

入できる量はほとんど変化がなく、細胞生存率の低下のみを示した。最後に、処理可能な細胞数の検討を行った(図. 3 8 d)。細胞数は $5 \times 10^5$ 個から $3 \times 10^6$ 個まで検討したが、いずれの場合でも導入可能な量、細胞生存率、共に変化が見られなかった。これらの結果より、ミニブタ羊膜由来間葉系幹細胞への PVA-Gd の導入では、マイクロバブル $5 \times 10^6$ 個、出力 $1.5 \text{ W/cm}^2$ 、Duty 比 10 %、照射時間 30 秒を最適条件とした。

### C-21. 細胞シートの 3-T MRI 撮像

細胞シート作成後、蛍光顕微鏡観察を行うことにより、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(図. 4 0)。

次に、マーモセット用コイルを用いて 3-T MRI で撮像を行った(図 4 1)。ラベル化を行った細胞シートは、MRI 像において明確に確認することができた。一方、コントロールであるラベル化していない細胞では、MRI 像において何も見ることができなかった。これより、3-T MRI を用いて細胞シートの撮像に成功したといえる。

臨床へのステップを鑑み、ブタ用のコイルを用いて細胞の撮像を試みた。図 4 2 に撮像に使用したコイル及び状態の写真を示す。6 cm ディッシュのプロトン量では、ブタ用コイルで信号を十分に拾えないために、6 cm ディッシュを十分量のアガロースゲル中に埋入させ、更に、それを水を充填したタンクに貼り付け、プロトン量を得た(図 4 3)。用いた撮像シーケンスは FIESTA (シネ)、

IR-FGRE (遅延造影)、FSPGR (高分解能 T1W) の 3 種類を試みた。まとめたものを表 1 に示す。FIESTA 及び IR-FGRE では、細胞シートは撮像されなかった。一方、FSPGR では、細胞シートを撮像することができた。

更に、細胞シートを重ね合わせることで、細胞シートの厚みに関する検討を行った。細胞シートの枚数は 1, 3, 8, 12 枚とした。撮像シーケンスは上記と同様に行った。結果を表 2、図 4 4 に示す。その結果、撮像可能であったのは、FSPGR のみで会った。また、十分に認識できるのは、細胞シートの厚みが 8 枚程度必要であることがわかった。

以上の結果より、3-T MRI を用い、ブタ用コイルで細胞シートを撮像することが可能であることがわかった。また、今回の結果は、細胞シートを 8 枚程度重ね合わせることで、十分に観察することができることを示唆するものであった。

### C-22. 遊離造影剤の体内動態

①筋肉中に分子量の異なる高分子化 Gd 造影剤をインジェクトした結果を図 4 5 に示した。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。

### C-23. In vivo における SPIO との比較検討

細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 4 6)。インジェクション直後では、レゾピストはネガティブコントラストを、PVA-Gd はポジティブコントラストを与える。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 4 7)。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。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。

### D. 考察

細胞との相互作用が極めて小さい水溶性高分子であるポリビニルアルコール、あるいはデキストランの側鎖水酸基を活性化して、ガドリニウムキレート分子を結合させることで、様々な導入率の高分子化 Gd 造影剤の合成に成功した。これら、高分子化 Gd 造影剤を細胞の培養上清に添加したところ、細胞による取り込み量が極めて小さく、細胞との相互作用が小さいという高分子キャリアー分子の特性を十分に発揮していることが証明された。

これらの高分子化 Gd 造影剤を人工的に標的細胞内に導入する手法として、エレクトロポレーション、ソノポレーション、融合性リポソームなどの検討を進め、エレクトロポレーションが有効な送達手段である一方で、大量の細胞を同時に高濃度化で処理するにはソノポレーションも有効であることが明らかとなった。さらに、樹立細胞株である NIH/3T3 やラット骨髄由来間葉系幹細胞、ラット脂肪由来間葉系幹細胞、ラット骨髄由来血管内皮前駆細胞、ブタ筋芽細胞、ブタ羊膜由来間葉系幹細胞など、さまざまな細胞種に対しても、同様の送達効率、が得られたことから、極めて汎用性の高い細胞ラベル化システムであることが明らかとなった。

FITC ラベルした高分子化 Gd 造影剤をエレクトロポレーションにより細胞内に送達したところ、造影剤分子は、細胞質のみに局在しており、核内への移行は認められなかった。また、いずれの細胞においても、その細胞増殖性には全く影響を与えず、さらに、間葉系幹細胞の

骨細胞への分化能力も正常に維持されていることが明らかとなり、これらの現象は細胞質領域にのみ造影剤が分布することが原因ではないかと考えられる。また、1 か月間以上にわたって、細胞からの有意な漏出は認められず、その減少率から単純に算定すると、約1年間にわたって移植細胞をMRIにより追跡できる性能を有していた。

下肢虚血モデルラットに対するMSCおよびEPCの移植に関して多く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、14日目あたりで、特異的なイベントが起きて消失したようにも見られる。

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。

さらに、標識化EPCsを体内へ移植した後、Gdの体外への排泄を調べた。Gdの排泄量は、健常ラットに比較して下肢虚血モデルラットで顕著に高かった。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。

ミニブタ羊膜由来間葉系幹細胞を用いてソノポレーション法によるGd標識を行い、具体的にブタの心筋梗塞モデルを念頭におき、心臓へ細胞シートを移植した条件で検討を行った。3-TMRIを用いて心臓の撮像を行うことは困難を極める。原因として、心臓が拍動していること、肺が近傍にあるため、アーチファクトが入りやすいことが挙げられる。その中で心臓の撮像が可能であるシーケンスはFIESTA及びIR-FGREであった。共に、心臓の撮像に特化したものであるが、撮像に際して心電図同期、息止めが必要となってくる。この息止めのために、

