

図 3. サンプル A-D の細胞内滞在性

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。

FITC-PVA 522-Gd    FITC-PVA 1700-Gd    FITC-PVA 3300-Gd    saline

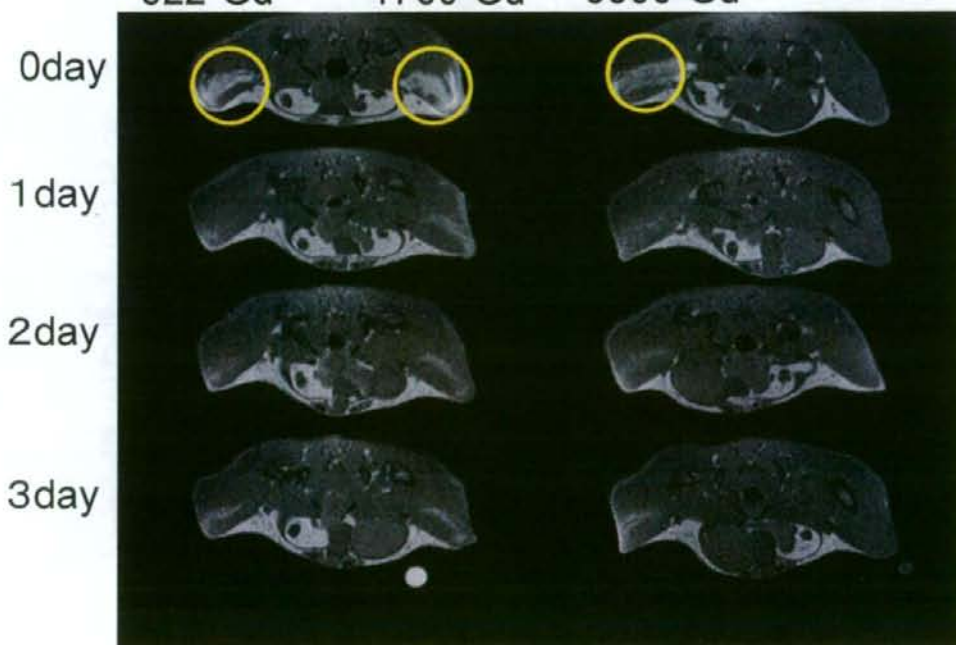


図 4. 筋肉中に造影剤水溶液をインジェクトした結果  
分子量が大きくなるほど、筋肉中に滞留していた。

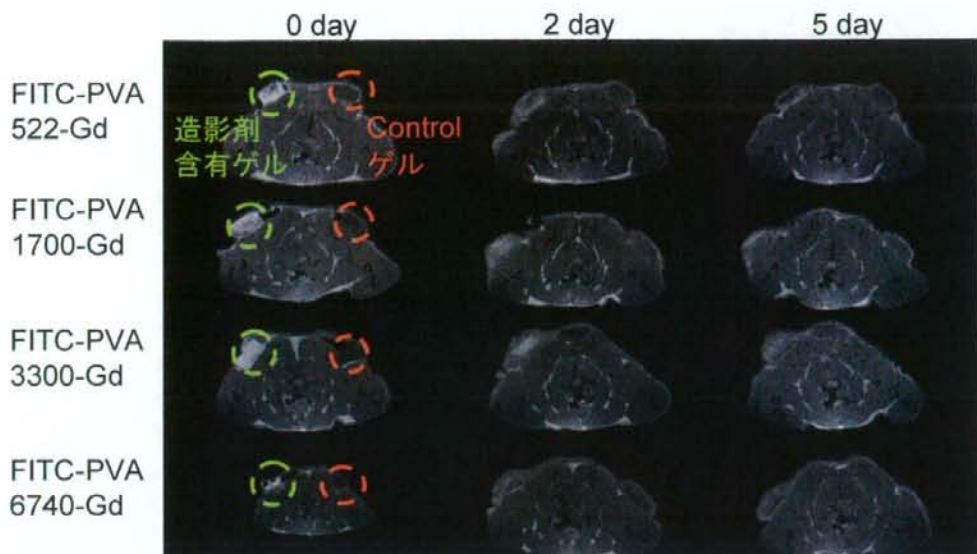


図 5. 溶液状態の FITC-PVA-Gd をアガロースゲルに封入し、ラット皮下に移植し、MRI 撮像を行った結果

時間の経過に従い、ゲルのコントラストは小さくなっていった。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。

