

表 1. 3次元培養用スキャホールドの検討

	サンプル	形状	厚み (mm)	材料
1	インテグラン	スポンジ	3	atelocollagen
2	インテグラン	シート	3	atelocollagen
3	インテグラン	プレスシート	1	atelocollagen
4	アビテン	プレスシート	1	collagen
5	サージセル	プレスシート	1	oxidized cellulose
6	スポンゼル	スポンジ	2.5	gelatin
7	タココンブ	スポンジ	1	fibrinogen



図 1. 3次元培養用スキャホールドの検討  
細胞播種直後、タココンブ(7)は溶解した。7日間培養を続けた結果、アビテン(4)とサージセル(5)は形状を保持できず、非常にもろくなっていた

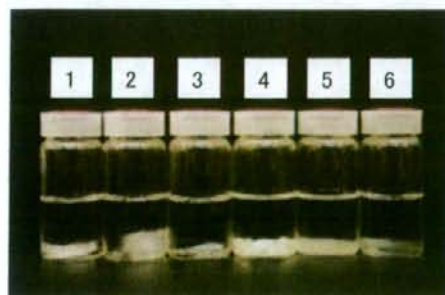


図 2. 培養4日後のスキャホールドの様子

アビテン 2 day

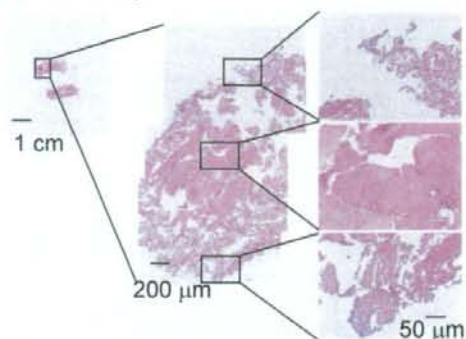
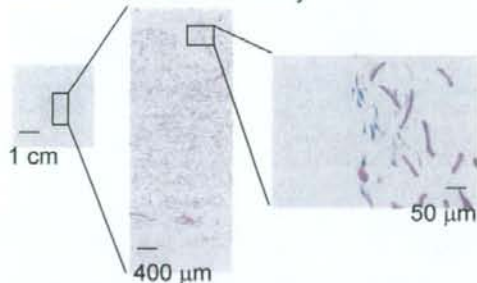


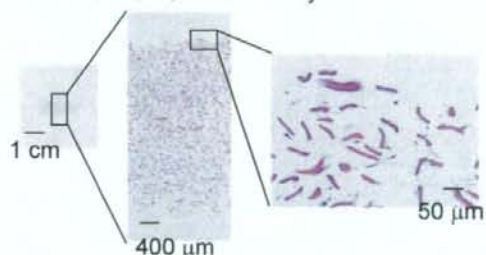
図 3. 細胞播種後、2 日目のアビテン切片の顕微鏡観察

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かった。

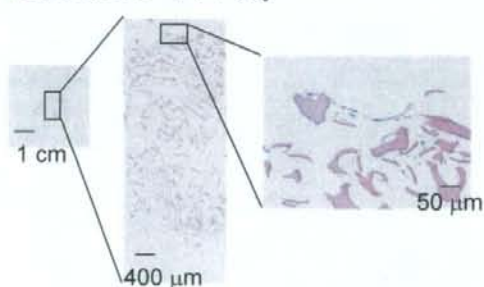
インテگران(スポンジ) 7 day



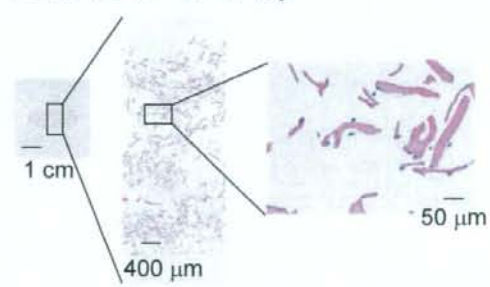
インテگران(スポンジ) 14 day



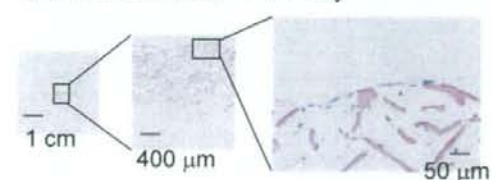
インテگران(シート) 7 day



インテگران(シート) 14 day



インテگران(プレスシート) 7 day



インテگران(プレスシート) 14 day

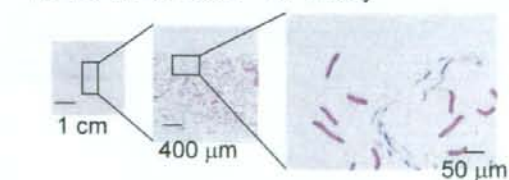


図 4. 細胞播種後、7 日、14 日目のインテگران切片の顕微鏡観察

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。扱いやすさの面からスポンジタイプが最も良かった。

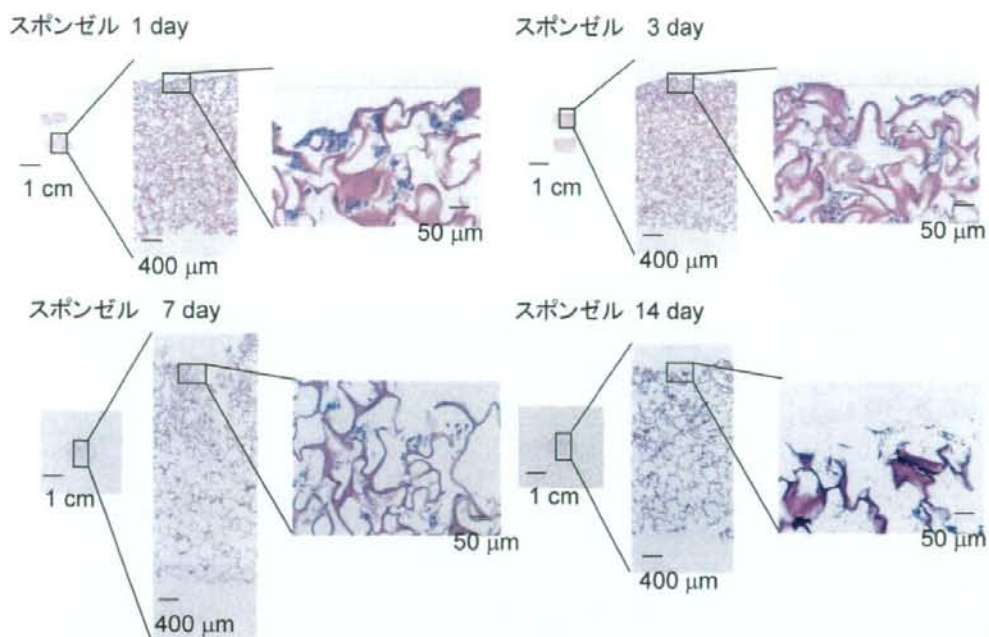


図 5. 細胞播種後、1日、3日、7日、14日目のスポンゼル切片の顕微鏡観察  
 日数の経過に伴い、孔の大きさは大きくなった。接着した細胞数も多く、材料の内部まで広がっていた。

