでおり、側鎖ジアミンの導入率よりも低くなっていた。Gd を含む DOTA はおよそ 30 % であることが分かり、Gd と結合していない DOTA との比はおよそ 1:2 になっていた。

NMR を用いて緩和時間の測定を行った (図 1)。縦軸に縦緩和時間の逆数、横軸に NMR チューブに含まれる Gd の濃度を示した。すべてのサンプルで緩和時間に差はなく、直線関係が得られた。図 1 のそれぞれのサンプルの直線の傾きを算出した結果、表 1 に示すように、造影剤の緩和度 (R_1) はおよそ 10 であった。現在、臨床で使われているプロハンスの緩和度はおよそ 4 であった。このことから、合成した造影剤は臨床で使われている造影剤よりも高い緩和能を有していることが分かった。

エレクトロポレーションは細胞膜にゆらぎを作り、細胞膜に穴を開け、細胞外物質を導入する手法である。エレクトロポレーション後の細胞の様子を図 2 に示した。細胞の核部分は黒く抜け、黒く抜けた周囲にリング状に蛍光が確認できた。つまり細胞膜を透過し細胞質内に達しているが、核内に造影剤は達していないことが分かった。この様子は継代を重ねても確認することができ、細胞質内に安定して導入することができた。

造影剤の細胞内滞在性について調べた結果を図 3 に示した。左側の縦軸に細胞内に取り込まれた造影剤の蛍光強度 (●)、右側の縦軸に細胞数 (○)、横軸に経過日数を示す。細胞は造影剤の影響なく増殖を

続けていた。1 日目と 8 日目以降の蛍光強度を比較すると、ほとんど差はなかった。つまり、造影剤は細胞内に長期間滞留したことが示された。この滞留性は造影剤の分子量によって変化せず、蛍光強度は 10 日前後減少していなかった。図 2 及び図 3 の結果から、合成した造影剤は分子量に寄らず安定して細胞質内に滞在していることが分かった。

C-2. *In vivo* における造影剤の挙動

① 溶液のインジェクション

筋肉中に造影剤をインジェクトした結果を図 4 に示した。筋肉中にインジェクトしようとする時、圧力がかかる感触がした。造影剤をインジェクトした箇所は白くエンハンスされ、コントロールの生理食塩水をインジェクトした箇所はエンハンスされていなかった。低分子量の FITC-PVA-522-Gd は一日後にはその大部分が消失しており、分子量が大きくなるほど、筋肉中に滞留していた。低分子量、高分子量のサンプルともに、インジェクトした箇所からすべてが消失することはなかった。これらの結果から、造影剤の体内動態は分子量に依存することが示唆された。

② 造影剤内包ゲルの皮下埋入

溶液状態の FITC-PVA-Gd をアガロースゲルに封入し、ラット皮下に移植し、MRI 撮像を行った結果を図 5 に示した。画像の上部が背部、下部は腹部である。コントロールのゲルは白く強調されていないのに対して、造影剤アガロースゲルは白く強調されていた。ゲルに封入することで、溶液状態の造影剤を長期間追跡することができた。造影剤のコントラストは経過時間で分子量によらず薄まって

いるように見える。ゲルから漏出した造影剤が滞留する、或いは、周辺の細胞に取り込まれている様子は MRI 画像で見られなかった。つまり、導入した造影剤が万が一、細胞外に漏出しても周辺細胞とは相互作用せず取り込まれず、細胞が死滅した際には速やかに局所から消失することが分かった。これらの結果は我々の合成した造影剤は生細胞のみを追跡できることが示唆している。

C-3. 高ラベル化手法の検討

①ソノポレーション法（高濃度系）

これまでの研究を基に、より高濃度でラベル化する必要があるため、図 6 に示すような方法を考えた。

左側の縦軸に細胞内に取り込まれた造影剤の質量、右側の縦軸に細胞の生存率、横軸に各条件をとった（図 7）。(a)、(c)、(d)の結果より、Duty cycle、出力、距離の条件を変化させても導入量は変わらず、細胞の生存率は 70 %程度と毒性の低い導入だった。細胞の生存率が高く、かつ細胞内送達量が最も多い条件を選択し、最適条件は Duty cycle 20 %、出力 1.5 W/cm²、照射距離 8 cm を選択した。

(b)の結果より、周囲の濃度を上昇させることで、導入量は比例的に増加した。細胞周辺に存在する造影剤の濃度が向上することで、導入が促されたと推測される。

導入後の細胞の様子を図 8 に示した。図 3b より細胞周辺の造影剤濃度を増加させることで、導入量は比例的に増加した。その様子は蛍光顕微鏡写真からも確認することができた。エレクトロポレーションのように核の部分は黒く抜け、リング状に蛍光が見えた。濃度を変化させることで、造影剤は細胞質内に大量に送