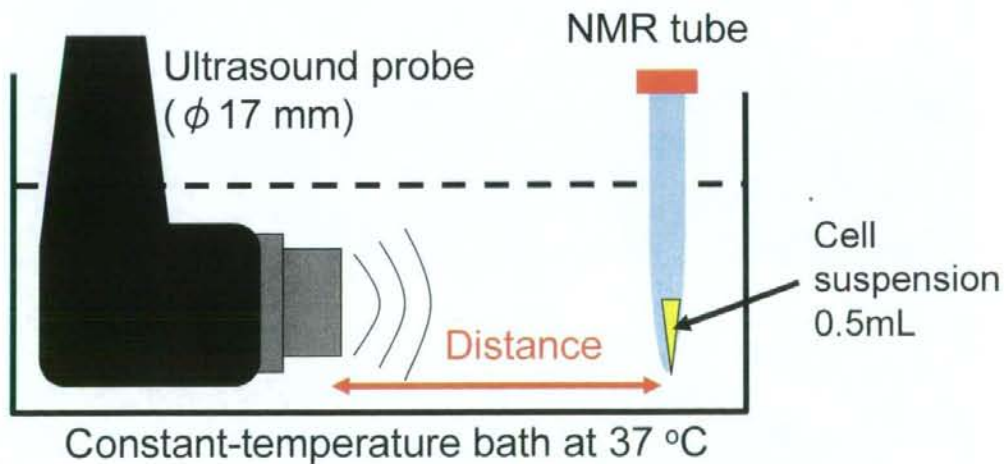


図 6. 高濃度系でのソノポレーションの方法

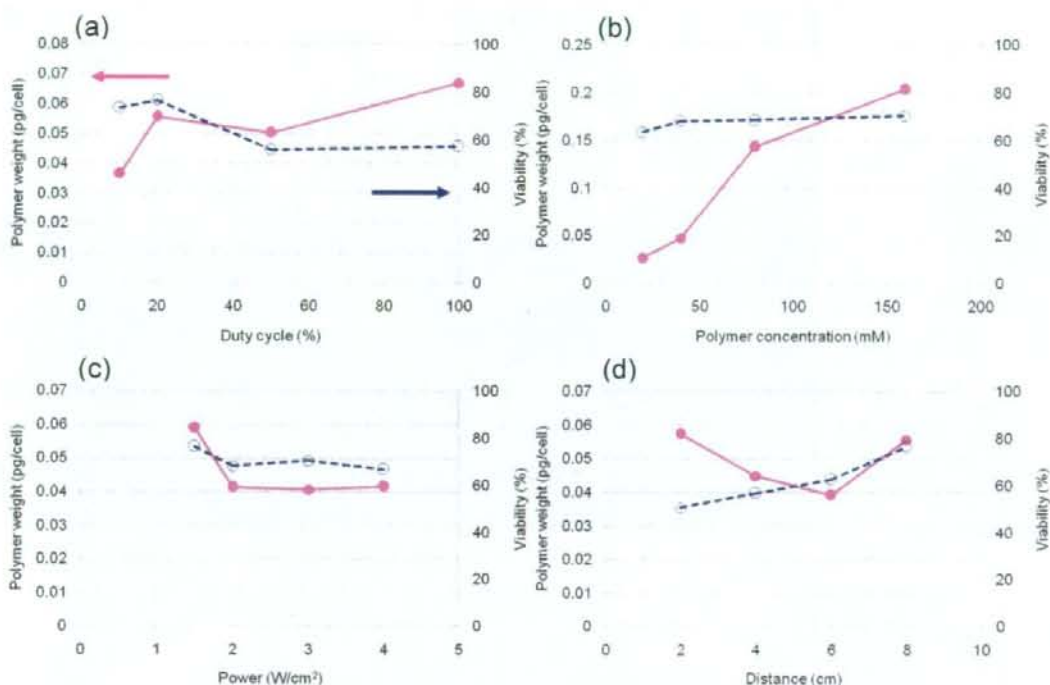


図 7. 高濃度系ソノポレーションによる条件検討

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。

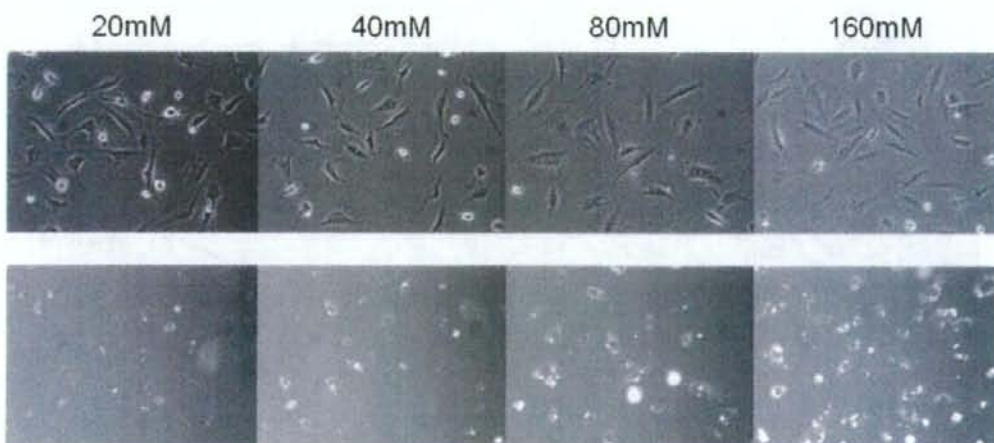


図 8. 高濃度ソノポレーション後の細胞の様子

エレクトロポレーションと同様に核の部分は黒く抜け、リング状に蛍光が見えた。

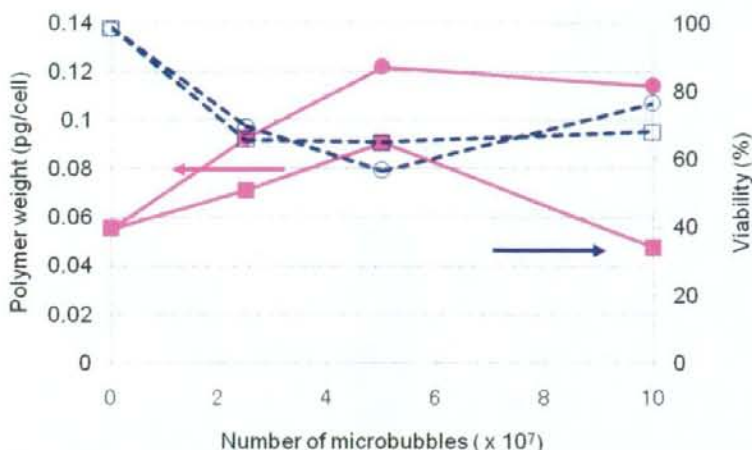
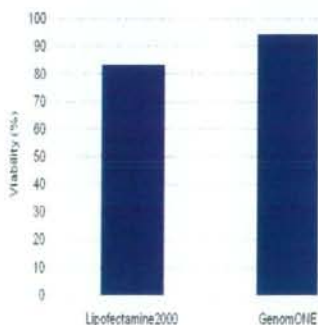


図 9. ソノポレーションにおけるマイクロバブルの量、および種類の検討  
細胞内に送達された造影剤の量は artisan の方が優れていた。

表 2. 分子量の異なる PVA-Gd の合成

	細胞の状態	細胞数	細胞生存率 (%)	造影剤の仕込み ( $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ )	導入量 (fg/cell)
Electroporation	接着	5.0E+05	70	3mg/3mL=1	23
Sonoporation	浮遊	1.0E+06	75	3.6mg/400 $\mu\text{L}$ =9	141
Lipofectamine2000 <sup>?</sup>	浮遊	1.0E+06	83	100 $\mu\text{g}/0.5\text{mL}$ =0.2	1.8
GenomONE <sup>?</sup>	浮遊	1.0E+06	94	100 $\mu\text{g}/0.5\text{mL}$ =0.2	Not detected

(a)



(b)

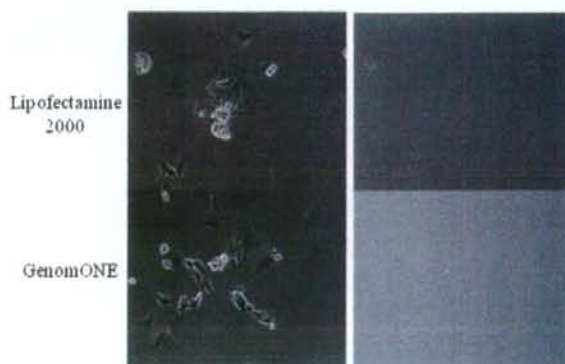


図 10. (a) Lipofectamine 2000、GenomONE を用いた際の細胞毒性 (b) 細胞の蛍光顕微鏡観察  
Lipofectamine、GenomONE 両者共に生存率は 90%程度と高く、細胞毒性は見られなかった。蛍光写真より造影剤はほとんど導入されていないことが分かった。