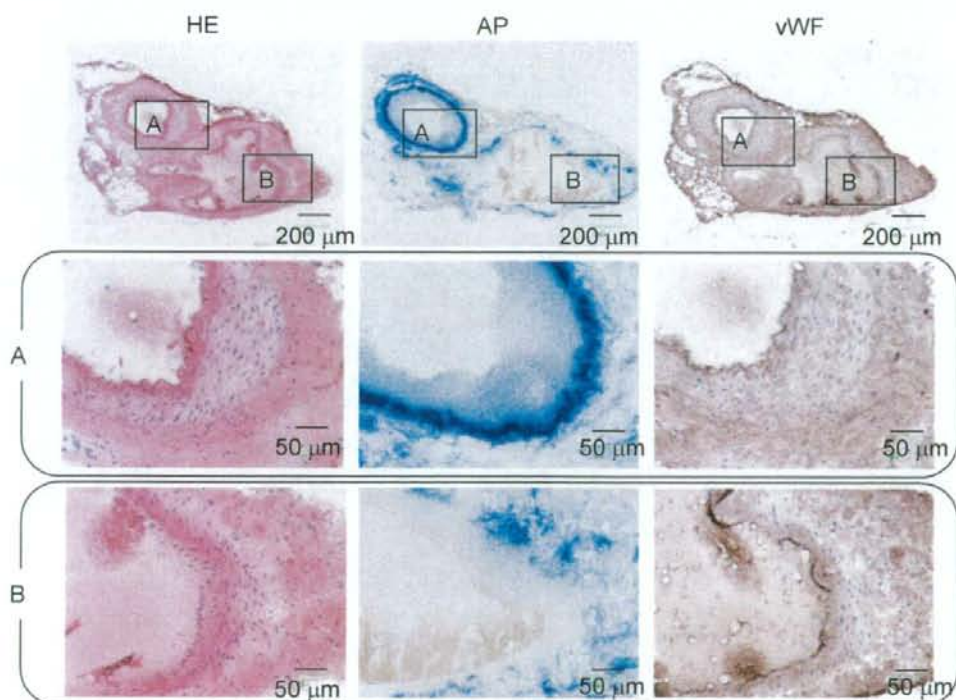


図 6. ラット大腿動静脈の染色  
 AP 染色では血管部が青く染色されていた。





サンプル	細胞	造影剤
A	○	○
B	○	×
C	×	○
D	×	×

図 7. スポンゼルを用いた細胞移植



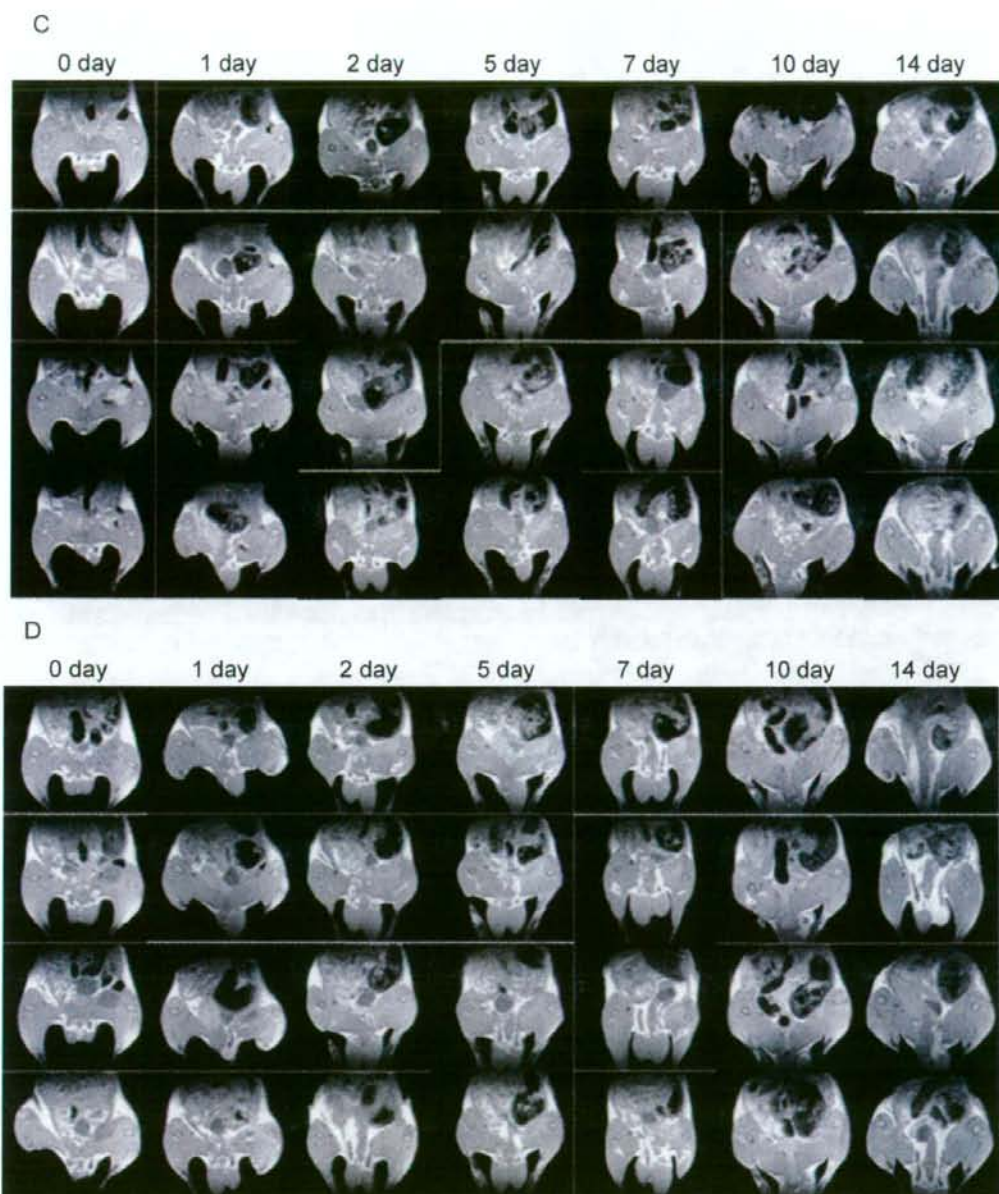
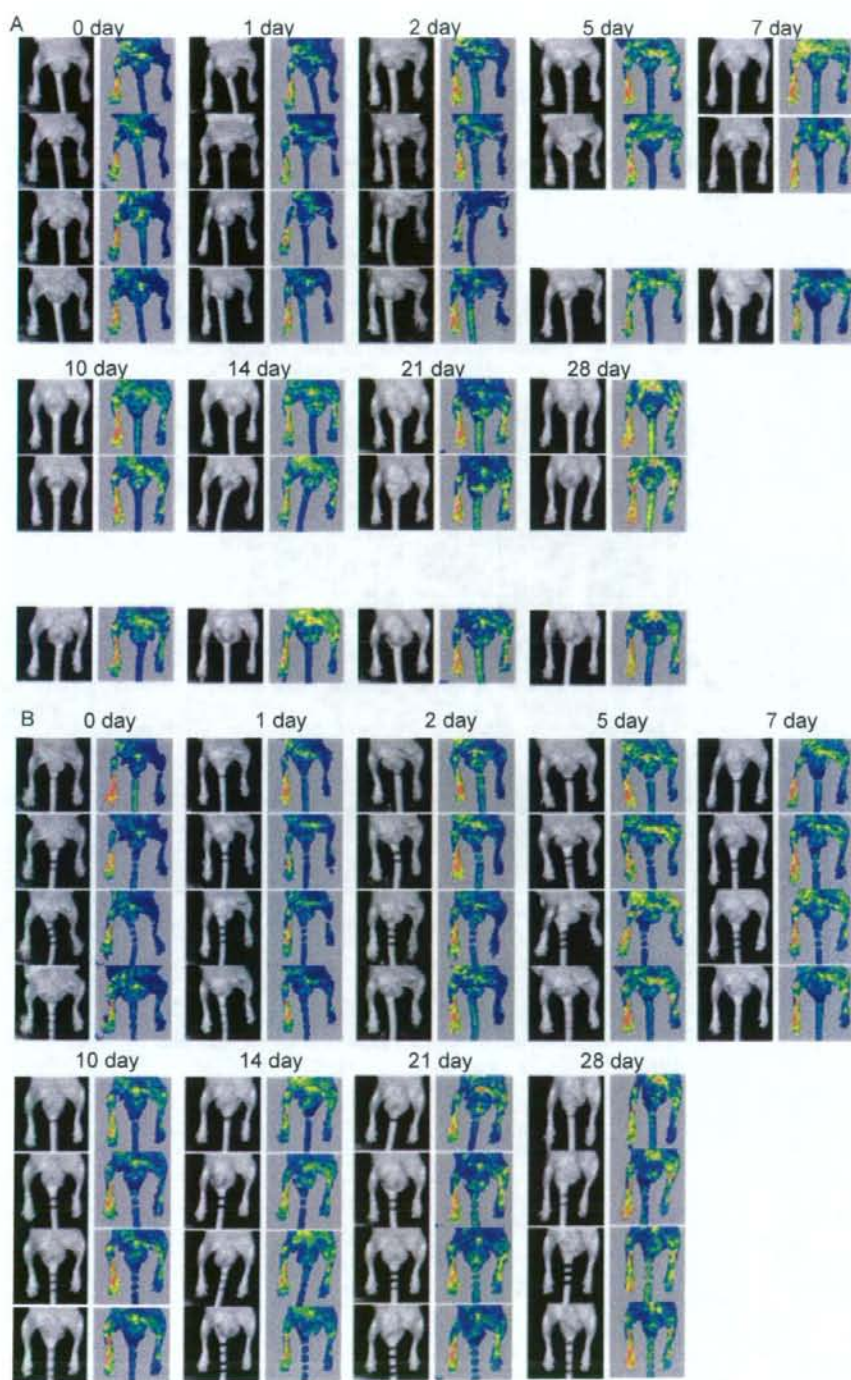
