

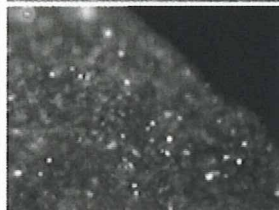
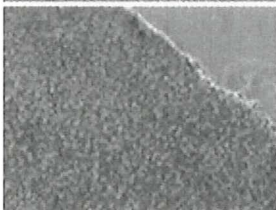
細胞シート(ラベル化)



明視野



蛍光



細胞シート(コントロール)



明視野



蛍光

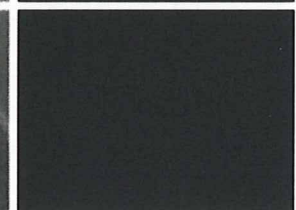
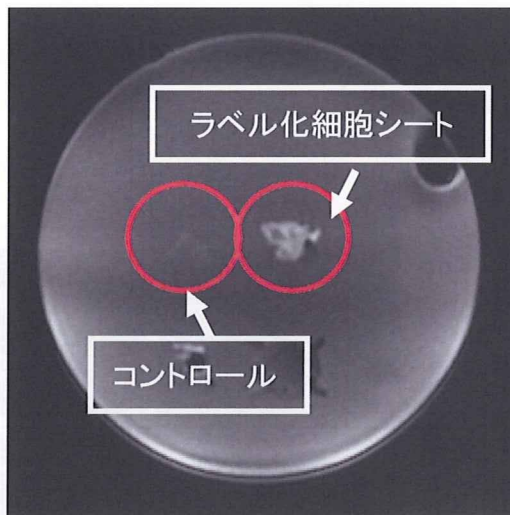


図 3. 細胞シート作成後の顕微鏡写真

細胞シートにした状態でも細胞内に PVA-Gd が存在していることが確認できた

MRI 像



写真

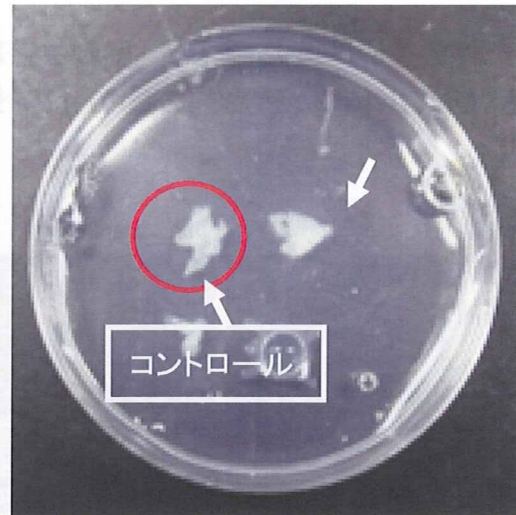


図 4. マーモセット用コイルを用いた細胞の撮像 (左) MRI 像 (右) 写真

ラベル化した細胞のみがMRIで観察できた。MRIを用いた細胞シートの撮像に成功した。

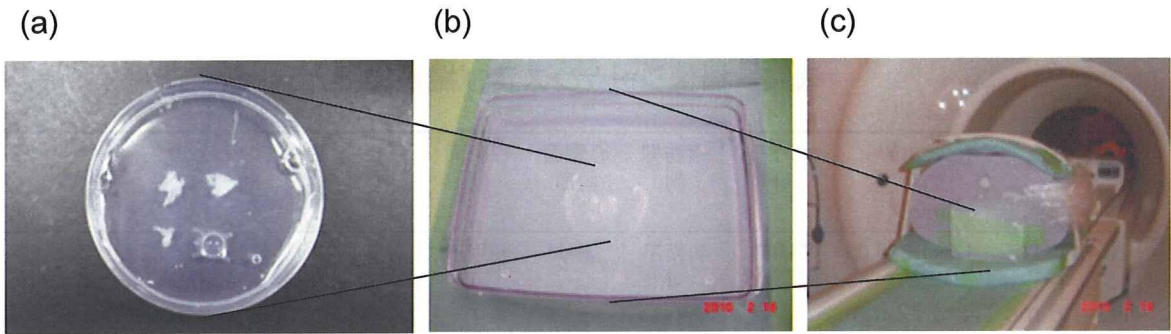


図 5. ブタ用コイルによる細胞シートの撮像 (a) 細胞を封入したシャーレ (b) シャーレを封入したアガロースゲル (c) 3-T MRI にセットした状態

十分なプロトン量を得るために、多量の水をコイル内にセットした。

表 1. 撮像シーケンス及び撮像結果

撮像シーケンス	ボクセルサイズ	息止め	心電図同期	呼吸同期	結果
FIESTA	1.6×1.6×8 mm	○	○	×	×
IR-FGRE	0.6×1.2×8 mm	○	○	×	×
(1) 2D FSPGR	1.0×1.0×1 mm	×	×	×	○
(2) 2D FSPGR	1.0×1.0×1.5 mm	×	○	×	×
(3) 2D FSPGR	1.0×1.0×4 mm	×	○	○	×

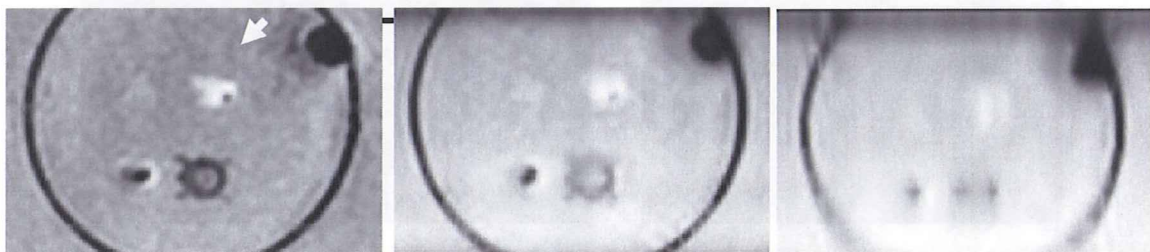


図 6. 各条件における FSPGR シーケンス撮像の結果

ブタ用コイルを使用し、ボクセルサイズ 1×1×1 mm の条件で細胞シートの撮像に成功した

表 2. 撮像シーケンス及び撮像結果

撮像方法	ボクセルサイズ [mm <sup>3</sup> ]	コントラスト	脂肪抑制	心電図同期	呼吸同期	息止め	生体での撮影時間	1枚	3枚	8枚	12枚
① 2D FIESTA (シネ) TE=1.6 ms TR=3.72 ms	1.6×1.6×8.0	T1/T2	利用不可	あり	利用不可	必要	約10秒 (1スライス)	×	×	×	×
② 2D IR-FGRE (遅延造影) TE=3.72 ms TR=7.76 ms	0.6×1.2×8.0	T1	利用不可	あり	利用不可	必要	約20秒 (1スライス)	×	×	×	×
③ 3D FSPGR (高分解能 T1W) (最小サイズ)	0.6×0.6×0.6	T1	あり	あり	利用可能	不要	約45分 (LV全体)	×	△	○	○
④ 3D FSPGR (高分解能 T1W) (最小サイズ) TE=4.53 ms TR=28.49 ms	0.6×0.6×0.6	T1	なし	あり	利用可能	不要	約30分 (LV全体)	×	△	○	○