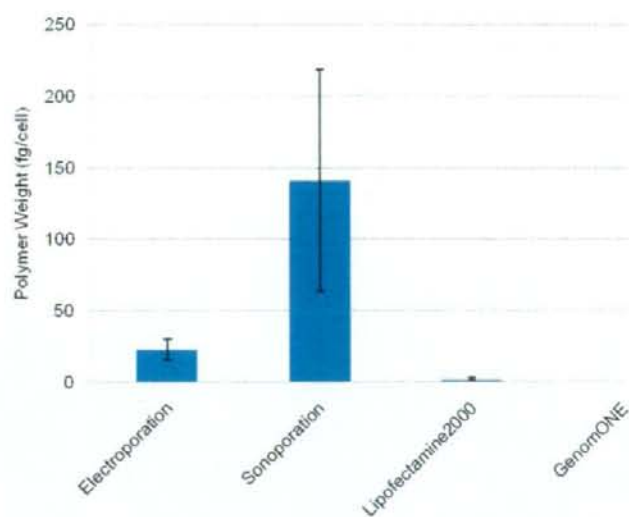


図 11. ラベル化法による導入量の変化

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。

ラット血管内皮前駆細胞移植による下肢虚血治療実験

(分担) 研究者 飯田 秀博  
国立循環器病センター研究所 放射線医学部

研究要旨 デキストラン-ガドリニウム誘導体 (Dex-Gd)よりなるMRI (Magnetic resonance imaging)用造影剤の合成を行った。本年度は、この得られた造影剤を用いて F344 ラットより採取した内皮前駆細胞の追跡を試みた。内皮前駆細胞の単離方法は他研究者の報告を基に確立し、得られた内皮前駆細胞を Dex-Gd を用いてラベルした。内皮前駆細胞内における Dex-Gd の安定性は、虚血下肢部における本細胞の治療能を評価すると同時に行った。

A. 研究目的

内皮前駆細胞(EPCs)は、血管新生による損傷組織や臓器の再生のために重要な細胞ソースであり、損傷した内皮細胞の治療に用いることができる。また、内皮細胞層中への浸潤し、隣接する内皮細胞の増殖を刺激することによって、新しい血管形成を誘導する。血管障害は、そこへ EPCs を誘導するためのケモカインを放出し、それら細胞が早期に同化することによって血管治癒が促進され、血栓症や低酸素症などの二次的な合併症の惹起を抑制する。虚血性組織は血管新生因子、例えば血管内皮増殖因子 (VEGF; EPCs 細胞膜に発現している VEGFR1(Flt-1)と VEGF レセプター(Flk-1, KDR)との相互作用を介する)などを誘導し、これらの細胞の損傷部位への遊走を促進する。子骨髄由来 EPCs は VEGFR2、Tie-2、VE-cadherin, CD34, CD146, E-selectin など内皮特異的なマーカーを発現している。細胞移植に関する研究で、虚血部位の血管治癒における EPC 細胞の重要性、およ

び EPC 細胞の誘導阻害が抗腫瘍活性を有していることなどが明らかになっている。

In vivo における細胞追跡能は、EPC 細胞に関する多くの基礎および実用的な問題に対する知見を与えると期待できる。磁気共鳴映像法(MRI)は、少数細胞の検出に必要な高感度かつ高分解能な映像化と、組織内の解剖学的な移植細胞の位置の特定を実現できる可能性を有している。同時に、MRI は非侵襲な方法であり、優れた空間的分解能と、解剖学的な画像の重ね合わせ、代謝や機能に関する情報を取得できる。

本研究の目的は、造影剤として Dex-Gd を含んだ EPCs のラット虚血モデルへの移植とその MRI による in vivo イメージング解析である。

B. 研究方法

B-1. EPCs の単離

F344 ラット (4 週齢、♂) に G-CSF (200 µg/kg/day, Kirin Pharma) を 5 日間皮下投

与して骨髓由来間葉系幹細胞の流動化を誘導した後、その大腿骨および頸骨から骨髓を洗い流した。CD34 および FLK-1 陽性骨髓由来間葉系幹細胞の単離は、抗 CD34 および抗 FLK-1 抗体(Santa Cruz Biotechnology, INC. Santa Cruz, CA)がコートされた磁気ビーズを用いて行った。得られた細胞は、フィブロネクチンコートディッシュに播種し、EGM-2 singleQuots (Clonetics Lonza, walkerville, MD USA)を含む EBM-2 培地(Endothelial cell basal medium)を用いて培養した。

#### B-2. 細胞のエレクトロポレーション

単離および2ヶ月間培養後、EPC ( $5 \times 10^5$  個)を 60 mm ディッシュに播種し、1日間培養した。その後、リン酸緩衝溶液(PBS, Invitrogen, NY, USA)にて細胞を洗浄し、3 mL の EBM 培地(phenol red free, Clonetics Lonza, walkerville, MD USA)で 30 分間培養を行った。その次に、Dex-DOTA-Gd (10 mM) を培地に加え、CUY-21 electroporator (NEPPA GENE, Tokyo, Japan)を用いて細胞に矩形波(電界強度; 300 V/cm、パルス数; 10、パルス持続時間; 5 ms)の電気パルスを与えた。その後、細胞を1時間培養し、数回PBSで洗浄した。

細胞をフィブロネクチンコートディッシュに播種し、共焦点レーザー顕微鏡(35 mm dishes, 27 mm quartz botton,  $1 \times 10^5$  per dish  $n=30$ )により解析した。エレクトロポレーション後の細胞内の Dex-DOTA-Gd 濃度を検証するため、細胞をPBSで洗浄後、細胞溶解液を加えて37°Cで1時間後インキュベートし、溶液を100  $\mu$ L採取してその蛍光強度を蛍光光度計(Wallac ARVO SX, Turku, Finland)を用い

て測定した。

#### B-3. ラット下肢虚血モデル

イソフルラン (1.5% in oxygen)麻酔下で、F344 ラット (8 週齢、♂) の左足を切開し、大腿動脈、大腿静脈およびそれらより分岐している血管を結紮して切除した。大腿動・静脈は腸外動脈から伏在および膝窩動脈の分岐部にかけて切除した。その後、Dex-Gd ( $6-6.6 \times 10^6$  cells)を含んだEPCを75  $\mu$ lのBolheal®の溶液Aに分散させ、虚血部にそれぞれ  $1.8-2 \times 10^7$  cells ずつ3箇所(筋肉内)に注入した。そして、一時的に細胞を固定するために75  $\mu$ lのBolheal®の溶液Bを移植箇所(筋肉内)に注入した。同様の方法で、EPCを含まないBolheal®を虚血部へ注入したものをコントロール群とした。