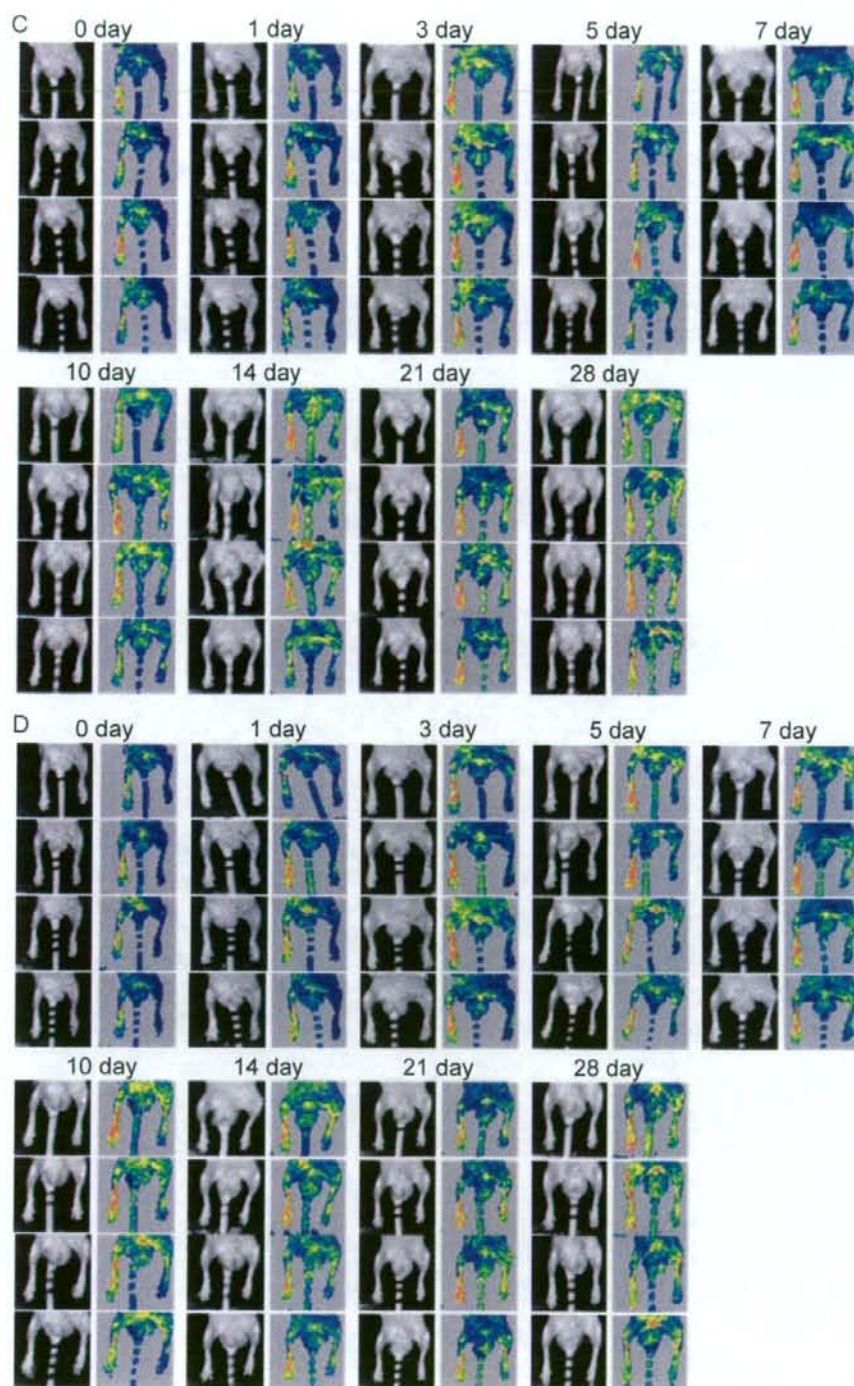


図 8. スポンゼルを用いて細胞移植を行ったラットの MRI 画像

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。サンプル B、サンプル D では、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。