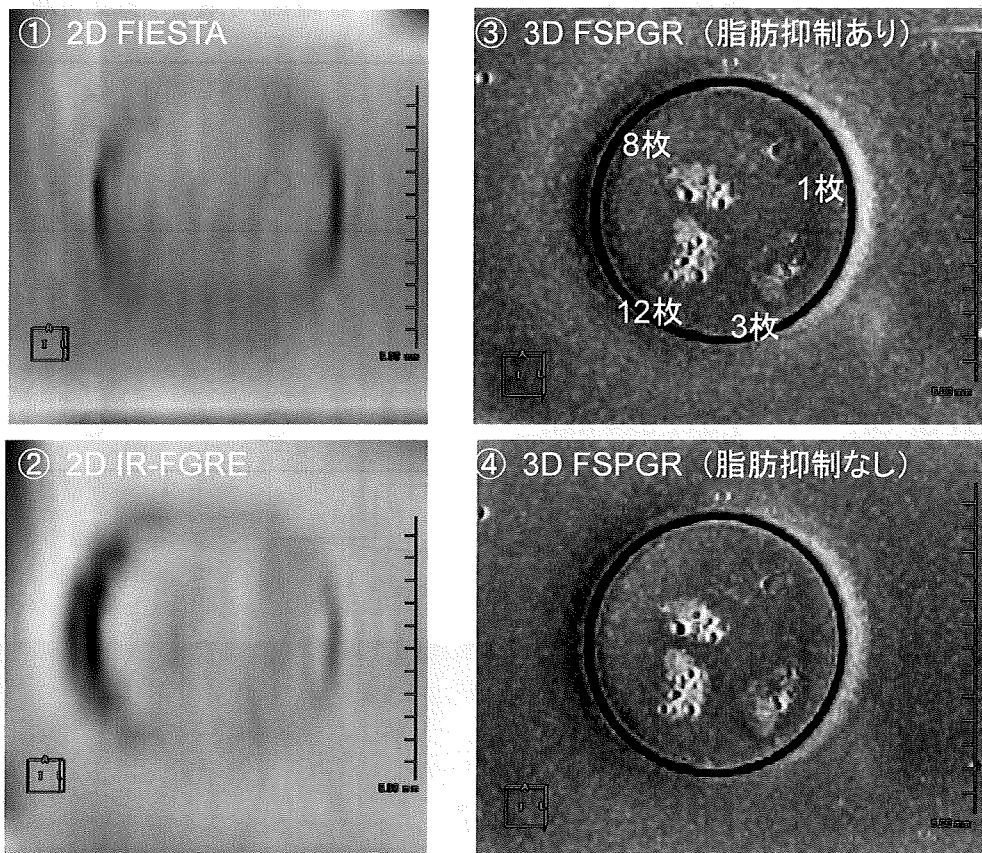


図 7. 各シーケンスを用いた撮像の結果 ① 2D FIESTA ② 2D IR-FGRE  
③ 3D FSPGR (脂肪抑制あり) ④ 3D FSPGR (脂肪抑制なし)

心臓でのラベル化細胞シートの撮影に使用可能な撮像方法は 3D FSPGR であった。

血管内皮前区細胞の血管損傷部位への遊走および増殖を可視化する技術の開発

分担研究者 飯田 秀博

国立循環器病センター研究所・画像診断医学部

研究要旨 血管内皮前区細胞（endothelial progenitor cells: EPCs）の血管損傷部位への遊走およびその後の増殖は血管再生のために非常に重要である。本研究では、移植した EPCs の下肢虚血部位への遊走およびその後の増殖を追跡し、治療との関連を究明した。EPCs の追跡は、本研究グループが独自に開発した造影剤を導入した EPCs を下肢虚血部位へ注入し、EPCs の経時的な変化を磁気共鳴映像法（MRI）により撮影することで実現できた。健常なラットと比べて、下肢虚血ラットでは活発な EPCs の遊走と増殖が確認できた。また、EPCs の遊走と増殖を可視化することに成功し、より明確な評価ができた。この可視化技術は血管再生のメカニズムの解明に有効な手法として期待される。

A. 研究目的

血管内皮前区細胞（endothelial progenitor cells: EPCs）は、成体内の骨髄に多く分布していて、損傷した血管の修復や血管形成などの血管再生治療において有効な生体材料として注目されている。血管再生治療のためには、EPCs の血管損傷部位への遊走、その後の増殖は非常に重要である。血管損傷部位は血管再生を促すために、血管内皮増殖因子（vascular endothelial growth factor: VEGF）やサイトカインなどの促進因子の分泌が活発になり、EPCs の遊走と増殖を誘導する。それによって血管内皮細胞の数を増やし、VE-カドヘリン（vascular endothelial-cadherin）によって内皮細胞同士は接着し、血管が形成される。一方、血管損傷部位は、EPCs の遊

走を阻害するアンジオスタチンと EPCs の増殖を阻害するエンドスタチンなどの血管再生抑制因子の活性を抑える。

EPCs 移植による下肢虚血治療のためには、移植した EPCs の虚血部位への遊走と増殖は欠かせないことである。それで、移植した EPCs の遊走と増殖を可視化する分析ツールの開発は、血管再生のメカニズムを理解することで、大変重要である。

本研究では、移植した EPCs の下肢虚血部位への遊走を追跡し、治療との関連を究明した。EPCs の遊走の追跡は、本研究グループが独自に開発した造影剤を EPCs へ導入し、その EPCs を下肢虚血部位へ注入してから磁気共鳴映像法（MRI）で測定することで実現できた。

B. 研究方法

B-1. 骨髄からの EPCs の単離

EPCs の単離は F344 ラット（4 週齢、♂）を用いて行った。ラットに顆粒球コ

ロニー刺激因子（G-CSF, 200 µg/kg/day, Kirin Pharma, Japan）を 5 日間皮下投与して骨髄由来間葉系幹細胞の流動化を誘導した。その後、大腿骨と頸骨を採取し、

洗い流した。間葉系幹細胞の単離は、抗 CD34 および抗 FLK-1 抗体がコートされた磁気ビーズを用いて行った。単離した細胞はフィブロネクチンコートディッシュに播種し、内皮細胞添加因子セット-2 (EGM-2 singleQuots, Clonetics Lonza, Walkerville, MD, USA) を添加した EBM-2 培地を用いて培養した。

#### B-2. 造影剤の EPCs への導入

2 ヶ月培養した EPCs をセルカウンターでカウンターし、 $5 \times 10^5$  個を 60 mm ディッシュに播種し、24 時間培養した。その後、PBS にて細胞を洗浄し、3 ml の EBM 培地で 30 分間培養した。30 分後、造影剤である Dex-Gd (10 mM) を培地に加え、エレクトロポレーションにより、細胞への導入を行った。エレクトロポレーションの条件は以下の通りである。装置: CUY-21 electroporator (NEPPA GENE, Tokyo, Japan)、電界強度: 300 v/cm、パルス数: 10、パルス持続時間: 5 ms。エレクトロポレーション後、細胞を 1 時間培養してから PBS で洗浄した。新しい培地を添加し、培養した細胞を実験に用いた。

#### B-3. 下肢虚血モデルラット作製

F344 ラット (8 週齢、♂) の左足をイソフルラン (1.5%の酸素) 麻酔下で切開し、大腿動脈、大腿静脈及びその分岐の血管を結紮して切除した。その後、Dex-Gd を有する EPCs ( $6 \times 10^6$ ) を Bolheal<sup>®</sup> の溶液 (化学及血清療法研究所) に分散させ、虚血部に注入した。

MRI 測定は、200 の繰り返し時間 (TR) で各スライドに対して四回行った。

#### B-4. 3 次元画像解析

Dex-Gd を有する EPCs の遊走を MRI で測定し、3D-doctor software (Able Software Co., Massachusetts, USA) を用いて 3 次元画像解析を行った。

(倫理面への配慮)