#### B-4. EPC の組織学的評価

単離一週間後、EPCの表現型を確認するために接着細胞の蛍光染色を行った。細胞に10  $\mu$ g/ml-Dil-acLDL (1,1'-di-octadecyl-3,3,3'-tetramethylindocarbocyanine perchlorate-labeled acetylated LDL, Biomedical Technologies)を加えて37°Cで4時間インキュベート後、10  $\mu$ g/ml-lectin (FITClabeled Ulex europeus agglutinin, Sigma)にて2時間対比染色を行った。染色後、サンプルを共焦点レーザー顕微鏡(Nikon)にて2蛍光観察することによって分化したEPCを確認した。移植9日後にラットを犠牲させ、MRIによる観察によって虚血部に移植したEPC中にDextran-Gd造影剤が存在していることを明らかとした。

## B-5. レーザードップラー血流画像化装置による分析

虚血部（左足）および非虚血部（右足）の血流比をレーザードップラー血流画像化装置により測定した。血流は、2度測定し、得られた画像をコンピューター処理することによって数量化し、虚血および非虚血部の平均血流量を算出した。

## B-6. 毛細血管密度

微視的な血管新生は、移植35日後の下肢虚血部の組織切片（12切片/ラット）からランダムに36試料を選択し、光学顕微鏡(Nikon Coolscope II)を用いて毛細血管数を数えることによって評価した。毛細血管密度は下肢非虚血部と比較した。組織の凍結切片（8 $\mu$ m）は、毛細血管の内皮細胞を検出するために、alkaline phosphatase substrate kit III (Vector laboratories, Inc. Burlingame, USA)を用いて染色して観察した。

### （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って、動物愛護の精神を持って実施した。

## C. 研究結果

### C-1. EPCの免疫染色

EPCのフェノタイプを1,1'-diiodo-3,3,3',3'-tetramethylindocarbocyanine perchlorate-labeled acetylated LDL (DiI-acLDL)とFITClabeled Ulex europaeus agglutinin (lectin)を用いて確認を行った。細胞の単離を行ってから、2週間後のCD34とFLK-1を用いた染色結果を図1

に示す。アセチル化した低分子リボプロテイン(図1C, 1D)及びレクチン(図1A, 1B)により染色された。この結果より、98%がEPCと確認できた。

### C-2. EPCに対するDex-Gdの導入

MRI用造影剤であるDex-GdをEPCに導入を行った後、細胞を25日間培養し、細胞内滞在性について検討を行った。細胞はフィブロネクチンディッシュ上において、普通の状態と変わらず増殖していた。共焦点顕微鏡観察の結果、日数の経過に関わらず、造影剤は細胞内に滞在していた(図2)。また、任意の日数において、全ての細胞を細胞溶解液により溶解させ、細胞内に存在する造影剤の蛍光を測定した(図3)。25日経過しても、細胞内に含まれる造影剤の量は一定であった。つまり、細胞増殖の過程においても、造影剤は細胞の外に漏れ出すことなく、細胞内に安定に存在できることが示された。この結果、造影剤を導入した移植細胞は、移植後長期間MRIにより追跡できると考えられる。

### C-3. 細胞のMRI撮像

#### 細胞のMRI撮像

図4に細胞内に造影剤を導入した後のMRI像を示す。細胞数は $1 \times 10^6$ から $6 \times 10^6$ 個を撮像した。水に対して十分なコントラストを得るためには、 $3 \times 10^6$ 個の細胞が必要であることがわかった。これより、細胞移植を行う場合、十分な細胞を移植し、適切な測定条件を選択することで、移植細胞をMRIを用いて追跡することができることがわかった。また、蛍光測定により、細胞1個に存在するガドリニウム量は、0.12 pgと計算された。



下肢虚血ラットを作成し、造影剤を導入した EPC の移植を行った。移植後 9 日後に犠牲死させ、移植部を取り出し、凍結切片の作成を行った。切片作成後、DiI-acLDL と lectin により染色を行った (図 5)。それぞれの像を重ね合わせた画像より、移植部 (筋肉内) に EPC が存在することが確認できた。

#### C-4. 細胞移植部の血流の評価

虚血部の血流の測定をレーザードップラーを用いて評価した (図 6)。 $2 \times 10^7$  個の EPC を下肢虚血部に移植した。血流の評価は、虚血部の血流量と健常部の血流量を比較することで行った。移植後 1 週間で、細胞移植群はコントロールと比較して差が見られ始め、移植後 30 日において、90% の血流の回復が見られた。一方、コントロール群では、50% 程度の回復しか見られなかった。この結果により、細胞 (EPC) を移植することで、虚血部の改善が可能であることがわかった。

#### C-5. 虚血部の血管新生の評価

新生された血管は vWF factor と Alkaline phosphatase により染色される。細胞移植を行ってから、30 日後の虚血部を前述の方法にのっとり取り出した。虚血部の切片に免疫染色を行い、血管新生について評価を行った。細胞移植群では、コントロール群及び健常部と比較して血管数の増加が見られた。これは移植した細胞により血管新生が起こっているためである。これは、レーザードップラーの結果を裏付けるものである。また、コントロール群及び健常部では、筋肉中における血管数に差は見られなかった。

#### C-6. 下肢虚血モデルへの EPC 移植

MRI を用いて移植 EPC 細胞の追跡を行った。造影剤を導入した  $2 \times 10^7$  個の EPC を虚血部に移植し、0、1、5、9、12、14 日後に MR 撮像を行った。EPC は 12 日目まで観察することができた。MRI の画像から判断すると、筋中に移植された EPC は細胞移植した部分から虚血部である膝付近へ移動しているように見えた。また、14 日目以降には、細胞に基づくコントラストは消失した。

#### D. 考察

細胞のマイグレーションは、虚血によりサイトカインの放出が起こり、そこへ移植細胞が移動したのではないかと考えている。脳虚血部位への幹細胞移植においては細胞マイグレーションの報告があり、類似の現象と考えられる。最終的に移植細胞が見られた部分は、血管新生の盛んな領域であった。これらの結果は細胞移植分野において重要なものである。細胞の移動を直接観察した報告はなく、本結果は非常に意義深いものである。現在、MRI のみではなく、蛍光イメージング機器を用いて細胞の追跡を進行している。つまり、蛍光イメージングと MRI を組み合わせることで、細胞の移動に関する、より強固な証拠が得られると確信している。

#### E. 結論

ラット下肢虚血モデルに対して、新規 MRI 造影剤により標識した血管内皮細胞前駆細胞を移植細胞した。ラベルによる細胞障害率・細胞内安定性・分化能変化は認められず、開発した造影剤がきわめて低刺激性であることが明らかとなっ