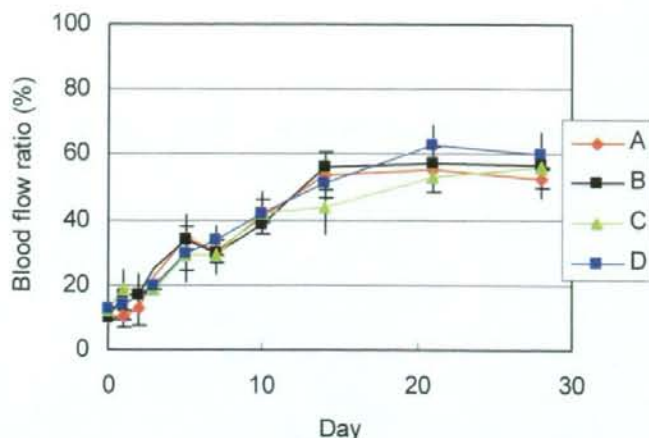


図 9. スポンゼルを用いて細胞移植を行ったラットの血流測定

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。細胞移植群と非移植群との明確な差は見られなかった。

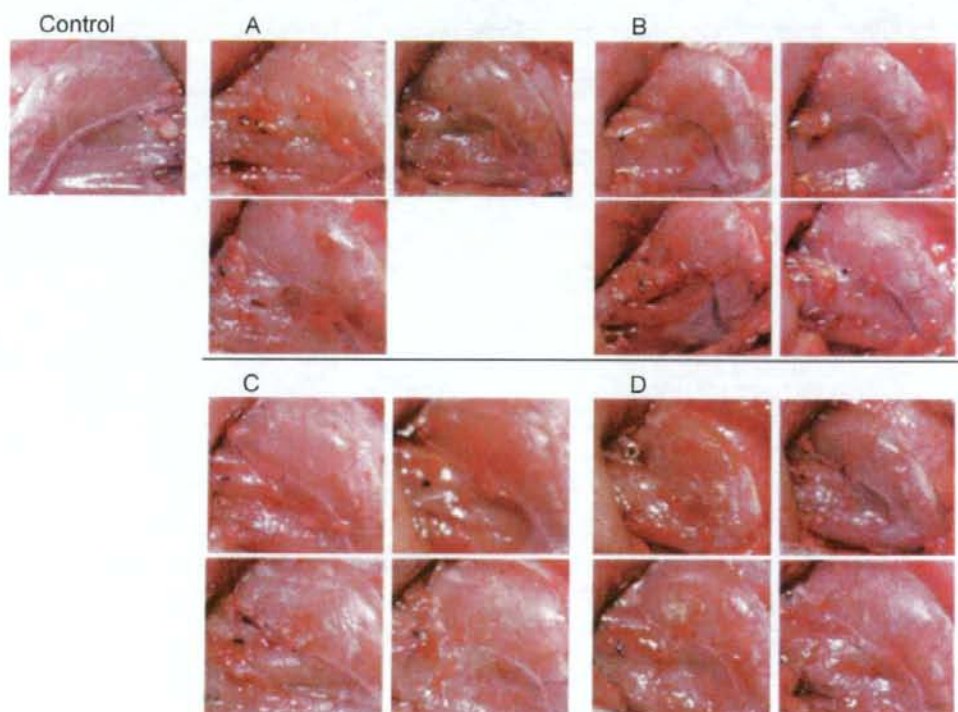
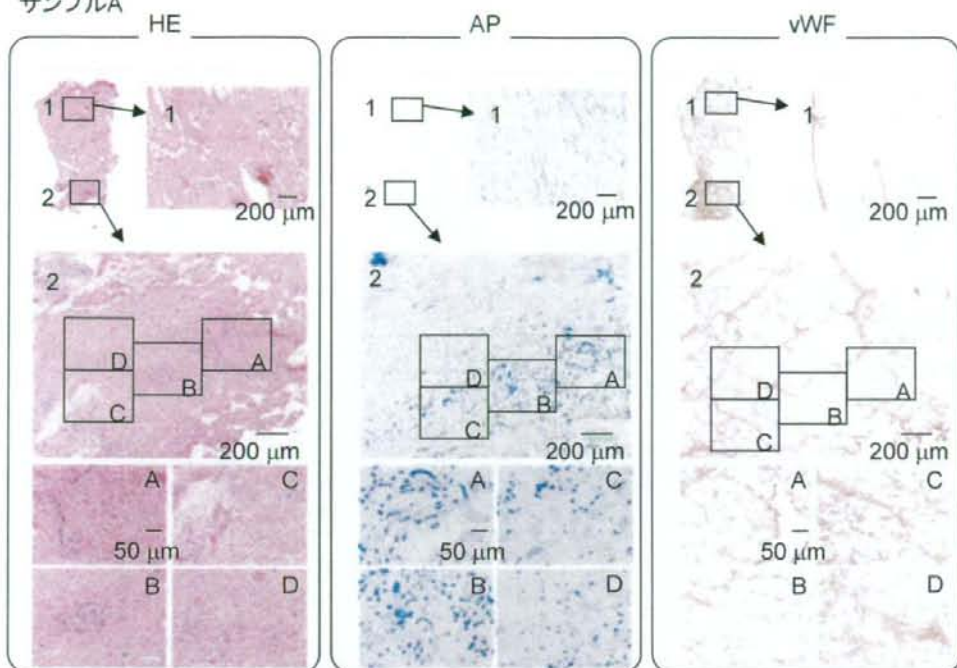


図 10. 細胞移植 1 ヶ月後の健常部と移植部の比較

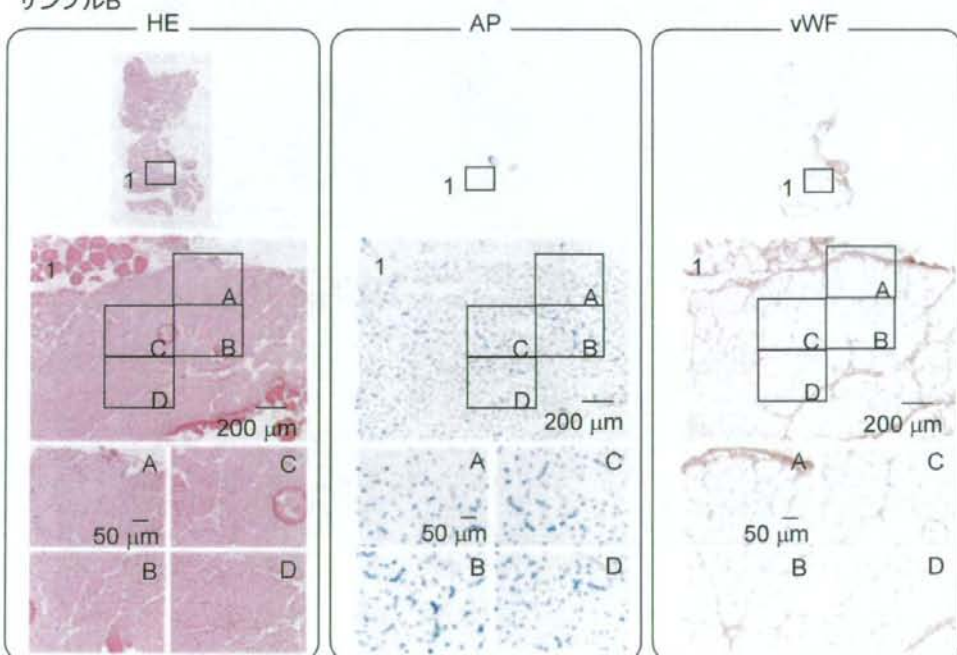
移植部の大腿筋の表面には、健常部と比較して、小さな血管を多く見ることができた。細胞を移植しているサンプル A、B では、サンプル C、D と比較して血管が多く見られた。