動物実験に関しては、国際標準基準 Principles of Laboratory Animal Care (National Society for Medical Research)、Guide for the Care and Use of Laboratory Animal (National Institute of Health Publication N0 86-23)、国立循環器病センター研究所実験動物委員会の承認を得て行い、動物愛護にも充分配慮した。

#### C. 研究結果

##### C-1. EPCs の遊走

EPCs の遊走を追跡するために、下肢虚血モデルラットと健常ラットに対して、EPCs の移植を行った。下肢虚血ラットの場合は、14 日間移植 EPCs を観察することが出来た。コントラストが高い部分の追跡結果から、移植した EPCs は、注入した部位から膝方向へ遊走している様子が観察された (図 1A)。

一方、健常ラットへ移植した場合は、EPCs の遊走している様子は確認されず、6 日後にコントラストが高い部分は確認できなかった (図 1B)。

この結果から、虚血部位は、EPCs の遊走と増殖に必要な血管内皮増殖因子やサイトカインなどの促進因子の分泌が活発であることが分かった。

##### C-2. EPCs の遊走の 3 次元画像解析

EPCs の遊走をより明確に評価するために、3 次元再構築ソフトウェアによる画像解析を行った。下肢虚血モデルラットでは、14 日間移植 EPCs の生存が観察できた。また、時間の経過とともに、EPCs は膝方向へ遊走し、6 日以後は膝の付近で高いコントラストが確認できた。また、結果にばらつきはあったものの、EPCs 移植直前 (0 day) に比べて、時間経過とともに、EPCs の増殖の様子が観察できた。

一方、健常ラットの場合は、膝方向へ

の EPCs の遊走は観察できず、時間経過とともに、移植細胞の数は大幅に減少した。(図 2)。

#### D. 考察

前年度実施した研究で、EPCs 移植下肢虚血モデルラット群は EPCs 非移植下肢虚血モデルラット群に比べて、虚血部位への毛細血管の新生・誘導が起ることを確認した。今年度は、そのメカニズムの解明のために、移植した EPCs の虚血部位への遊走と増殖を調べた。また、3次元画像解析により、EPCs の遊走や増殖をより鮮明に可視化することも試みた。

下肢虚血モデルラットからは時間経過に伴い、EPCs の遊走と増殖が観察できた。EPCs は移植した部位から膝方向に向かって遊走した。しかし、健常ラットでは、EPCs の遊走と増殖は確認できず、6 日以後は EPCs がなくなったことが分かった。

これらの結果から、EPCs の遊走や増殖には、血管内皮増殖因子やサイトカインなどの遊走促進因子の分泌が必要であることを示唆する。健常なラットの血管や筋肉では血管内皮増殖因子や遊走促進因子は殆ど確認できない。その結果、正常筋肉では EPCs の遊走や増殖が制限され、毛細血管の新生・誘導は弱くなったと考えられる。

一方、下肢虚血モデルラットでは活発な EPCs の遊走と増殖が確認できた。これは、下肢虚血モデルラットの組織からは、損傷した血管の修復に必要な血管内皮増殖因子や遊走促進因子が大量に分泌されていることを示唆する。

EPCs の遊走と増殖の可視化のために、Dex-Gd を導入した EPCs を下肢虚血モデルラットに移植し、MRI で測定した画像の 3次元分析を行った。EPCs の遊走と増殖を可視化する分析ツールは、血管再生のメカニズムの解明に役立つ有効な

手段になると確信する。

#### E. 結論

Dex-Gd を含んだ EPCs を下肢虚血ラットモデルに注入し、MRI により測定することで、EPCs の遊走と増殖を追跡した。健常なラットと比べて、下肢虚血ラットでは活発な EPCs の遊走と増殖が確認できた。また、EPCs の遊走と増殖を可視化することで、EPCs の遊走と増殖をより明確に評価することができた。この可視化技術は血管再生のメカニズムの解明に有効な手法となると考えられる。

#### F. 健康危険情報

本研究では現在のところ健康に危険を及ぼす可能性はない。

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

- 42) Koshino K, Watabe H, Hasegawa S, Hayashi T, Hatazawa J, Iida H. Development of motion correction technique for cardiac  $^{15}\text{O}$ -water PET study using an optical motion tracking system. *Ann Nucl Med*;24:1-11, 2010
- 43) 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*;2:13-21, 2009
- 44) Kudomi N, Hayashi T, Watabe H, Teramoto N, Piao R, Ose T, Koshino K, Ohta Y, Iida H. A physiological model for recirculation water correction in  $\text{CMRO}_2$  assessment with  $^{15}\text{O}_2$  inhalation PET. *J Cereb Blood*

- Flow Metab.*;29:355-64, 2009
- 45) 銭谷勉, 飯田秀博. 小動物の高解像度 SPECT イメージング. *Isotope News*:7-9, 2009
- 46) Iwanishi K, Watabe H, Hayashi T, Miyake Y, Minato K, Iida H. Influence of residual oxygen-15-labeled carbon monoxide radioactivity on cerebral blood flow and oxygen extraction fraction in a dual-tracer autoradiographic method. *Ann Nucl Med*;23:363-71, 2009
- 47) Ikoma Y, Watabe H, Hayashi T, Miyake Y, Teramoto N, Minato K, Iida H. Quantitative evaluation of changes in binding potential with a simplified reference tissue model and multiple injections of [<sup>11</sup>C]raclopride. *Neuroimage*;47:1639-48, 2009
- 48) Iwanishi K, Watabe H, Fujisaki H, Hayashi T, Miyake Y, Minato K, Naganuma M, Uehara T, Yokota C, Moriwaki H, Kajimoto K, Fukushima K, Minematsu K, Iida H. Evaluation of utility of asymmetric index for count-based oxygen extraction fraction on dual-tracer
- 49) autoradiographic method for chronic unilateral brain infarction. *Ann Nucl Med*;23:533-9, 2009
- 50) Kudomi N, Koivuviita N, Liukko KE, Oikonen VJ, Tolvanen T, Iida H, Tertti R, Metsarinne K, Iozzo P, Nuutila P. Parametric renal blood flow imaging using [<sup>15</sup>O]H<sub>2</sub>O and PET. *Eur J Nucl Med Mol Imaging*;36:683-91, 2009
- 51) Temma T, Iida H, Hayashi T, Teramoto N, Ohta Y, Kudomi N, Watabe H, Saji H, Magata Y. Quantification of Regional Myocardial Oxygen Metabolism in Normal Pigs using Positron Emission Tomography with Injectable <sup>15</sup>O-O<sub>2</sub>. *Eur J Nucl Med Mol Imaging.* ;37:377-85, 2009
- 52) Ikoma Y, Watabe H, Hayashi T, Miyake Y, Teramoto N, Minato K, Iida H. Measurement of Density and Affinity for Dopamine D<sub>2</sub> Receptors by a Single PET Scan with Multiple Injections of [<sup>11</sup>C]raclopride. *J Cereb Blood Flow Metab.* :In Press, 2009
- 54) 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*;2:13-21, 2009
- 55) Kudomi N, Hayashi T, Watabe H, Teramoto N, Piao R, Ose T, Koshino K, Ohta Y, Iida H. A physiological model
- G. 研究発表
1. 論文発表
- 53) Koshino K, Watabe H, Hasegawa S, Hayashi T, Hatazawa J, Iida H. Development of motion correction technique for cardiac <sup>15</sup>O-water PET study using an optical motion tracking system. *Ann Nucl Med*;24:1-11, 2010