た。ラベル細胞を移植したところ、虚血部への遊走が示唆され、また、2週間程度で細胞に基づくコントラストが消失することが明らかとなった。現在、その詳細なメカニズムを検討中であるが、移植EPCが虚血部位へと遊走し、約2週間で何らかのイベントが起こっているのではないかと推察している。コントラスト消失後にも血流改善は継続するために、EPCの直接作用以外の作用が強く示唆された。

#### 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

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  $^{201}\text{Tl}$  and dynamic SPECT in canine: optimisation and validation of kinetic modelling. *Eur J Nucl Med Mol Imaging*. 35:896-905, 2008

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  $^{\text{H}}\text{2150}$  PET images using tissue-derived arterial and portal input functions. *Eur J Nucl Med Mol Imaging*. 35:1899-911, 2008

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

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

Sohlberg A, Watabe H, Iida H. Three-dimensional SPECT reconstruction with transmission-dependent scatter correction. *Ann Nucl Med*. 22:549-56, 2008  
Sohlberg A, Watabe H, Iida H. Acceleration of Monte Carlo-based scatter compensation for cardiac SPECT. *Phys Med Biol*. 53:277-85, 2008

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  
Yokoyama I, Inoue Y, Kinoshita T, Itoh H, Kanno I, Iida H. Heart and Brain Circulation and  $\text{CO}_2$  in Healthy Men. *Acta Physiol (Oxf)*. 193:303-8, 2008

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

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

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

銭谷 勉, 渡部 浩司, 飯田 秀博. SPECT イメージング. 遺伝子医学MOOK9 号 「分子イメージング技術」. 75-81, 2008  
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

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

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

CD 34<sup>+</sup>  
cells

Fli-1<sup>+</sup>  
cells

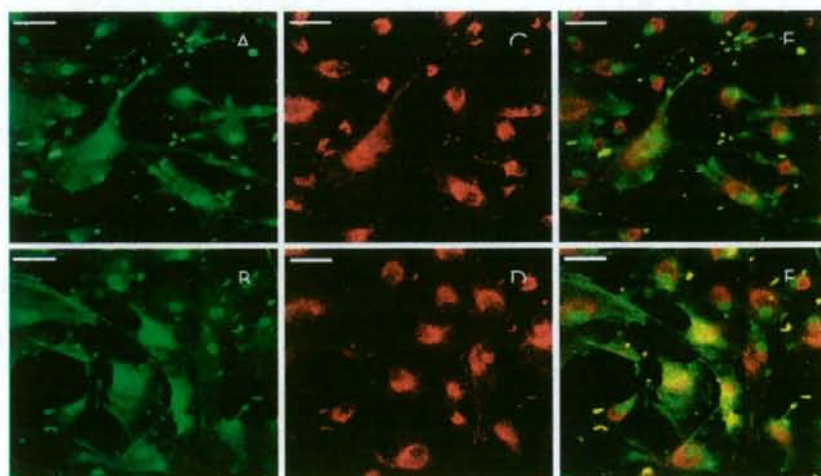


図 1. ラットより単離したEPCのLectin (A, B)とDil-acLDL (C, D)で染色した共焦点顕微鏡観察. E, F AとC、BとDを重ね合わせた図。共に緑色と赤色で染色される細胞がEPCである。スケールバー 50  $\mu$ m

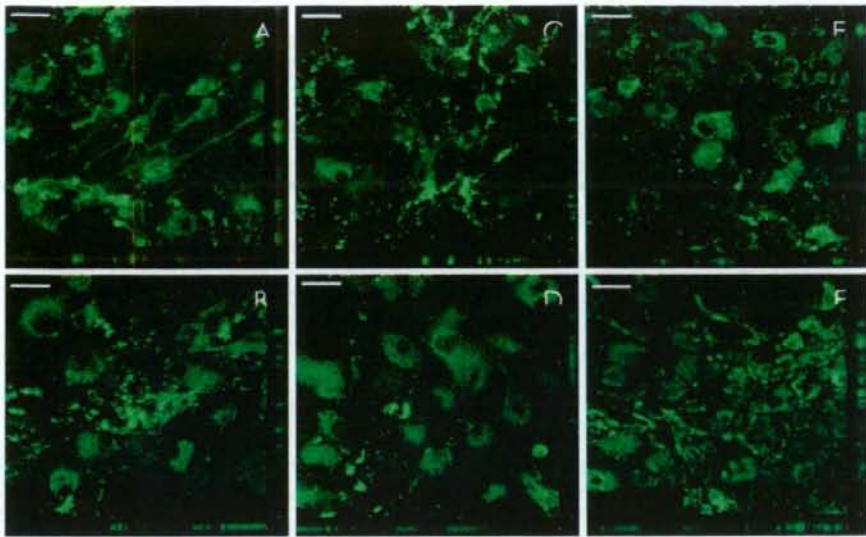


図 2. 造影剤を導入した EPC の共焦点顕微鏡画像。導入はエレクトロポレーション法により行い、造影剤として FITC-Dextran-Gd を用いた。A. 1 日目, B. 5 日目, C. 10 日目, D. 15 日目, E. 20 日目, F. 25 日目. スケールバー 50  $\mu$ m