達することができた。

次に、マイクロバブルの量、および種類の検討を行った結果を図 9 に示す。左側の縦軸に細胞内に取り込まれた造影剤の質量、右側の縦軸に細胞の生存率、横軸に各条件をとった。マイクロバブルの種類を変化させても、細胞の生存率はあまり変わらなかった。しかし、細胞内に送達された造影剤の量は artison の方が優れていた。導入量や毒性は細胞種とマイクロバブルの種類によって顕著に差が現れることが報告されている。このことから、使用するマイクロバブルは artison を 5×10^7 個が最適条件と判断した。

②膜融合化リポソーム法

膜融合化リポソーム法とはリン脂質二重膜の小胞内部に送達したい物質を封入し、細胞膜を透過させる手法である。

Lipofectamine 2000、GenomONE を用いた際の細胞毒性を図 10a に示した。縦軸に細胞の生存率を、横軸に 2 種類の導入試薬を示した。Lipofectamine、GenomONE 両者共に生存率は 90%程度と高く、細胞毒性は見られなかった。次に細胞の蛍光顕微鏡観察を行った結果を図 10b に示した。浮遊状態の細胞に対して、各リポソームを用いて導入し、1 日後の蛍光顕微鏡写真を示した。エレクトロポレーションのように造影剤は細胞質内に滞在しておらず、蛍光写真より造影剤はほとんど導入されていないことが分かった。

③ラベル化法の比較検討

昨年度の研究を含めたラベル化法（エレクトロポレーション、ソノポレーション、膜融合化リポソーム）の結果を表 2 にまとめた。接着系、浮遊系、いずれの

場合にも細胞の生存率はどの導入法においても高かった。仕込み量と導入量を比較すると、ほぼ同量の造影剤を使用し、ソノポレーションは細胞1個あたりに導入できる効率がよいことが分かった。それぞれの標識化法による導入量を比較するために、図 11 に示した。縦軸に細胞一個あたりに導入された造影剤の質量、横軸に導入方法を示した。リポフェクション法ではほとんど導入ができなかったのに対して、エレクトロポレーション法ではおよそ 20 fg/cell 導入できた。高濃度ソノポレーション法はエレクトロポレーション法の 5 倍以上の標識効率を得ることができた。

以上の結果より、エレクトロポレーションでは浮遊細胞への導入は難しかったが、ソノポレーションでは可能だった。造影剤の細胞内送達には高濃度ソノポレーションの系が最も優れていた。

D. 考察

図 2 および図 8 より、エレクトロポレーション法や高濃度ソノポレーション法によって細胞質内に造影剤が滞在していることが示された。いずれの結果においても核膜は透過せず細胞膜のみを透過していた。細胞内に導入時には、細胞内と細胞外の造影剤の濃度が平衡状態に達していると推測される。細胞が直径 10 μm の球体と考えると、細胞一個の体積は以下のように算出される。

$$\frac{4}{3} \times \pi \times (5 \times 10^{-6} \text{ m})^3 \div 5 \times 10^{-16} \text{ m}^3 = \underline{5 \times 10^{-13} \text{ L}}$$

ソノポレーション（高濃度系）の場合、造影剤をユニットで 100 mM (10 g/L) の仕込み量で設定したとき、細胞内に入った量は表 2 より、およそ 150 fg となる。

すなわち細胞内濃度は

$$\frac{150 \times 10^{-15} \text{ g}}{5 \times 10^{-13} \text{ L}} = \underline{0.3 \text{ g/L}}$$

仕込みの 10 g/L と比較すると約 1/30 の濃度だと概算される。導入効率を向上させるためにさまざまな検討を行ったが、ソノポレーションによる導入法ではキャピテーションが必要条件となってくる。今回、投入したマイクロバブルはすべてが破裂していることはなかった。つまり、本来の導入効率よりも劣った導入になっていると考えられる。導入条件を向上するにはキャピテーションが必ず起こるような条件を考えれば、より大量の導入が可能ではないかと推測される。