サンプルA



サンプルB



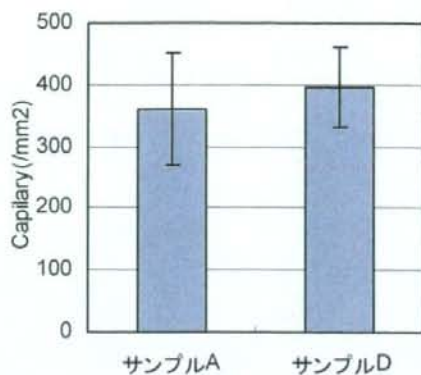


図 11. 健常部と移植部の内転筋の血管の染色及び血管密度測定

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。

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

(分担) 研究者 橘 洋一  
国立循環器病センター研究所 生体工学部

研究要旨 ラット間葉系幹細胞を用いた造影剤の *in vitro* 評価とラベル化細胞の移植を行った。造影剤の細胞障害率・細胞内滞在性・分化能への影響について検討した。ラット下肢虚血モデルに対し、ラベル化したラット間葉系幹細胞を移植した。移植はボルヒールを用い、3種類の方法で行った。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った。

#### A. 研究目的

近年、MRI用造影剤の研究が活発に行われてきた。これまでに、ガドリニウムを中心金属としたキレートを含む低分子化合物が、血管造影を主要目的とするMRI用造影剤として、数多く開発されてきた。さらに、酸化鉄ナノ粒子やデンドリマー型造影剤など、それぞれの目的に応じて改良が重ねられてきた。

移植細胞の追跡として、現在までに鉄製造影剤を用いた研究が報告されている。しかし、陰性造影剤は黒く抜ける画像が得られるため、アーチファクトとの区別が非常に困難である。更に、細胞が死んだ場合、細胞内から造影剤が漏出し、その造影剤が移植部に造影剤が沈着する可能性がある。これは、移植細胞を検出しているのか判断できなくなる可能性がある。

移植細胞を追跡する上で、これらの問題点をクリアするためには、造影剤に必要な条件として、生体適合性、高い安全性、非毒性などの条件を有していなくてはならない。また、最も重要な特徴とし

て、細胞内に滞在し、かつ、細胞外へ漏出した場合に、速やかに体外へ排出されることが挙げられる。

本研究では、ラット間葉系幹細胞を用い、造影剤の評価を行った。更に、止血剤の1つとして知られているボルヒールをスキャホールドとして用い、ラット下肢虚血モデルに対して細胞移植を行った。経過観察を行い、移植細胞の評価を行った。また、鉄製造影剤溶液とPVA-Gd水溶液の *in vivo* 挙動について検討した。

#### B. 研究方法

##### B-1. 高分子造影剤のラット間葉系幹細胞に対する評価

ラット間葉系幹細胞に異なる濃度のPVA-Gdを加え、細胞の増殖をwst-1アッセイにより評価した。操作はプロトコルに従って行った。具体的には、450 nmと650 nmの吸光度を測定し、その差を検体の吸光度とした。細胞のみの吸光度を100%として細胞の生存率を算出した。また、LDHアッセイを用いて細胞障害率を測定した。ポジティブコントロール



(P)としてTween20、ネガティブコントロール(N)としてPBSを用いた。測定は570 nmの吸光度を測定し、得られた検体の吸光度を(S)とし、 $(S-N)/(P-N) \times 100$ で求めた。

#### B-2. ラット間葉系幹細胞を用いた高分子造影剤の細胞内導入

移植細胞として、ラットの間葉系幹細胞を用いた。培地は、10% bovine calf serum, 5% horse serum を含んだ Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM-LG)を使用した。エレクトロポレーションは、継代数3のときに行った。エレクトロポレーションを行う1日前に、6 cm シャーレに $1 \times 10^6$ 個のラット間葉系幹細胞を播種した。播種1日後、細胞をPBSで洗浄した後、任意のPVA-DOTA-Gdを添加し、エレクトロポレーションを行った。電極として5 mmギャップのものを使い、実験条件は、number of pulses 10, pulse duration 5 ms, field strength 200 Vとした。エレクトロポレーションを行ってから一時間後に、PBSで3回洗浄を行った。

#### B-3. 高分子造影剤のラット間葉系幹細胞内滞在性

細胞内に導入されているPVA-Gdの径時変化を測定した。細胞内にPVA-Gdを導入後、トリプシン処理を行い、6 cm シャーレに播種した。任意の時間において、シャーレに細胞溶解液を添加し、1時間、37°Cでインキュベートすることで細胞を完全に溶解させ、蛍光測定にて細胞内に含まれるPVA-Gdの量を決定した。合わせて、明視野、蛍光顕微鏡を用いて径時観察も行った。

#### B-4. ラット間葉系幹細胞の分化誘導実験

エレクトロポレーション後、骨芽細胞分化誘導培地(DMEM supplemented with 10 nM dexamethasone, 10 mM  $\beta$ -glycerophosphate, and 50  $\mu$ M ascorbic acid)を加え、培養を行った。任意の日数において顕微鏡観察を行い、細胞の形状変化を検討した。また、PBSで3回洗浄した後、メタノールを添加し、-20°Cで2分間放置することで細胞の固定化を行った後、水で3回洗浄し、アリザリンレッドS染色をした。染色は、分化誘導開始直後、11日目、21日目に行った。

#### B-5. ラット間葉系幹細胞のMRI撮像

エレクトロポレーションにおけるPVA-Gdの濃度を200, 100, 50, 25 mg/mlとし、細胞のラベル化を行った。得られた細胞を $1.4 \times 10^7$ ,  $7.5 \times 10^6$ ,  $4.9 \times 10^6$ 個カウントし、ボルヒール100  $\mu$ lに封入した。得られたゲルをMRIを用いて撮像を行った。測定シーケンスは、2D-スピンエコー法を用いた。TEは9 msとし、TRは100, 200, 300, 500, 800, 1000, 1500, 2000, 3000 msとした。得られた画像のピクセル数は $256 \times 128$ であり、FOVは $4 \text{ cm} \times 2 \text{ cm}$ である。スライス厚は1 mmとした。比較対照としてボルヒールのみを用いた。

#### B-6. ラット下肢虚血モデルを用いたラット間葉系幹細胞移植実験

ラット下肢虚血モデルに対し、造影剤を内包したラット間葉系幹細胞移植を行った。疾患モデルとして、ラット左大腿動脈、静脈を切除したものとした。細胞のスキャホールドとしてボルヒール(フィブリン液+トロンピン液)を用いた。

移植後、レーザードップラー（㈱モンテシステム）測定により、血流の回復を観察した。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。同時に MRI 測定を行った。

①ラット F344 (14 weeks, male) 下肢虚血モデルに対し、 $3 \times 10^7$  個のラベル化細胞 + ボルヒール 100  $\mu$ l を混合し、移植した。移植方法は、シリンジ内でゲルを作成し、そのままシリンジの先から目的部位に塗布した。コントロールとして、ボルヒールのみを用いた。撮像は 2D-スピンエコー、スライス厚 1 mm で行った。TE=9 ms, TR=100, 300, 500, 1000, 2000 ms で測定を行った。移植後 20 日後に犠牲死させ、ラット大腿筋の切片観察を行った。

②ラット F344 (12 weeks, male) 下肢虚血モデルに対し、 $2 \times 10^7$  個のラベル化細胞 + ボルヒール 100  $\mu$ l を混合し、移植した。移植方法は、シリンジ内でゲルを作成し、切断した血管の痕に沿って、固めたゲルを置き、開口部を縫合した (図 12)。コントロールとして、ボルヒールに生理食塩水を混合したものをを用いた。撮像は 2D-スピンエコー、スライス厚 1 mm で行った。TE=9 ms, TR=1500 ms で測定を行った。移植後 38 日後に犠牲死させ、経過観察を行った。