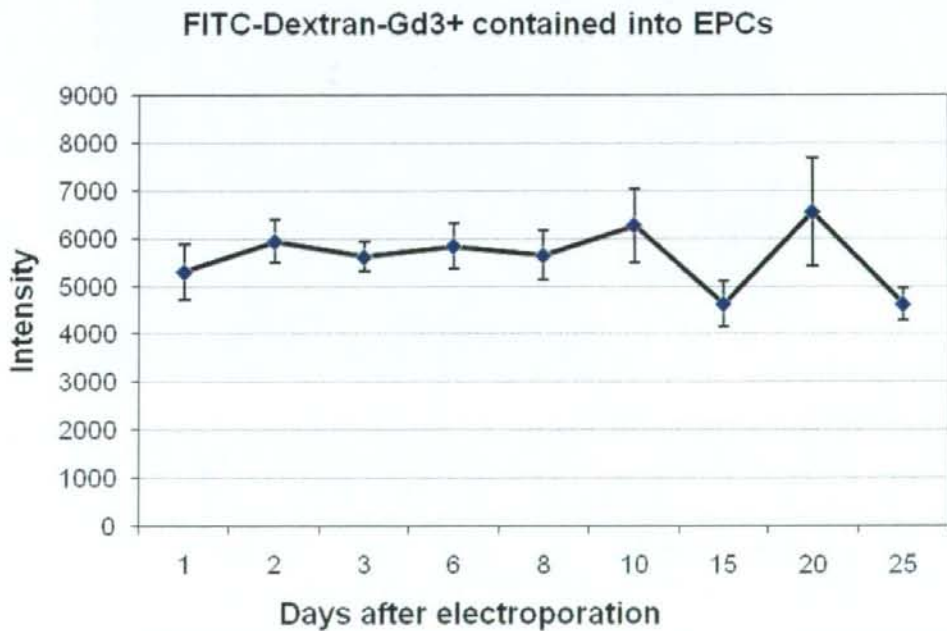


図 3. 造影剤の細胞内滞在性。縦軸は全細胞内に含まれる造影剤の総量を表す。

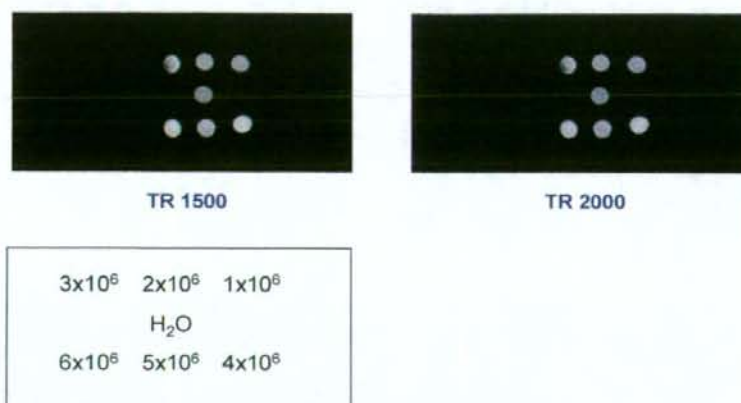


図 4. 細胞の in vitro における MRI 画像。図中に示した数の細胞をそれぞれアガロースゲル内に封入し、測定条件の繰り返し測定時間 (TR) を変化させて撮像した。

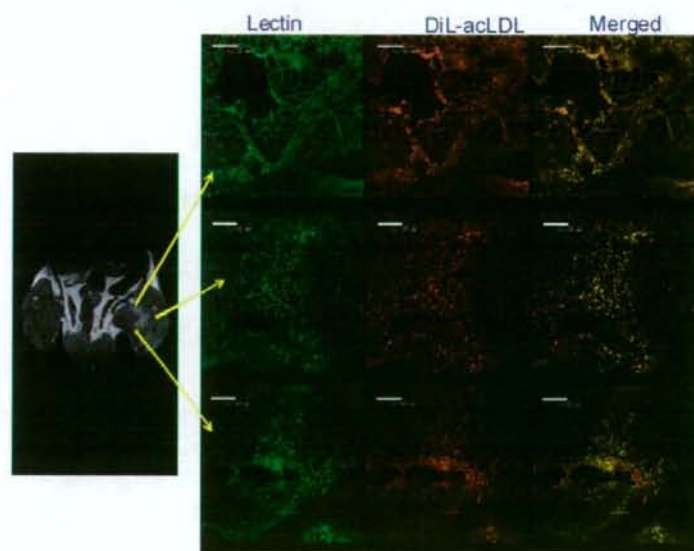
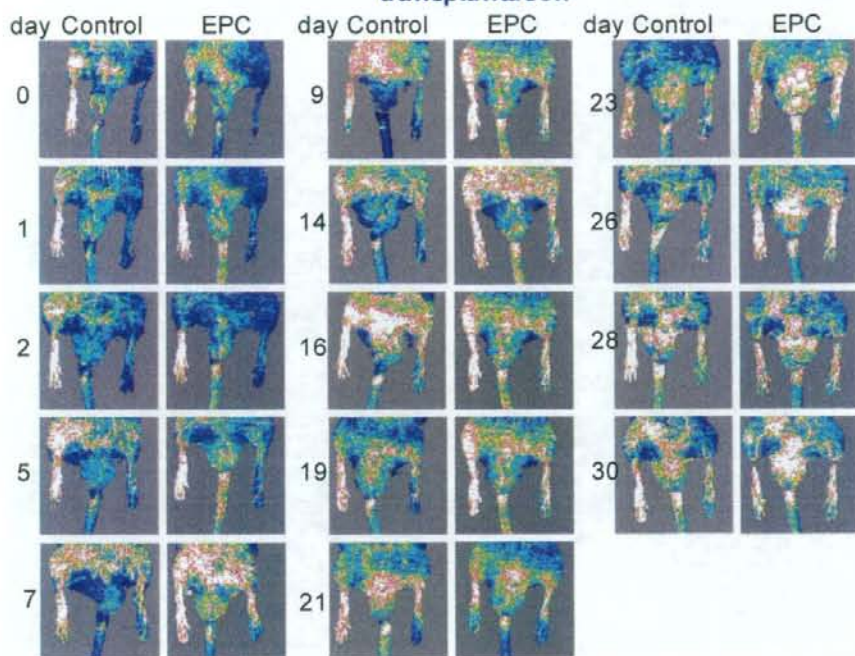


図 5. 細胞移植部の切片の共焦点顕微鏡画像。切片は、細胞移植を行ってから、9日後にラットを犠牲死させ、取り出した。凍結切片は 1,1'-dioctadecyl-3,3,3,3'-tetramethylindo-carbocyanine perchlorate-labeled acetylated LDL (DiI-acLDL; 10  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) と FITClabeled *Ulex europaeus* agglutinin (lectin, 10  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) により染色した。

### Laser doppler blood perfusion after ischemic limb induction and EPC transplantation



### Recovery process after ischemic induction

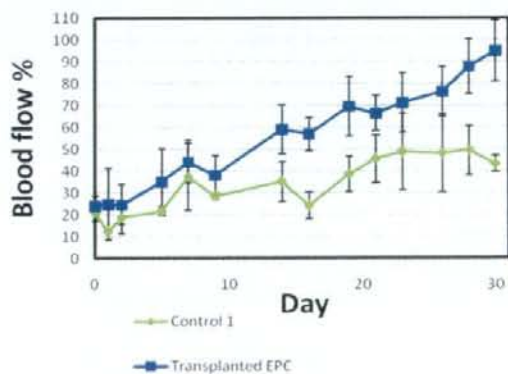


図 6. 細胞移植群とコントロール群の日数経過による血流の回復。血流測定はレーザー Doppler を用いた。縦軸は、虚血部の血流量と健常部の血流量の%で表している。