- for recirculation water correction in CMRO<sub>2</sub> assessment with <sup>15</sup>O<sub>2</sub> inhalation PET. *J Cereb Blood Flow Metab.*;29:355-64, 2009
- 56) 銭谷勉, 飯田秀博. 小動物の高解像度 SPECT イメージング. *Isotope News*:7-9, 2009
- 57) Iwanishi K, Watabe H, Hayashi T, Miyake Y, Minato K, Iida H. Influence of residual oxygen-15-labeled carbon monoxide radioactivity on cerebral blood flow and oxygen extraction fraction in a dual-tracer autoradiographic method. *Ann Nucl Med*;23:363-71, 2009
- 58) Ikoma Y, Watabe H, Hayashi T, Miyake Y, Teramoto N, Minato K, Iida H. Quantitative evaluation of changes in binding potential with a simplified reference tissue model and multiple injections of [<sup>11</sup>C]raclopride. *Neuroimage*;47:1639-48, 2009
- 59) Iwanishi K, Watabe H, Fujisaki H, Hayashi T, Miyake Y, Minato K, Naganuma M, Uehara T, Yokota C, Moriwaki H, Kajimoto K, Fukushima K, Minematsu K, Iida H. Evaluation of utility of asymmetric index for count-based oxygen extraction fraction on dual-tracer autoradiographic method for chronic unilateral brain infarction. *Ann Nucl Med*;23:533-9, 2009
- 60) Kudomi N, Koivuviita N, Liukko KE, Oikonen VJ, Tolvanen T, Iida H, Tertti R, Metsarinne K, Iozzo P, Nuutila P. Parametric renal blood flow imaging using [<sup>15</sup>O]H<sub>2</sub>O and PET. *Eur J Nucl Med Mol Imaging*;36:683-91, 2009
- 61) Temma T, Iida H, Hayashi T, Teramoto N, Ohta Y, Kudomi N, Watabe H, Saji H, Magata Y. Quantification of Regional Myocardial Oxygen Metabolism in Normal Pigs using Positron Emission Tomography with Injectable <sup>15</sup>O-O<sub>2</sub>. *Eur J Nucl Med Mol Imaging.* ;37:377-85, 2009
- 62) Ikoma Y, Watabe H, Hayashi T, Miyake Y, Teramoto N, Minato K, Iida H. Measurement of Density and Affinity for Dopamine D<sub>2</sub> Receptors by a Single PET Scan with Multiple Injections of [<sup>11</sup>C]raclopride. *J Cereb Blood Flow Metab.*:In Press, 2009
2. 学会発表
- 52) Iida H, Teramoto N, Zeniya T, Watabe H, Koshino K, Ose T. Quantitative regional myocardial blood flow and coronary flow reserve in conscious rats assessed using split-dose 201Tl and a dedicated dynamic Micro-SPECT system ICNC 9. Barcelona, Spain, 2009
- 53) Iida H, Teramoto N, Koshino K, Ose T, Yokoyama T, Zeniya T, Miyagawa S, Sawa Y. A new experimental pig model of myocardial infarction, with high survival rate, showed cardiac remodeling, reduced myocardial vasodilatation and preserved [F-18]-FDG uptake in non-infarcted myocardium ICNC 9. Barcelona, Spain, 2009
- 54) Iida H, Zeniya T, Imabayashi E, Maruno H, Matsuda H, Ishida K,



- Nakazawa M. Three-dimensional realistic brain phantoms containing detailed grey matter and bone structures for nuclear medicine imaging SNM 56th Annual Meeting. Toronto, Canada, 2009
- 55) Iida H, Zeniya T, Maruno H, Imabayashi E, Matsuda H, Ishida K, Nakazawa M, Watabe H, Akamatsu T. Physical Performance Evaluation of Quantitative SPECT Reconstruction Package - QSPECT SNM 56th Annual Meeting. Toronto, Canada, 2009
- 56) Iida H. Three-dimensional realistic brain phantom containing bone and grey matter structures for evaluating PET/SPECT imaging techniques BRAIN09. CHICAGO, 2009
- 57) 飯田秀博. 脳神経核医学画像における部分容積効果の影響と補正のあり方について 第10回日本脳神経核医学研究会 シンポジウム. 旭川市, 2009
- 58) 飯田秀博. 新たな画像診断システム: 脳梗塞治療特区から 第12回日本栓子検出と治療学会大会 シンポジウム 5. 大阪国際会議場, 2009
- 59) Iida H. Ultra-fast CMR02/CBF with 150-PET - As an application of multiple tracer approach Tianjin International Radiology Conference on Medical Imaging Progress. Tianjin, China, 2009
- 60) 飯田秀博. 脳血流量 SPECT 検査の標準化 (司会の言葉) 第49回日本核医学会学術総会. 旭川市, 2009
- H. 知的財産権の出願・登録状況
- 該当無し

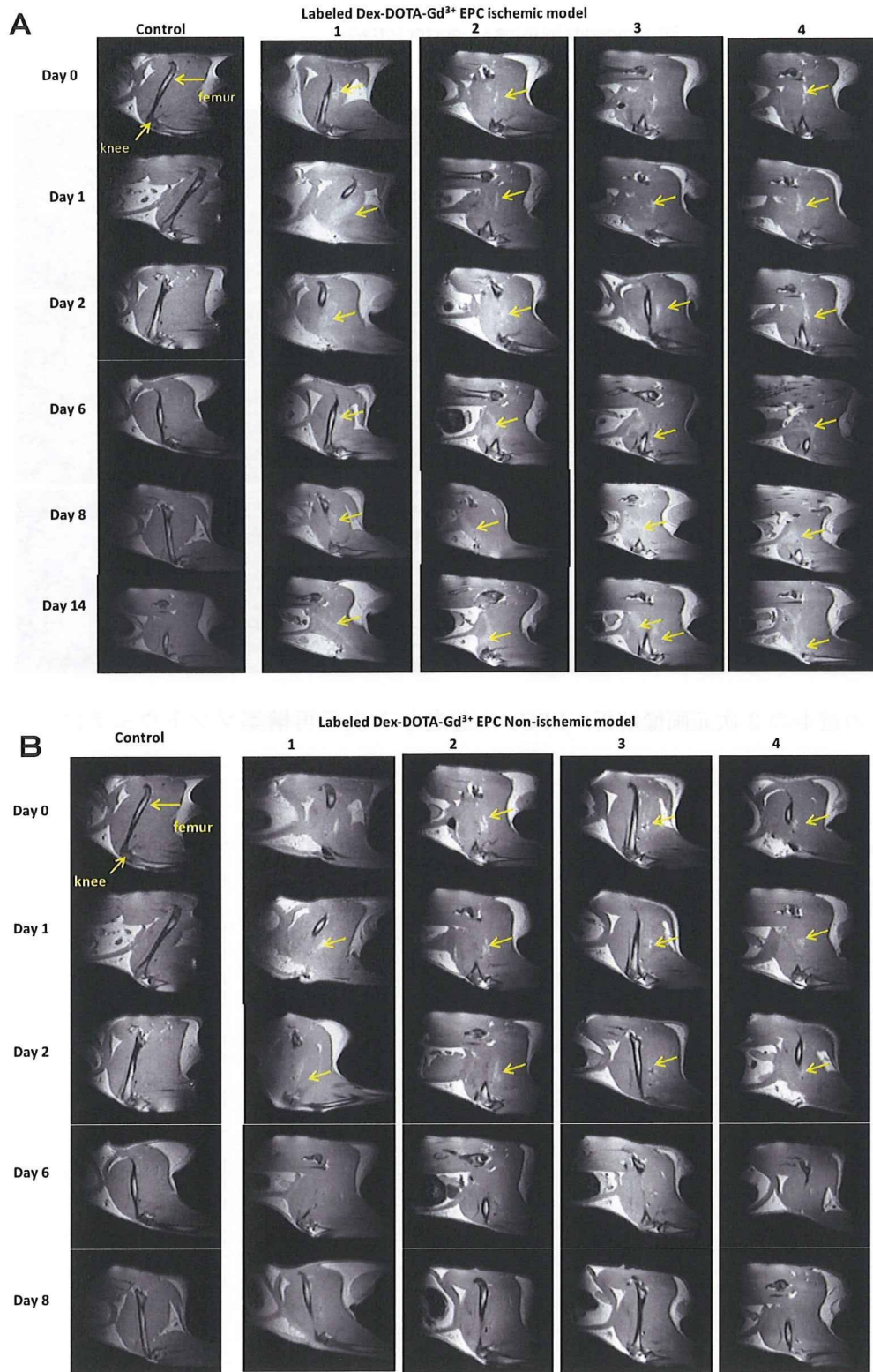


図 1. EPCs の遊走と増殖。EPCs を (A) 健常または (B) 下肢虚血モデルラットへ注入し、EPCs の経時的な変化を MRI により撮影した。画像はラットの腰の垂直断面図である。