③ラット F344 (8 weeks, male) 下肢虚血モデルに対し、 $3 \times 10^7$  個のラベル化細胞を移植した。移植方法は、 $1 \times 10^7$  個のラベル化細胞をフィブリン液 50  $\mu$ l に懸濁させ、虚血部筋中にインジェクションした。その後、直ちにトロンビン液 50  $\mu$ l をインジェクションし、筋中でゲル化させた。この操作を切断血管周囲 3 箇所に行った。撮像は 2D-スピンエコー、スラ

イス厚 1 mm で行った。T1 強調: TE=9 ms, TR=1500 ms、プロトン強調: TE=9 ms, TR=3000 ms、T2 強調: TE=30 ms, TR=3000 ms とした。

#### B-7. In vivo における SPIO との比較検討

ラット F344 (8 weeks, male) の大腿部の筋肉に陰性造影剤であるレゾピスト (superparamagnetic iron oxide (SPIO) から成る) と合成した陽性造影剤 PVA-Gd のインジェクションを行った。それぞれ Fe, Gd の濃度が 0.8  $\mu$ mol/50 $\mu$ l PBS に成るように調整し、ラット左右の大腿部に 29G の針を使ってインジェクションを行った。インジェクション後、所定の日数で MRI 撮像を行った。撮像は 2D-スピンエコー、スライス厚 1 mm で行った。T1 強調: TE=9 ms, TR=100, 500, 1500 ms、T2 強調: TE=30 ms, TR=3000 ms とした。

(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. 高分子造影剤のラット間葉系幹細胞に対する評価

細胞移植を考え、実際に用いるラット間葉系幹細胞について検討を行った。ラット間葉系幹細胞に対し、0.001 mg-40 mg / 5 ml の濃度で PVA-Gd を添加し、細胞増殖を wst-1 アッセイにより評価した (図 1)。比較対照としてプロハンス (陽性造影剤) を用いた。プロハンスの場合 (図 1a)、濃度の増加に伴い、細胞の生存率は最大 60% まで減少した。日数が経



過してもこの傾向は変わらなかった。一方、PVA-Gd の場合 (図 1b)、ばらつきは見られたものの、濃度の増加に伴い、生存率は上昇し、200%までなった。

造影剤の細胞障害率を LDH アッセイにより評価した (図 2)。比較対照としてプロハンスを用いた。この結果、プロハンス、PVA-Gd 共に、濃度が増加しても細胞への障害はほとんどないことがわかった。

#### C-2. ラット間葉系幹細胞を用いた高分子造影剤の細胞内導入

ラット間葉系幹細胞内での造影剤の滞在性について検討した (図 3)。時間の経過に関わらず、細胞内に導入されている造影剤の量はほとんど一定であった。また、10 日から 12 日後に見られる蛍光強度のわずかな減少は、ある程度の細胞が死ぬためだと考えられる。これにより、ラット間葉系幹細胞内で造影剤が安定に存在できることがわかった。また、毒性もほとんど見られないことがわかった。

顕微鏡観察により、細胞内滞在性について検討した (図 4)。エレクトロポレーション直後において、ほとんど全ての細胞に造影剤が導入されていることを確認した (図 4a)。得られた細胞の継代を行い、10 日間の観察を行った (図 4b-d)。この結果から、細胞が分裂、増殖していく過程で、細胞内に導入された造影剤は細胞外に漏れ出すことなく、保持された状態であることがわかった。

#### C-3. ラット間葉系幹細胞の分化誘導実験

造影剤を導入したラット間葉系幹細胞内の分化能を検討した。骨芽細胞への分

化誘導を試みた。図 5 に誘導開始から 11 日間の顕微鏡写真を示す。エレクトロポレーション後、蛍光顕微鏡観察によりラット間葉系幹細胞内に造影剤が導入されていることを確認した。その後、培地を骨芽細胞分化誘導培地へと変更した。誘導開始から 2 日目までは細胞の形状に変化はなかった。5 日目から、細胞が凝集する様子が観察でき、日数の経過と共に、細胞が塊状になった。11 日目以降は、細胞塊の数が増加し、21 日目程度で変化が見られなくなった。

アリザリンレッド S は、金属イオンと結合する性質により生体内のカルシウム塩沈着部を染色する。分子生物学分野において、この性質を利用した骨芽細胞の同定がよく行われる。本研究で得られた、造影剤を導入したラット間葉系幹細胞のアリザリンレッド S 染色を行った (図 6)。分化誘導開始直後では、全く染色されなかった細胞が、11 日目では、薄い赤色に染色された。さらに、21 日目では、シャーレ全体が赤く染色された。また、顕微鏡写真より、細胞塊の部分が赤く染色されていた。この結果から、造影剤を導入した細胞でも、分化能力を失うことなく、骨芽細胞への分化誘導が可能であることがわかった。

#### C-4. ラット間葉系幹細胞の MRI 撮像

PVA-Gd でラベル化したラット間葉系幹細胞の *in vitro* で MRI 撮像を行った (図 7)。全ての濃度の条件で細胞数の増加と共に、コントラスト強く見えることが確認できた。また、仕込みの造影剤濃度が高いほどコントラスト強く見えた。更に、この結果から TR は 500-1500 が最も良い条件だといえる。



### C-5. ラット下肢虚血モデルを用いたラット間葉系幹細胞移植実験

①細胞移植モデルでは細胞のコントラストが強く見られた(図 8)。細胞移植直後では、移植部に空気が存在するため、コントラストは低く見えていた。移植後 7 日目までは細胞を確認できた。一方、10 日目になると、高い信号は見られなくなった。コントロールでは、ボルヒール移植によるコントラストの変化は見られなかった。レーザードップラーによる血流測定の結果、細胞移植とコントロールラット共に血流の回復は見られた。しかし、それらの間には差が見られなかった(図 9)。移植後 20 日目の細胞移植ラットは、虚血を作成した足先は黒く変色していた。更に、虚血部の大腿筋は非常に細くなっていた(図 10)。大腿筋の切片の比較により、虚血部では、健常部に比べ、筋線維の中央に核が見られ、筋線維周囲に核の増加が見られた(図 11)。

②ボルヒールゲルを虚血部に置く方法でも、移植直後には細胞を観察することができた(図 13)。細胞移植ラットでは移植細胞のコントラストの増強が見られた。日数の経過と共に、コントラストのある部分が大きくなった。しかし、9 日後から移植部分を囲むように輪郭が見られた。現在ではわかっていないが、今後調べていく必要がある。コントロールラットでは、コントラストに変化はなかった。レーザードップラーによる血流測定の結果、①と同様にばらつきが大きかったが、細胞移植とコントロールに差は見られなかった(図 14)。移植後 38 日で犠牲死させ筋肉の観察を行ったところ、細胞移植ラットでは、コントロールラットに比べて毛細血管が多数存在していた

(図 15)。

③細胞とボルヒールをインジェクションで移植した場合、T1 強調では移植した細胞がコントラスト強く見ることができた(図 16)。このエンハンスは 1 週間程度観察することができた。一方、T2 強調では移植部位に加えて、周辺部位がかなり強くエンハンスされていた。つまり、ゲル化せずに漏れ出したボルヒールが液体で残っていたと考えられる。レーザードップラーの結果、細胞を筋中にインジェクションした場合でも、細胞移植ラットとコントロールにほとんど差は見られなかった(図 17)。