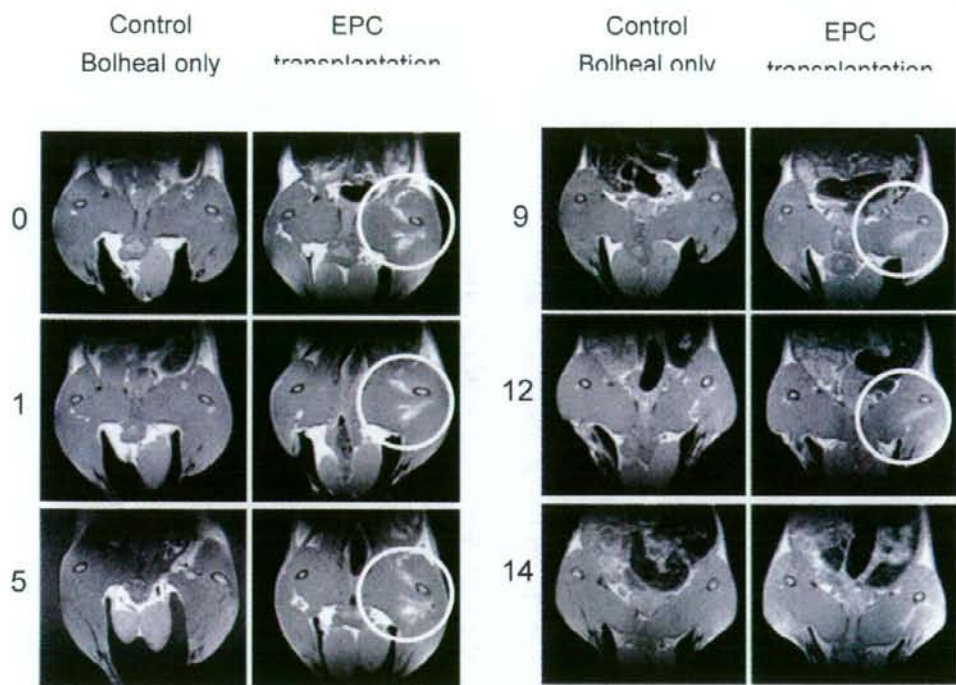


図 7.  $2 \times 10^7$  個の EPC を虚血部に移植した後、任意の日数における MRI 画像。画像はラットの腰の水平断面図を表す。

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

(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

研究要旨 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検討を行った。ラット間葉系幹細胞を用い、市販されている止血剤をスキャホールドとして培養した。得られた結果を基に、下肢虚血モデルラットに対し、細胞移植を行った。ラットの径時変化をMRIとレーザードップラーにより評価を行い、血管新生についても検討を行った。

A. 研究目的

近年、細胞移植療法が活発に研究されている。移植細胞種の探索と共に、その手法は数多く検討されており、未だ確立した手法はないといえる。例えば、尻静脈からの細胞のインジェクションや疾患部位への直接的な細胞の投与などがある。また、細胞シートを用いた移植方法などもある。

細胞移植を進める上で、重要なことは、移植した細胞を効率よく、目的部位に生着させる、または、機能を発揮させることにあるといえよう。そのためには、生体内において拡散していく移植細胞を目的部位に留めること、また、細胞の機能を保持させた状態で移植を行うことが必須である。更に、今後の細胞移植において、移植方法の簡便さも追求されるであろう。

移植方法が数多く存在するのは、移植した細胞の中で、どの程度の細胞が目的部位に存在しているのかわからないという根本的な問題に起因する。そのため、様々な移植方法を試み、回復結果と照ら

し合わせ検討していく必要がある。

本研究では、現在市販されている止血剤を用い、細胞移植のための3次元培養を試みた。更に、ラット下肢虚血モデルに対して細胞移植を行い、経過を観察した。また、移植細胞の評価を行った。

B. 研究方法

B-1.3 次元スキャホールドの検討

現在市販されている止血剤をスキャホールドとして検討を行った。サンプルとして、インテグラン(スポンジ、シート、プレスシート)、アビテン、サージセル、スポンゼル、タココンプを使用した。それぞれのサンプルを長方形(1.9 cm×0.9 cm)に切り取った。データを表1に示す。1×10<sup>6</sup>個のラット間葉系幹細胞(T4)を培地100 µlに懸濁させ、サンプルに対して播種した。2時間37°Cでインキュベート後、培地400 µlを加え、37°Cでインキュベートした。2日ごとに培地交換を行い、所定の日数で10%ホルマリン溶液に浸し、細胞の固定化を行った。



## B-2. ラット大腿動静脈の染色

ラット大腿動静脈を切り出し、凍結切片を作成した後、ヘマトキシリン-エオシン (HE)、アルカリフォスファターゼ (AP)、フォンウィルブランドファクター (vWF) による染色を行った。それぞれの染色はプロトコールに従って行った。

## B-3. ラット下肢虚血モデルへの3次元スキャホールドを用いた細胞移植

移植2日前にラット間葉系幹細胞にエレクトロポレーション法により PVA-Gd (導入率 10%) の導入を行った。移植1日前に、スポンゼルを長方形 (3 cm×1 cm×0.5 cm) に切り取り、造影剤を導入した細胞を  $1.3 \times 10^7$  個 (培地 100  $\mu$ l) スポンゼル上に播種した。2時間 37°C でインキュベート後、1.5 ml の培地を添加し、24時間培養を行った (図7左)。移植日に8週齢の F344 ラットを用い、イソフルランによる麻酔下、起始部大腿動脈・静脈、浅後腹壁動脈・静脈、末梢部大腿動脈・静脈の3箇所を結紮した上、血管を切除した。切除した血管部に対し、細胞播種面が接するようにスポンゼルを置き、縫合することで細胞移植の完了とした。

図7右の表に従い、サンプルA (造影剤を導入した細胞+スポンゼル) サンプルB (細胞のみ+スポンゼル)、サンプルC (造影剤のみ+スポンゼル)、サンプルD (スポンゼルのみ) を4匹ずつ (計16匹) 作成した。

## B-4. 細胞移植ラットの評価

移植から所定の日数において、イソフルランによる麻酔下、レーザードップラー (株式会社システム) により、ラット

下肢の健常部と虚血部の血流量の測定を行った。

血流量の測定と同時に、MRI (株式会社DSファーマ) を用いて移植細胞のイメージングを行った。測定シーケンスは、2D-スピンエコー法を用いた。TEは9 msとし、TRは1500 msとした。得られた画像のピクセル数は256×128であり、FOVは4cm×2 cmである。スライス厚は1 mmとした。

細胞移植より1ヶ月後に、ラットを犠牲死させ、移植部を観察すると共に、ラット内転筋を取り出し、凍結切片を作成した。

## B-5. 細胞移植による血管新生の評価

内転筋の凍結切片を HE、AP、vWF により染色を行い、顕微鏡により観察した。また、AP 染色の結果より、単位面積辺りの血管数をカウントした。

(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. 3次元スキャホールドの検討

7種類の止血剤を用い、ラット間葉系幹細胞の3次元培養を2週間行った。細胞播種直後、タココンプは溶解した (図1)。更に、7日間培養を続けた結果、アビテンとサージセルは形状を保持できず、非常にもろくなっていた (図2)。この結果より、インテグランとスポンゼルが長期間培養に耐えうる材料であることが解った。