3D-Rendering by using 3D-doctor software

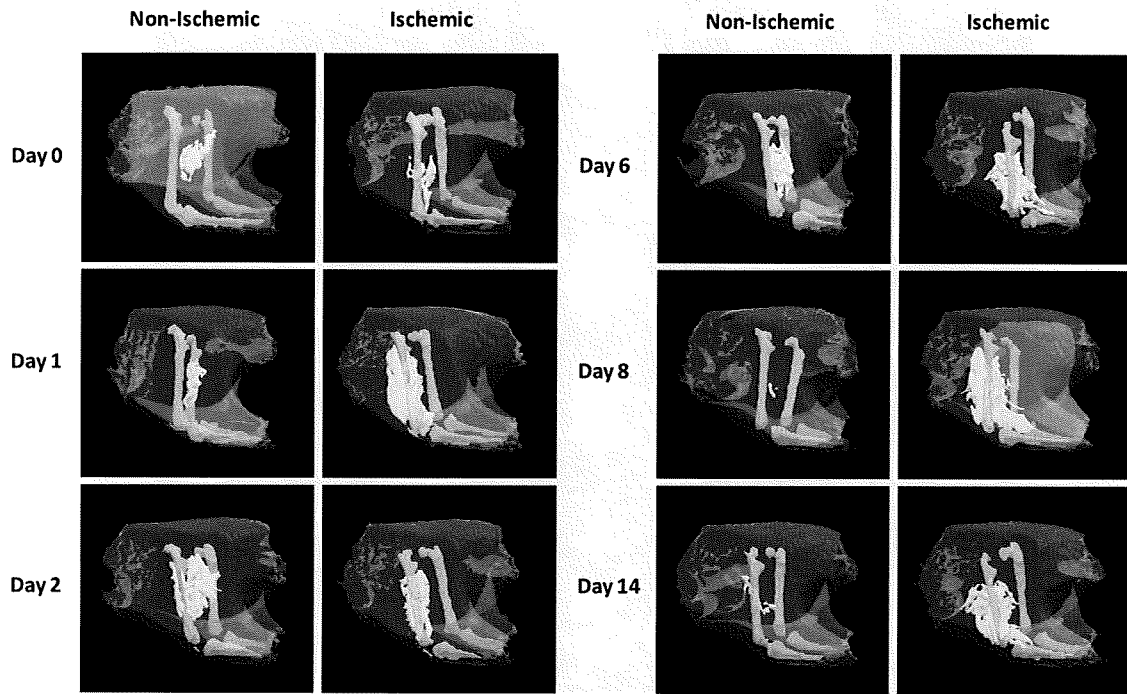
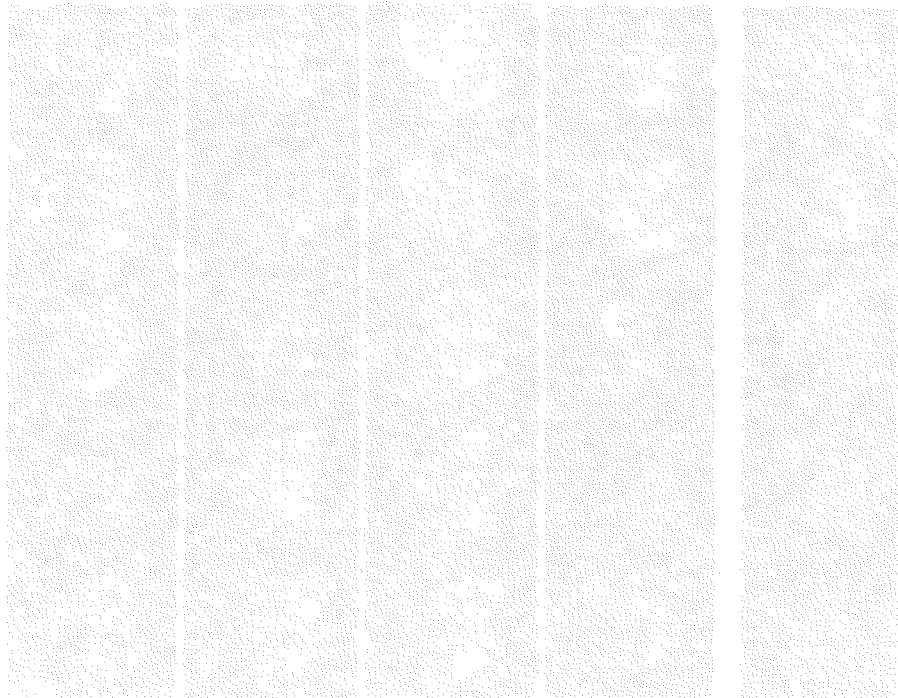


図 2. EPCs の遊走の 3 次元画像解析。EPCs の遊走を 3 次元再構築ソフトウェアにより解析した画像である。



新規造影剤の安全性と臨床応用への可能性を調べるための体外排泄の評価

（分担）研究者 中谷 武嗣

国立循環器研究センター研究所 臓器移植部

研究要旨 磁気共鳴映像法用の造影剤は、体内へ投与後、副作用の軽減のために速やかに排除される必要がある。今回は、新規デキストラン-ガドリニウム（Dex-Gd）造影剤を導入した血管内皮前区細胞（endothelial progenitor cells: EPCs）を移植し、血管再生治療および生体内での挙動を可視化することに成功した。本年度は、新規 Dex-Gd の安全性と臨床応用への可能性を調べるために、Dex-Gd 含有 EPCs を体内へ移植し、糞および尿中の Gd 量を追跡した。糞中の Gd の排泄量は、健常ラットと下肢虚血モデルラットとの間に有意差はなかったが、尿中の Gd の排泄量は、健常ラットよりも下肢虚血モデルラットで有意に高かった。これは、虚血部への Dex-Gd 含有 EPCs の移植後、Gd は比較的速やかに排泄されることを意味する。また、デキストランの分子量が排泄に及ぼす影響を調べた実験では、低分子のデキストランと結合した Gd がより速やかに体外へ排泄されることを確認した。この結果から、デキストランの分子量を変えることで、排泄のスピードをコントロールできると考えられる。

A. 研究目的

常磁性のガドリニウムや鉄などが、MRI 造影剤として幅広く使われている。造影剤は排泄の速度によって、排泄の早い水溶性造影剤と、排泄の遅い油性造影剤に分けられる。体内への注入後、吸収された造影剤は主に尿を通じて体外へ排泄されるが、造影剤の排泄が遅くなると、生体に障害を起す可能性がある。例えば、重篤な腎障害のある患者への使用による腎機能障害や皮膚の腫脹、硬化、疼痛などの副作用が報告されている。