細胞1個あたりの質量を 1 ng と仮定し、造影剤が 100 fg 細胞内に導入されたとすると、細胞の質量に対しておよそ 1/10000 の造影剤が導入されたことになる。ヒトの体重が 60 kg であるので、6 g の造影剤が人体に投与されたことと近い。異物として免疫反応が起こると考えられる量であるが、細胞は造影剤の影響なく増殖を続けている。このことから、造影剤は非常に毒性が低いことが示唆される。¹²⁵I ラベル化を行った PVA を皮下に投与すると分子量 14000 では 2 時間程度でその全量が消失し、分子量 196000 の場合では皮下に投与するとおよそ 6 時間で 40 % が滞留することが報告されている。つまり、分子量 196000 の場合、1 日後には 12 % が滞留していると概算できる。我々は分子量 230000 の PVA を使い同様の実験を行った。分子量が大きくなれば皮下における滞留性も向上すると考えられるが、図 4 のように 1 日後には造影剤は見られなくなった。1 日後の輝度が 0 日の 12 % とであれば MRI から検出できる

と考えられるが、脂肪とのオーバーラップも考慮に入れなければならない。

同様の実験を筋肉中において行うと、分子量 14000 の PVA では 6 時間程度でその全量が消失し、分子量 196000 の場合では 80 % が滞留する。図 4 から造影剤の残存性は分子量に依存しているように見える。実験操作で滅菌濾過をかけた後、ラット大腿部へ造影剤を投与しているので、不溶の造影剤やフィルターを通らなかつた造影剤が残っている可能性は考えにくい。おそらく、合成した造影剤の分子量が影響しているのではないかと考えられる。例えば、FITC-PVA-522-Gd について考えると、表 1 より側鎖導入率は 8 % である。522 の PVA ユニットのうち 40 ユニットが造影剤による修飾、ジアミンユニットということになる。仮に DOTA および Gd の導入率が 100 % とすると、分子量は $44 \times 480 + 650 \times 40 = 47120 \approx 48000$ となる。これはあくまで概算であり、GPC による分子量測定が望まれる。しかし、合成した造影剤の分子量が元の PVA の分子量の倍になっていたとすると、長期間における筋肉中での滞在が見られてもおかしくはない。

表 2 よりソノポレーション法による細胞一個あたりに導入された造影剤の質量はおおよそ 150 fg。図 1 より Gd の導入率は 5 % であることから、細胞一個あたりの Gd の質量は 7.5 fg であることが分かる。また、図 5 より溶液中の Gd は 7 μ g であった。つまり、標識化細胞を 10^9 個集めると、コントラストがはっきりと見えると考えられる。 10^9 個の細胞となると、10cm dish に概算して、200 枚という途方もない数になってしまう。このことから

もより造影剤を効率よく導入する手法の開発が懸念される。

E. 結論

細胞標識化法の検討のために高濃度系ソノポレーション、および膜融合化リポソーム法の検討を行った。膜融合化リポソーム法による細胞の標識はできなかつた。しかし高濃度系ソノポレーションを用いることで、前年度に検討したエレクトロポレーション法と比較して 5 倍以上の標識効率を得ることができた。FITC-PVA-Gd にインジェクトした際に、分子量が低いものほど造影剤の滞留性は低く、速やかな排出が見られた。これらの結果より、細胞ラベルのための造影剤の最適化が可能であると考えられる。

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

[論文]

T. H. Ying, D. Ishii, A. Mahara, S. Murakami, T. Yamaoka, K. Sudesh, R. Samian, M. Fujita, M. Maeda, and T. Iwata, Scaffolds from electrospun polyhydroxyalkanoate copolymers: Fabrication, characterization, bioabsorption and tissue response, *Biomaterials*, 29, 1307-1317, 2008

A. Miskon, T. Yamaoka, S-H. Hyon, M. Kodama, and H. Uyama, Preservation of Porcine Hepatocytes in 3D Bioreactor at Room Temperature using Epigallocatechin-3-gallate, *Tissue Engineering in press*, 2008

A. Miskon, T. Ehashi, A. Mahara, H. Uyama, and T. Yamaoka, *Beating*

behavior of primary neonatal cardiomyocytes and cardiac-differentiated P19CL6 cells on different extramatrix components, *Journal of Artificial Organs*, in press, 2009

D. Ishii, T. Hui Ying, A. Mahara, S. Murakami, T. Yamaoka, W. Lee, and T. Iwata, *In Vivo Tissue Response and Degradation Behavior of PLLA and Stereocomplexed PLA Nanofibers*, *Biomacromolecules*, 10(2), 237-242, 2009

S. Kakinoki, S. Uchida, T. Ehashi, A. Murakami, and T. Yamaoka, *Modification of PLA Scaffolds Using Bioactive Peptide-Oligo(Lactic Acid) Conjugates*, *The Japanese Peptide Society*, 449-450, 2009