次に、培養開始から2日目のアビテンをホルマリンで固定化し、顕微鏡観察を行った(図3)。培養2日目において、材料内部と表面の密度に差が見られ、表面構造が保持できていないことがわかった。細胞は材料内部まで到達しており、培養可能であった。

培養開始後7日目、14日目のインテグラン(スポンジ、シート、プレスシート)の切片観察結果を図4に示す。3サンプル共に、14日目まで形状を保持していたが、非常にやわらかくなっていた。全てのサンプルにおいて、細胞は表面に接着しており、細胞の形状は伸展していた。また、細胞は材料内部でも確認できた。スポンジ、シート、プレスシートを比較すると、扱いやすさの面からスポンジタイプが最も良かった。

図5にスポンゼルの培養結果を示す。日数の経過に伴い、スポンゼルの大きさはほとんど変化しなかったが、孔の大きさは大きくなった。また、接着した細胞数も多く、材料の内部まで広がっていた。培養開始後、14日目においても、材料の形状を保持していた。

#### C-2. ラット大腿動静脈の染色

ラット大腿動静脈を切り出し、HE、AP、vWFの染色を行った(図6)。AP及びvWFは微小血管を染色できることが知られている。AP染色では血管部が青く染色されていた。しかし、vWF染色では明確に染色されていることがわからなかった。

#### C-3. ラット下肢虚血モデルへの3次元スキャホールドを用いた細胞移植

ラット下肢虚血モデルを作成し、3次

元スキャホールドを用いて細胞移植を行った。3次元スキャホールドとして、C-1の結果より、スポンゼルを用いた。播種前の細胞と材料の様子を図7左に示す。

細胞移植ラットのMRI画像を図8に示す。サンプルAにおいて、移植直後から1週間にかけて、細胞を播種した材料表面がコントラスト強く見られた。移植から10日目、14日目では移植部の全体がコントラスト強く見られた。また、移植後、3日目で1匹死亡した。サンプルB、サンプルDでは、造影剤を導入していないため、コントラストの増強はなく、移植部位はわずかにローコントラストであった。しかし、移植開始1週間程度で、わずかにハイコントラストに見えた。これは材料が存在しているところである。造影剤水溶液を染込ませたスポンゼルを移植した場合(サンプルC)、直後ではスポンゼル全体が白くエンハンスされていたが、1日後からはほとんど見えなくなった。しかし、この場合でも1週間後からわずかにハイコントラストに見えた。

#### C-4. 細胞移植ラットの評価

細胞移植モデルラットの長期間における経過観察を行った(図9)。モデル作成直後から28日までレーザードップラー測定を行った。日数の経過に従い、虚血部の血流量の回復が見られた。図9の画像処理により、正常な下肢(左)と虚血の下肢(右)の血流量を比較検討した。縦軸のblood flow ratioは、正常な下肢の血流量に対し、虚血の下肢の血流量の割合を表す。この結果、ばらつきが見られたものの、虚血作成直後は10%程度であった割合が、時間の経過と共に、60%程度まで回復していることがわかった。し

かしながら、細胞移植群と非移植群との明確な差は見られなかった。

細胞移植後1ヶ月後にラットを犠牲死させ、健常部と移植部の比較を行った(図10)。全てのサンプルにおいて、移植部の大腿筋の表面には、健常部と比較して、小さな血管を多く見ることができた。更に、細胞を移植しているサンプル A、B ではサンプル C、D と比較して血管が多く見られた。

#### C-5. 細胞移植による血管新生の評価

サンプル A 及びサンプル D のラットの内転筋の縦断面の凍結切片を作成し、染色を行った(図 11)。AP 染色より、サンプル D では、筋肉全体に青い点が見られた。一方、サンプル A では、細胞移植した部分に青く染色される場所が多く見られた。また、AP 染色の結果より、毛細血管密度を算出したところ、サンプル A 及び D に差は見られなかった。

#### D. 考察

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を目的とする。臨床応用を見据え、現在止血剤として用いられている材料を、3次元スキャホールドとしてラット間葉系幹細胞の培養を行った。細胞の接着数、材料内部への広がり、扱いやすさを考えると、スポンゼルが最もよく、次いで、インテグランのスポンジタイプが良い結果となった。現段階では、材料の厚みを一定として検討を行ったが、より好条件を探索するためにも、更なる検討が必要である。

3次元スキャホールドを用いた細胞移植では、移植後から、スポンゼル表面に播種した細胞を MRI により観察するこ

とができた。しかし、1週間以降で移植部が全体的にハイコントラストになった。in vitro 実験により、1週間程度でスポンゼルの全体的な大きさは変化せず、ポアサイズは大きくなることがわかっている。つまり、時間の経過に従い、スポンゼルの分解が進み、その場所に流動性の強い成分が凝集したため、わずかにハイコントラストに造影されたと考える。これをクリアするためには、分解速度の遅い材料を検討する必要がある。

血流測定の結果から、細胞移植群と非細胞移植群との間に差が見られなかった。更に、内転筋の毛細血管数の染色結果からも差が見られなかった。しかし、目視では、細胞移植部(筋肉上)に毛細血管が多く見られた。これらのことより、現状では、ラット間葉系幹細胞を移植した場合、毛細血管の新生・誘導が起こるが、顕著なものではないと考える。

#### E. 結論

細胞移植用の3次元スキャホールドの検討を行った。細胞の接着、扱いやすさから、スポンゼルが細胞移植に最も適していた。下肢虚血モデルラットへの細胞移植の結果、移植細胞はスポンゼル上に存在していることが MRI を用いて確認できた。移植した細胞は最低1週間まで観察することができた。今後、1週間以降のシグナルが、細胞に起因するものなのか、流動成分によるものなのかを見極めていく必要がある。また、血流測定の結果から、細胞移植による効果は見出せなかったが、用いる細胞種に適した移植方法を検討することで、効果の高い結果が得られると考える。

## 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

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

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

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

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 一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一。日本小児循環器学会雑誌 24:628-635, 2008

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

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

中谷武嗣: 対外設置型補助人工心臓 一東洋紡

補助人工心臓一。Clinical Engineering 19:618-622, 2008

中谷武嗣: 心不全の機械的補助最前線。Current Therapy 26:955-958, 2008

中谷武嗣: 心臓移植における保存法。移植 43:336-341, 2008

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

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

### G-2. 学会発表

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

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

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

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

H. 知的財産権の出願・登録状況  
なし