以前、ガドリニウム（Gadolinium, Gd）の排泄を促すために、多糖類の一種である水溶性のデキストラン（Dextran, Dex）を導入した新規ガドリニウム造影剤（Dex-Gd）の合成を報告した。Dex-Gd を導入した血管内皮前区細胞（endothelial progenitor cells: EPCs）を下肢虚血モデルラットに移植し、移植した EPCs の挙動を撮影することにも成功した。本システムは移植細胞の生体内での遊走や増殖を低浸襲的に

追跡可能なものである。

本年度は Dex-Gd の安全性と臨床応用への可能性を検討した。EPCs の体内への移植後、Gd の排泄について調べた。実験方法は、Dex-Gd 含有 EPCs を健常ラットおよび下肢虚血モデルラットへ移植し、経時的な排泄量を測定した。

B. 研究方法

B-1. MRI 造影剤の合成

主鎖高分子は水溶性の性質を持つデキストランを選択し、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てから 1,3-プロパンジアミンを導入した。1,4,7,10-テトラアザシクロドデカノテトラ-酢酸（DOTA）との反応で、デキストラン-diamine-DOTA を合成した。さらに、DOTA に対して 5 倍等量の  $GdCl_3 \cdot 6H_2O$ （Sigma-Aldrich, Tokyo, Japan）を添加して造影剤である Dex-Gd を得た。

デキストランの分子量が排泄に及ぼす影響を調べるために、異なる分子量（15, 40, 70, お

よび 100 KDa) のデキストランを用いて同様の手法で合成を行った。

## B-2. ラット下肢虚血モデル作製

F344 ラット (8 週齢、♂) を日本 SLC より購入し、適切な飼育条件下 (温度: 22°C、湿度: 60%、照明時間: 12 時間点灯と 12 時間消灯) で飼育した。下肢虚血モデルラット作製のために、ラットをイソフルラン (1.5%の酸素) で麻酔し、左足を切開した。大腿動・静脈及びその分岐の血管を結紮して切除することで、下肢虚血モデルラットを作製した。

## B-3. 体内からの Gd の排泄

体内排泄実験は F344 ラット (10 週齢、♂) を用いて行った。Dex-Gd (Gd, 1.2 µg) 含有 EPCs ( $1 \times 10^7$ ) を健常または下肢虚血モデルラットへ移植した。その後、ラットは一匹ずつ代謝ケージ (メタボリックケージ) に入れ、24 時間の尿と糞を採取した。

Gd 分析のために、試料に約 4 ml 程度の硝酸 (69%, pH 1.42) を加え、ゆっくりと温度を上昇させながら 120°C まで加熱して濃縮した。その後、総量 7 ml になるまで 1%硝酸を加えて再度 90°C、30 分程度加熱した。温度を下げた後、15 分間ソニケーションした。最後に 1%硝酸を加えて総量 1 ml にメスアップした。Gd 濃度が高い場合は、10 ml にメスアップした。サンプル中の Gd は誘導結合プラズマ質量分析装置 (ICP-MS) により測定した。

### (倫理面への配慮)

動物実験に関しては、国立循環器病センター 研究所実験動物委員会の承認を得て行った。動物の苦痛の軽減や福祉にも充分配慮した。

## C-1. 体外への Gd の排泄

### C-1-1. 糞中の Gd 測定

健常ラットの場合は、EPCs 移植後、2 日目に高濃度の Gd (約 100 ng) が糞から検出されたが、4 日目からは確認できなかった。一方、下肢虚血モデルラットでは、1 日目に最大の Gd が検出されたが、その後減少し、6 日目には検

出限界以下であった (図 1)。糞中の Gd の排泄量は、下肢虚血モデルラットで少し高かったが、健常ラットと比べて有意差はなかった。

### C-1-2. 尿中の Gd 測定

EPCs 移植した健常ラットの尿からは、1 日から 7 日まで、約 14 から 42 ng の Gd が、下肢虚血モデルラットの尿からは、約 26 から 77 ng の Gd が検出された。8 日目には健常ラットと下肢虚血モデルラットの両方の尿から、Gd は検出限界以下であった (図 2)。健常ラットと比べて、下肢虚血モデルラットから採取した尿中の Gd 量は有意に高かった。

## C-2. デキストランの分子量が排泄に与える影響

デキストランの分子量が尿中排泄に与える影響を調べるために、異なる分子量 (15, 40, 70, および 100 KDa) を有するデキストランを用いて合成を行った。合成した Dex-Gd 含有 EPCs を下肢虚血モデルラット (10 週齢、♂) へ移植し、尿中の Gd 量を測定した。図 3 で示したように、分子量が多ければ多いほど、体内からの排泄量は減少する傾向を見せた。この結果から低分子のデキストランは速やかに体内から排泄されることが分かった。

## D. 考察

今回は、Dex-Gd 含有 EPCs を移植し、その挙動を MRI 測定により可視化することに成功した。このシステムは移植細胞の生体内での遊走や増殖を追跡可能であり、血管再生のメカニズム解明に大きく貢献できると期待される。

本研究では、新規造影剤である Dex-Gd を含んだ EPCs を体内へ移植した後、Gd の体外への排泄を調べることで、Dex-Gd の安全性と臨床応用への可能性を検討した。実験法として、健常ラットと下肢虚血モデルラット、それぞれから採取した糞と尿中の Gd 量を ICP-MS により測定した。糞中の Gd の排泄量は、下肢虚血モデルラットで少し高かったが、有意差はなかった。一方、尿中の Gd の排泄量は、健常ラットよりも下肢虚血モデルラットで顕著に高かつ

た。血管損傷部位は血管再生を促すために、血管内皮増殖因子や遊走促進因子の分泌が活発になり、EPCs の遊走と増殖を誘導する。これらの血管損傷部位の働きが Gd の排泄を促していると考えられる。

また、デキストランの分子量が排泄に及ぼす影響を調べた実験では、分子量が大きければ大きいほど、尿中 Gd 量は減少した。この結果は、高分子のデキストランよりも、低分子のデキストランが速やかに体外へ排泄されることを示唆する。

## E. 結論

造影剤の体外への排泄を追跡するために、Dex-Gd 含有 EPCs を体内へ移植した後、糞および尿中の Gd 量の経時変化を調べた。糞中の Gd の排泄量は、健常ラットと下肢虚血モデルラットとの間に有意差はなかったが、尿中の Gd の排泄量は、健常ラットより下肢虚血モデルラットで有意に高かった。

また、異なる分子量 (15, 40, 70, および 100 KDa) を有する Dex-Gd を EPCs へ導入し、移植した。分子量が大きければ大きいほど、尿中の Gd 量は減少し、低分子のデキストランが速やかに体外へ排泄されることも確認した。

## F. 健康危険情報

本研究では現在のところ健康に危険を及ぼす可能性はない。

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

1. Nakatani T.:Heart Transplantation. Circ J: 73(Suppl A):A-55-A-60, 2009
2. Mano A, Fujita K, Uenomachi K, Kazama K, Katabuchi M, Wada K, Terakawa N, Arai K, Hori Y, Hashimoto S, Nakatani T and Kitamura

S.:Body mass index is a useful predictor of prognosis after left ventricular assist system implantation. J Heart Lung Transplant 28:428-433, 2009

3. 中谷武嗣：心臓移植と待機患者への治療。内科 103:521-525,2009
4. 中谷武嗣:心臓。移植 2009, 44(特別号): S119-S121,2009
5. 中谷武嗣、築瀬正伸、村田欣洋、瀬口理、加藤倫子、戸田宏一、藤田知之、和田恭一、中野一也：わが国における心臓移植でのエベロリムスの現状。今日の移植 22:674-678,2009