### C-6. In vivo における SPIO との比較検討

陰性造影剤であるレゾピストと本造影剤である PVA-Gd を大腿部の筋肉中にインジェクションした(図 18)。インジェクション直後では、レゾピストでは黒く抜けており、PVA-Gd は白くエンハンスされていた。PVA-Gd は日数の経過に従い薄れていき、最終的には 5 日目でなくなった。一方、レゾピストでは、測定した 10 日目まで存在を確認することができ、それ以降も筋中に残ると考えられた。

### D. 考察

移植細胞を長期間追跡するための MRI 用造影剤を合成してきた。本研究で合成した PVA-Gd の細胞への障害について検討した結果、ほとんど細胞に影響がないことがわかった。また、細胞内で造影剤が保持されることがわかった。実験系では、10 日程度の検討であったが、造影剤の量にほとんど変化がなかったため、数ヶ月単位で細胞内に保持されると考えられる。これは、細胞移植治療に必要な

期間を網羅でき、治療過程における径時変化の検討を可能にする。また、造影剤を導入したラット間葉系幹細胞を用いて骨芽細胞への分化誘導に成功した。つまり、細胞内に内包された造影剤は細胞の分化に影響を与えないことがわかった。これより、骨芽細胞への分化誘導のみでなく、様々な細胞へ誘導できる可能性が示唆され、本研究のシステムを用いて、現在使用されている多種多様な移植細胞への応用展開が期待される。

ボルヒールを用いて、ラベル化したラット間葉系幹細胞の細胞移植を3種類で試みた。いずれの場合でも移植細胞は1週間程度まで、移植部周辺で拡散していることが観察できた。しかし、それ以降になると流動成分が移植部に集積していることがわかった。その結果、流動成分の増加と共に、移植細胞の拡散が促進されている可能性が考えられる。ラットに対してボルヒールを用いて細胞移植を行った場合、移植された細胞の効果として1週間しか有効でない、つまり、細胞移植にとって、移植開始から1週間が最も重要であるといえよう。今後、細胞の有無のみを判断するだけでなく、得られるシグナルから詳細な検討が必要である。血流測定の結果からは、細胞移植による効果は見出せなかった。これは、ラットの虚血に対する回復が非常に早いためだと考えられる。ラットで用いた手法を大動物に適応させることで、細胞移植の効果がわかる。

造影剤水溶液のインジェクションでは、レゾビストは時間が経過しても体内に残存しており、一方、本造影剤 (PVA-Gd) は時間の経過と共に体外へ排出されることが確認できた。この結果より、ラベル

化した移植細胞が死んだ場合、放出された造影剤は速やかに体外へ排出されると考えられる。つまり、生きている細胞のみをMRIで観察できることになる。

## E. 結論

ラット間葉系肝細胞を移植細胞とし、細胞障害率・細胞内安定性・分化能について検討を行った。いずれの結果からも、PVA-Gd は細胞の機能に影響を与えないことがわかった。ラベル化した細胞をボルヒールを用いて下肢虚血モデルラットに対して移植を行い、MRIとレーザードップラーで評価を行った。いずれの場合も移植した細胞は1週間までは観察することができた。しかしながら、レーザードップラーの結果からは、細胞移植による虚血部の回復は認められなかった。今後、大動物への実験へとステップアップさせる。

## 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

[総説]

橋 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

山岡哲二、橋 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

[国際会議]

T. Yamaoka, Y. Tachibana, J. Ennmi, H. Iida, In Vivo Tracking of the Transplanted Cells



Using a Novel Polyric Contrast Agent,  
8th World Biomaterials Congress  
(2008.5.29-6.1, Amsterdam)

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

G-2. 学会発表

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

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

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

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単体と  
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