[総説]

山岡哲二, 基礎医学「再生医療における工学技術」, 教育セミナーテキスト, 第24号, 5-12, 2008

馬原 淳、山岡哲二, 「幹細胞分離法とポピュレーション解析」, In 次世代医療のための高分子材料工学, シーエムシー出版, 168-177, 2008

[国際会議]

T. Yamaoka, *Novel biomaterials for cell transplantation*, *Tissue Engineering and Regenerative Medicine International Society Asia-Pacific Chapter Meeting 2008*, (TERMIS-AP 2008) (2008.11.6-8, Taipei)

G-2. 学会発表

東 晃至、橋 洋一、飯田 秀博、平野 義明、山岡哲二: ソノポレーション法を用いた高分子造影剤の細胞内導入, 第57回高分子学会年次大会, 2008.5.28-30

Tetsuji Yamaoka, Yoichi Tachibana, Junichiro Ennmi, Hidehiro Iida, *In Vivo Tracking of the Transplanted Cells Using a*

Novel Polyric Contrast Agent, 8th World Biomaterials Congress, 2008.5.28-6.1

山岡哲二、橋 洋一、ガルシア カルロス、圓見純一郎、馬原 淳、飯田秀博: 新規な生細胞追跡 MRI プローブによる移植幹細胞の *in vivo* イメージング, 第24回日本 DDS 学会, 2008.6.29-30

山岡哲二: *Novel biomaterials for cell transplantation*, TERMIS-AP 2008, 2008.11.6-8

山岡哲二: 細胞移植医療における細胞の *in vivo* イメージングへ向けた新規細胞ラベル化用 MRI 造影剤の開発, 第三回 ナノバイオテクノロジー連携群 成果報告会, 2009.1.28

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

表 1. 分子量の異なる PVA-Gd の合成

Sample	DP	DS (%)	Ratio of amino group (mol %)	Gd (wt%)	Gd/DOTA (mol %)	R ₁
FITC-PVA522-Gd	522	98.8	7	4.0	28	9.4
FITC-PVA1700-Gd	1700	98.0	8	5.0	35	11
FITC-PVA-3300-Gd	3300	98.5	5	3.6	32	10
FITC-PVA-6740-Gd	6700	99.0	5	4.0	36	9.3

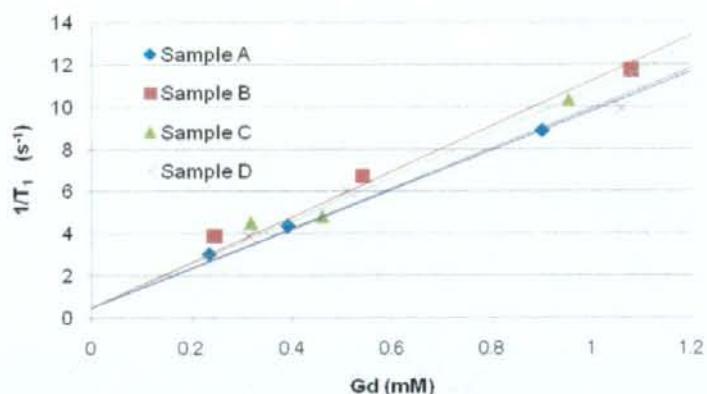


図 1. NMR による T1 測定

造影剤の緩和度 (R₁) はおよそ 10 であった。高い緩和能を有していることが分かった。

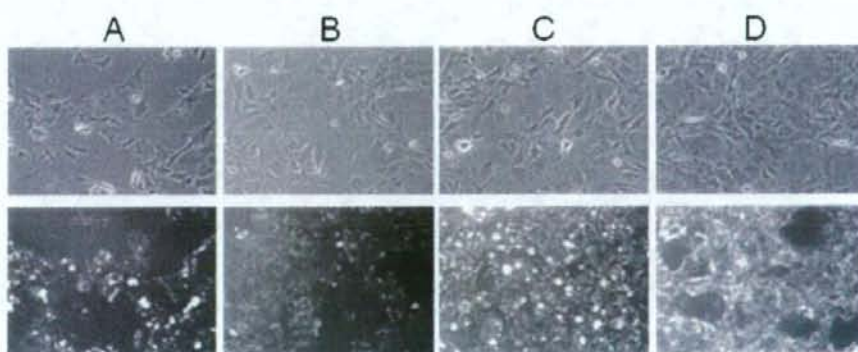


図 2. サンプル A-D を用いたエレクトロポレーション後の細胞の様子
細胞質内に安定して導入することができた。