### 2. 学会発表

1. Nakatani T: Present Strategy for the treatment of profound heart failure:Long-term support by left ventricular assist systems and heart transplantation. シンポジウム、第 73 回日本循環器学会総会・学術集会、大阪、2009.3.20-22
2. Nakatani T: Heart transplantation in Asia-pacific region -its status and tasks-.ジョイントシンポジウム (コメンテーター), 第 73 回日本循環器学会総会・学術集会、大阪、2009.3.20-22
3. Nakatani T: Heart transplantation and mechanical support in Japan. シンポジウム、17th Asian Pacific Congress of Cardiology, Kyoto, 2009.5.20-23
4. 中谷武嗣、築瀬正伸、村田欣洋、加藤倫子、戸田宏一、藤田知之、和田恭一、中野一也：心臓移植におけるエベロリムスの現状。シンポジウム、Ciclosporin Pharmacology-Clinical Forum 2009、名古屋、2009.8.1

## H. 知的財産権の出願・登録状況

該当無し

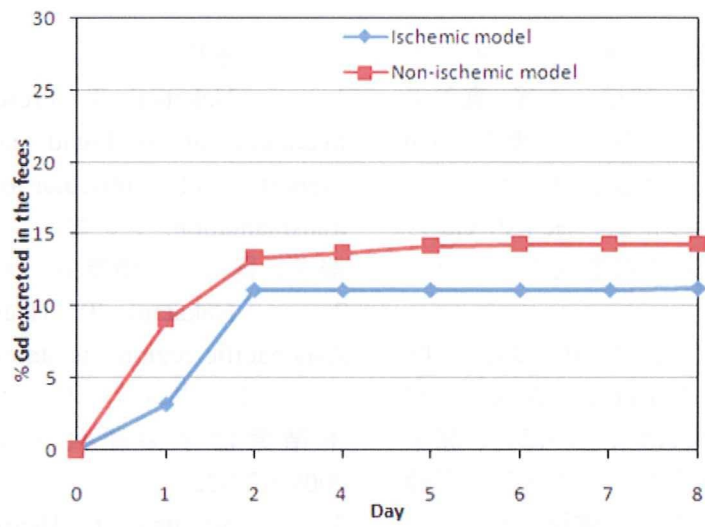
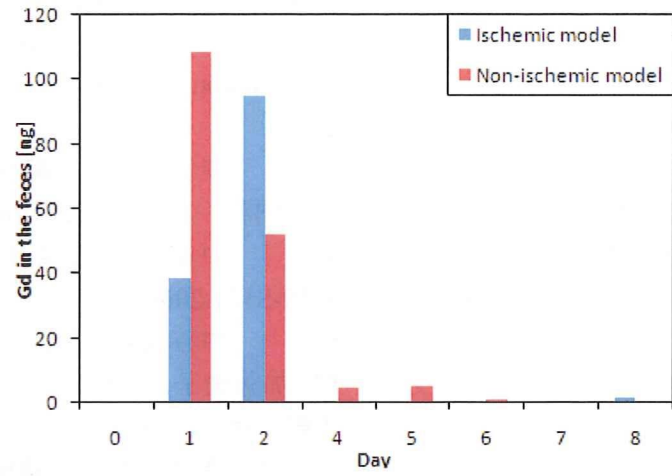


図 1. 糞中の Gd 排泄量。経時変化による糞中の Gd 量（上）と排泄率（下）を表す。

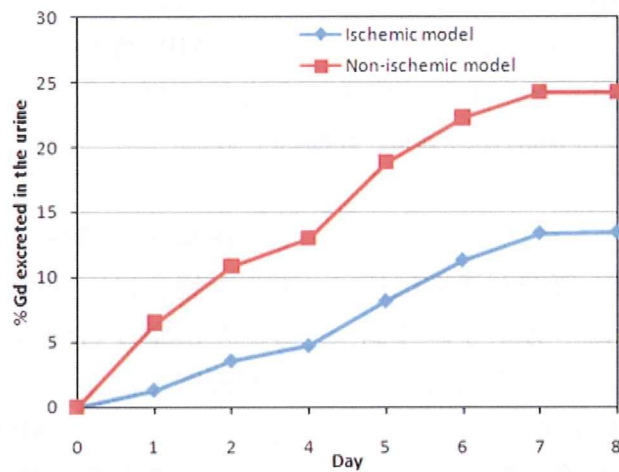
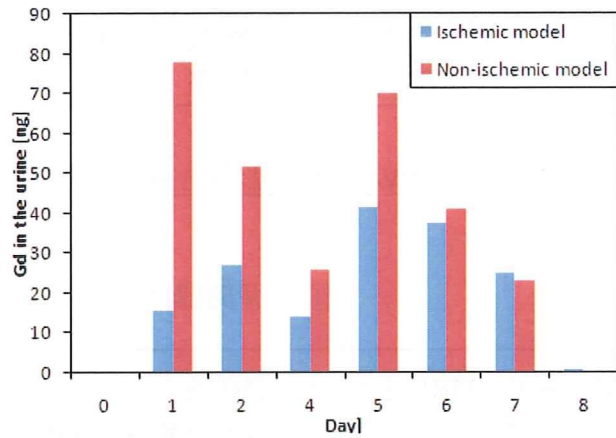


図2. 尿中のGd排泄量。経時変化による糞中のGd量（上）と排泄率（下）を表す。

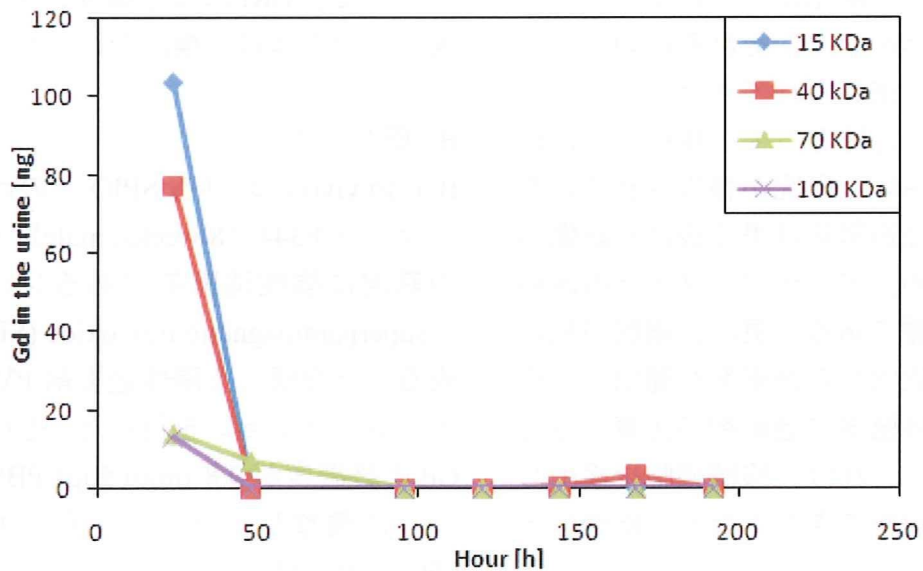


図3. デキストランの分子量が排泄に与える影響。異なるデキストラン分子量(15, 40, 70, および 100 kDa) を含んだ造影剤入りのEPCsを下肢虚血モデルラットへ移植し、尿中のGd量の変化を測定した。