橘 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

東 晃至、橘 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



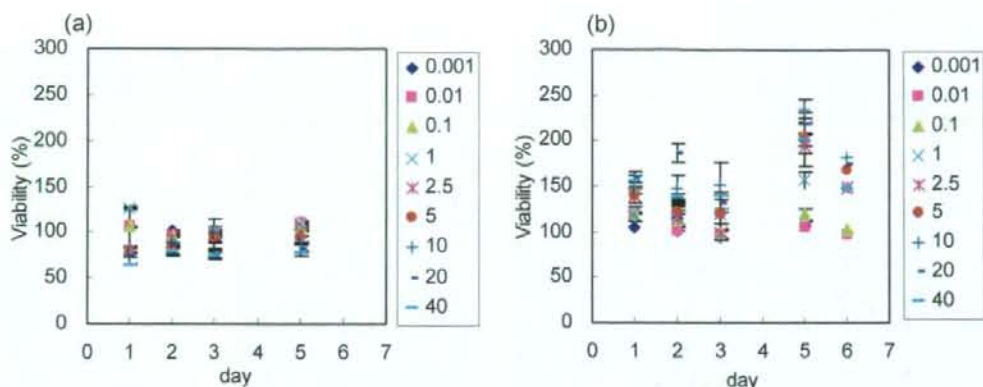


図 1. wst-1 アッセイによる高分子造影剤のラット間葉系幹細胞毒性評価 (a) プロハンス (b) PVA-Gd

プロハンスの場合、濃度の増加に伴い細胞生存率の低下が見られた。一方、PVA-Gd を用いた場合、増加する傾向が見られた。

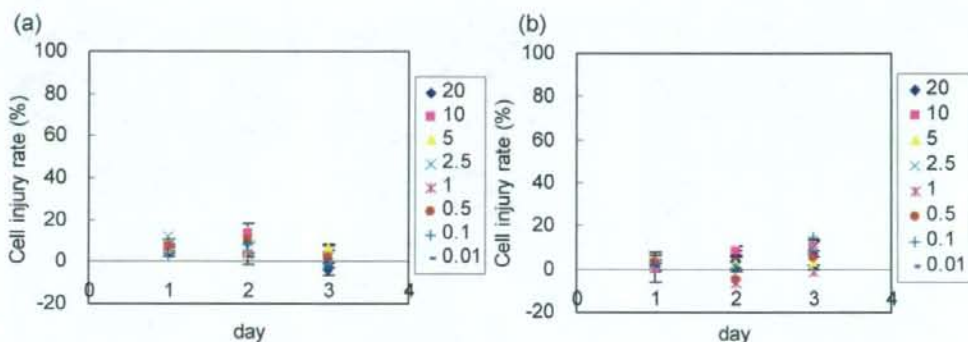


図 2. LDH アッセイを用いた高分子造影剤を内包したラット間葉系幹細胞の細胞傷害率評価 (a) プロハンス (b) PVA-Gd

プロハンス、PVA-Gd 共にラット間葉系幹細胞に対して、細胞障害が低いことがわかった。

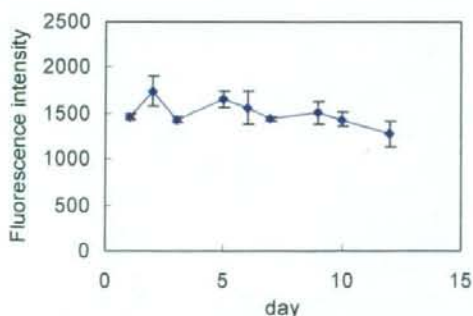


図 3. ラット間葉系幹細胞内に導入された造影剤の時間変化

ラット間葉系幹細胞内で高分子造影剤が安定に存在できることがわかった。また、毒性もほとんど見られないことがわかった。

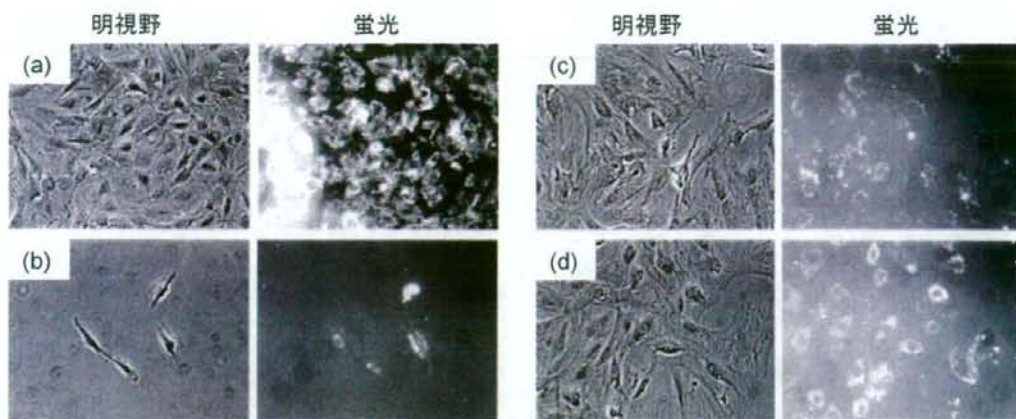


図 4. エレクトロポレーション後、ラット間葉系幹細胞の明視野、蛍光顕微鏡観察 (a) 直後 (b) 継代後 1 日後 (c) 継代後 6 日後 (d) 継代後 10 日後 (左: 明視野画像、右: 蛍光画像) 細胞が分裂、増殖していく過程で、細胞内に導入された造影剤は細胞外に漏れ出すことなく、保持された状態であることがわかった。

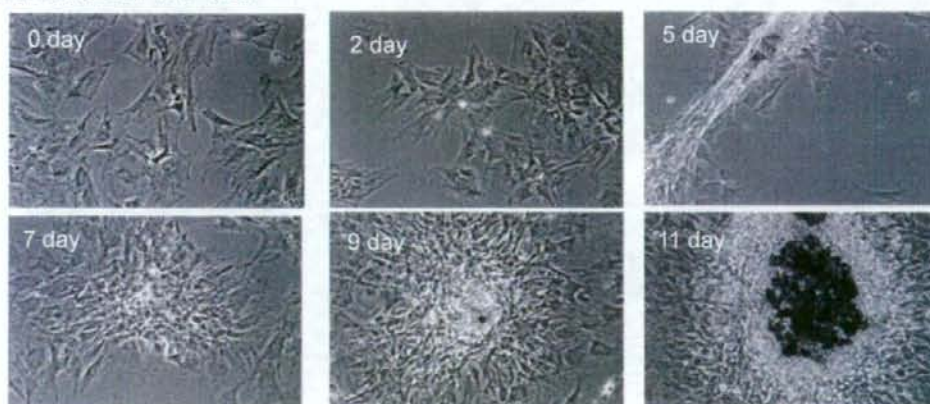


図 5. 造影剤を内包したラット間葉系幹細胞の骨芽細胞への分化誘導 誘導開始から 2 日目までは細胞の形状に変化はなかった。5 日目から、細胞が凝集する様子が観察でき、日数の経過と共に、細胞が塊状になった。



図 6. 造影剤を導入したラット間葉系幹細胞のアリザリンレッド S 染色 (左: 染色したシャーレの全体写真 右: 21 日目のシャーレの顕微鏡写真) アリザリンレッド S で細胞が赤く染色されることから、造影剤を導入した細胞でも、分化能力を失うことなく、骨芽細胞への分化誘導が可能であることがわかった。

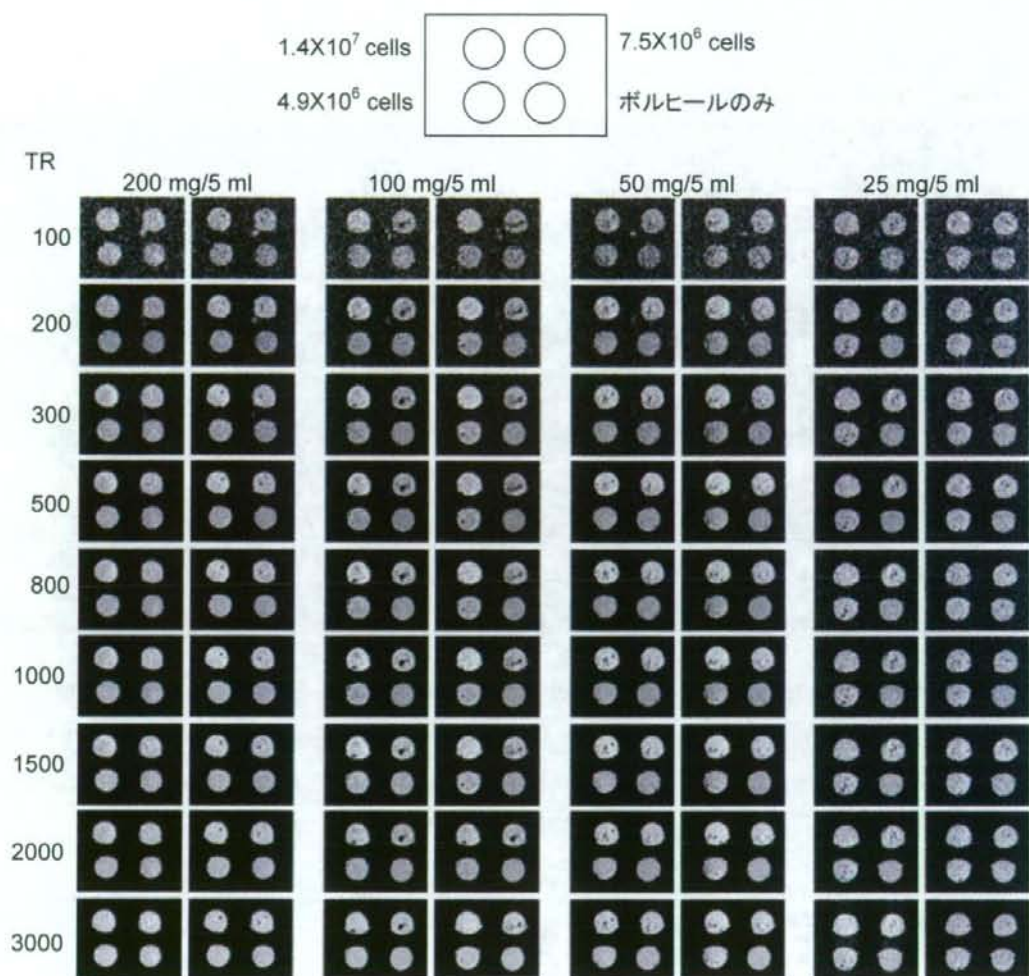


図 7. 造影剤を導入したラット間葉系幹細胞の MRI 撮像。PVA-Gd の濃度を 200, 100, 50, 25 mg/ml とし、エレクトロポレーションを行った後、 $1.4 \times 10^7$ ,  $7.5 \times 10^6$ ,  $4.9 \times 10^6$  個の細胞を集め、ポルヒーール 100  $\mu$ l 内に封入した。撮像は 2D-スピンエコー、スライス厚 1 mm で行った。

造影剤導入時における濃度が高い条件において、コントロールと比較してコントラストの増加が見られた。