細胞トラッキングのための PVA-Gd 造影剤と鉄製造影剤の比較検討

(分担) 研究者 柿木 佐知朗  
国立循環器病センター研究所 生体工学部

研究要旨 移植細胞の MRI を用いた追跡を行う上で、陽性造影剤 (本プロジェクトで開発したもの) と陰性造影剤 (SPIO) の比較を行い、その問題点について検討を行った。具体的には、それぞれの水溶液をラット大腿部にインジェクトし、MRI 像から、体内での残存について検討した。また、尿中に含まれるガドリニウムの量を定量し、体内からの排出についても検討した。

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、ラット大腿部に PVA-Gd 及びリゾビスト (SPIO) をインジェクションし、造影剤の評価を行った。評価方法として、MRI による撮像、尿中への排泄について詳細に検討を行った。

B. 研究方法

B-1. 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ビスト (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 の終濃度が  $0.8 \mu\text{mol}/50\mu\text{l}$  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、所定の日数において、 $T_1$  強調画像 (TE 9 ms, TR 500 ms)、 $T_2$  強調画像 (TE 20 ms, TR 3 s) の撮像を行った。CNR は  $(\pi/2)^{1/2} |S_1 - S_2| / S_{\text{air}}$  の式を用いて計算を行った ( $S_1$ ,  $S_2$  はそれぞれ

れコントラストのある領域及び空気の領域のシグナル強度を示す)。また、コントラストが見られたボクセル数を全ての画像において算出した。

## B-2. 尿中への造影剤 (PVA-Gd) の排出の評価

造影剤をインジェクションしたラットの尿中に含まれるガドリニウムの量を測定した。インジェクション前に、ラットを代謝ケージに入れ1週間飼育し、ケージに慣れさせた。1週間後、上述のように造影剤のインジェクションを行い、日数ごとに尿を採取した。採取後、それぞれのサンプルに69%硝酸を5ml添加し、90℃で一晩加熱を行った。その後、1%硝酸を4ml添加し90℃で30分加熱を行った。室温にまで放置し、15分間、超音波照射を行った。照射後、1%硝酸を用いて、6mlにメスアップし、遠心分離を行った。上澄み4mlを抜き出し、ICP-MSを用いて、ガドリニウムの含有量の測定を行った。

### (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. In vivo における SPIO との比較検討

細陰性造影剤であるレゾビ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。同様の実験を行った、前年度の結果を図 1 に示す。この結果では、インジェクション直後では、レゾビ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日目ではなくなった。一方、レゾビストでは、測定した10日目まで存在を確認することができた。更に、詳細に検討を行うために、同様の実験を行い、画像から得られる CNR とコントラストを有するボクセル数を算出した (図 2)。この結果、PVA-Gd 溶液をインジェクションした場合、4日後にはコントラストが見られなくなっていたが、SPIO の場合では、インジェクション後から CNR はほぼ一定の値をとり、2週間経過後でもインジェクション部位にコントラストが見られた (図 2a)。また、ボクセル数を計算したところ、PVA-Gd の場合、1日後でコントラストのある部分は25%程度となり、4日後にはほとんど見られなくなっていた。一方、SPIO の場合、1日後では、ボクセル数の上昇が見られた。これは、筋中で造影剤溶液が拡散したためだと考えられる。その後、2週間に亘り、コントラストのあるボクセル数は一定となった (図 2b)。

### C-2. 尿中への造影剤 (PVA-Gd) の排出の評価

尿中に含まれるガドリニウムの測定を ICP-MS を用いて行った (図 3)。この結果、インジェクション後、主に1、2日目にガドリニウムの排泄が認められ、日数の経過と共に減少し、5日目にはほとんど排泄されなくなっていた。また、2週間に亘り、インジェクションにより死亡するラットはなかった。

#### D. 考察

造影剤水溶液のインジェクションを行ったところ、レゾビスト (SPIO) 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。インジェクションしている Gd と Fe の量は同 mol 数に合わせているが、MRI で検出できる感度は異なる。つまり、酸化鉄微粒子 (100 nm 程度) である SPIO は、感度が良く、少量存在するだけで検出することが可能である。そのために、細胞トラッキングの研究分野において、数多く用いられ、報告がなされている。しかしながら、その感度の良さのため、ラベル化した移植細胞が死んだ場合、微量でも組織に沈着すると、MRI のコントラストとして検出する。この場合、移植した細胞を検出しているかが判断ができなくなる。つまり、移植した細胞をトラッキングする目的には SPIO は向いていないと考えられる。一方、PVA-Gd の場合、インジェクションした造影剤は速やかに体外へ排泄されることが示された。この結果より、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

ラット大腿部に PVA-Gd 及びレゾビスト (SPIO) をインジェクションし、造影剤の評価を行った。PVA-Gd では、インジェクション後 5 日目で画像から検出されなくなった。また、ICP-MS の結果からも同様に、5 日にはほとんど体外へ排

出されていることが示された。一方、SPIO では、MRI 画像の結果からインジェクションした造影剤のほとんど全てが体内に残存していることがわかった。これらの結果より、細胞トラッキングを行う上で、本造影剤 (PVA-Gd) が適していることがわかった。

#### 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

##### 1. 論文発表

- 63) 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
- 64) S. Kakinoki and T. Yamaoka. Stable modification of poly(lactic acid) surface with neurite outgrowth-promoting peptides via hydrophobic collagen-like sequence. Acta Biomater. in press, 2009

##### 2. 学会発表

- 61) Sachiro Kakinoki, Tetsuji Yamaoka : Biosynthesis of Thermoresponsive Artificial ECM Composed of Elastin-like Repetitive Sequence (VPGIG)<sub>n</sub> and the Laminin-derived Sequence, 8th International Symposium of Frontiers in Biomedical Polymers, 2009.5.20-23
- 62) 柿木佐知朗、平工香織、山岡哲二：遺伝子工学的手法を用いた神経再生性マトリックスの作製、日本バイオマテリアル学会第4回 関西若手研究発表会, 2009.8.7
- 63) Sachiro Kakinoki, Sho Uchida, Tomo Ehashi,

- Akira Murakami and Tetsuji Yamaoka :  
Peripheral nerve regeneration using PLA  
nanofiber conduit modified with neurite  
outgrowth promoting peptide-oligo (lactic  
acid) conjugates in the rat, 第 46 回ペプチド  
討論会, 北九州, 2009.11.4-6
- 64) Sachiro Kakinoki and Tetsuji Yamaoka :  
Bioactive interface composed of ECM-like  
peptides on PLA scaffolds for nerve  
regeneration, ISBN2009, 2009.11.9-10
- 65) 柿木佐知朗、内田翔、江橋具、村上章、山  
岡哲二: 神経突起伸長活性ペプチド修飾ポ  
リ乳酸ナノファイバークチューブの神経再  
生能評価, 第 47 回日本人工臓器学会大会,  
新潟, 2009.11.12-14
- 66) 柿木佐知朗、山岡哲二: 神経突起伸長活性  
ペプチドによるポリ乳酸表面の機能化,  
第 31 回日本バイオマテリアル学会大会,  
京都, 2009.11.16-17
- 67) 田中聖也・柿木佐知朗・藤里俊哉・山岡哲  
二:  $\beta$  シート形成性インジェクタブルハイ  
ドロゲルの諸条件下でのゲル化挙動, 第  
31 回日本バイオマテリアル学会大会, 京  
都, 2009.11.16-17
- 68) Sachiro Kakinoki and Tetsuji Yamaoka :  
Design of bioactive interface on PLA scaffold  
by ECM-like peptides adsorption, 第 19 回日  
本 MRS 学術シンポジウム, 横浜,  
2009.12.7-9
- H. 知的財産権の出願・登録状況
- 該当無し