撮像時間が最大で 10～15 秒までと制限されてしまい、解像度が非常に悪くなった（最小で 0.6×1.2×8.0 mm）。そこで、2D-FSPGR シーケンスでは、心電図同期のオプションを入れた場合のみ、細胞シートを明確に見ることができた。本造影剤により、大動物を用いた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が可能になるのみでなく、移植細胞数を最低限に抑えることにより、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得ることが可能になると期待される。

#### **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。

#### **E. 結論**

開発したシステムは、従来型 SPIO と大きく異なり、生細胞のみを追跡できる優れたものであった。移植細胞のトラッキングにより、細胞の生存期間や虚血部位への遊送などこれまで知られていなかった定量的情報をも解明することに成功した。

本システムの完成により細胞移植療法治療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。

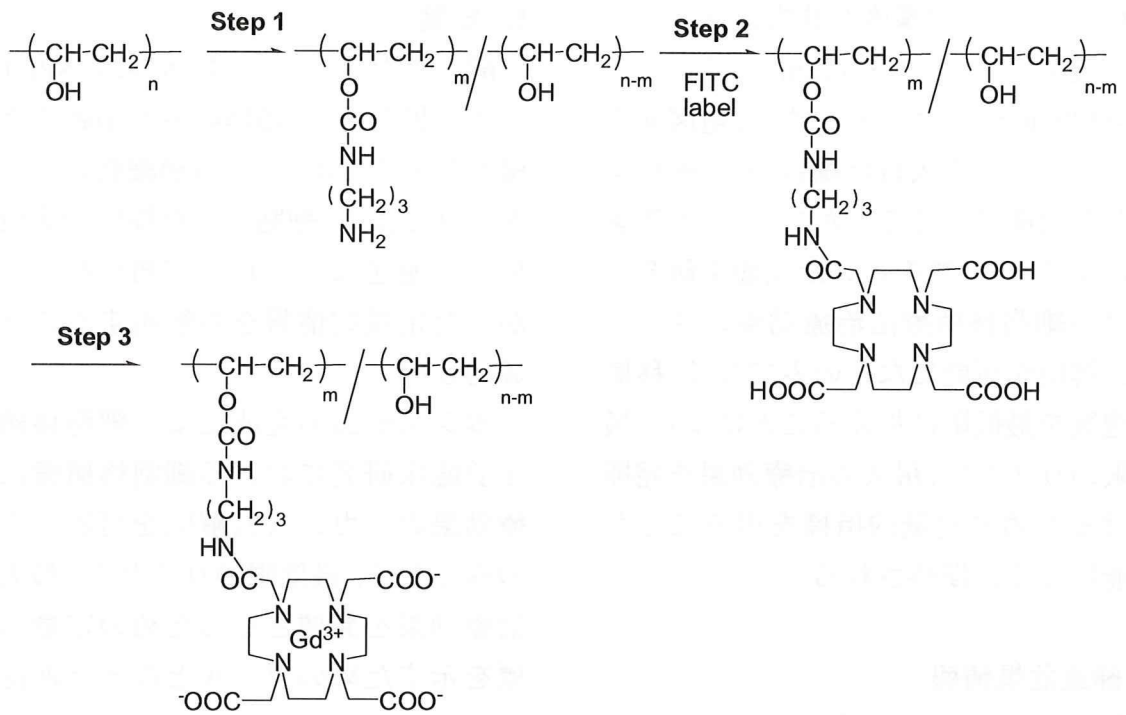


図 1. 高分子造影剤の合成

ポリビニルアルコールを主鎖とし、側鎖にガドリニウムキレートをもつ高分子造影剤を合成した。

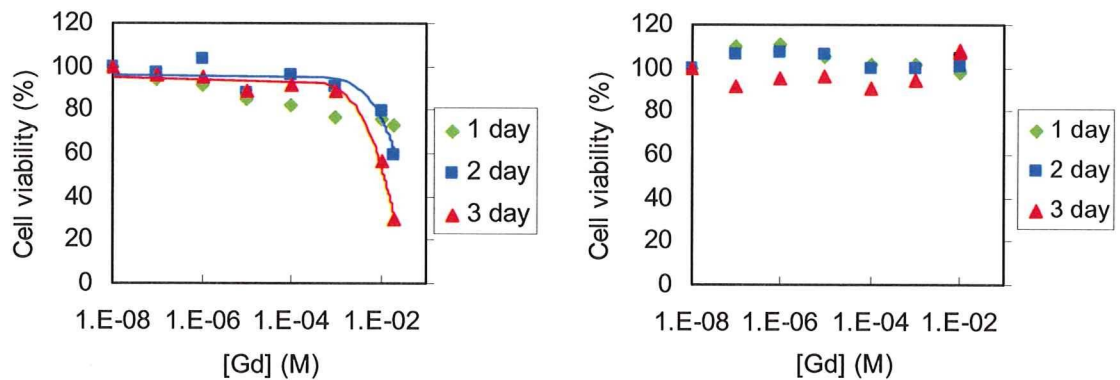


図 2. 造影剤の細胞毒性試験 (a) マグネビスト (b) PVA-DOTA-Gd

市販の造影剤であるマグネビストは、濃度が高い条件で細胞毒性が見られた。本研究で合成した造影剤は同条件でも細胞毒性は見られなかった。

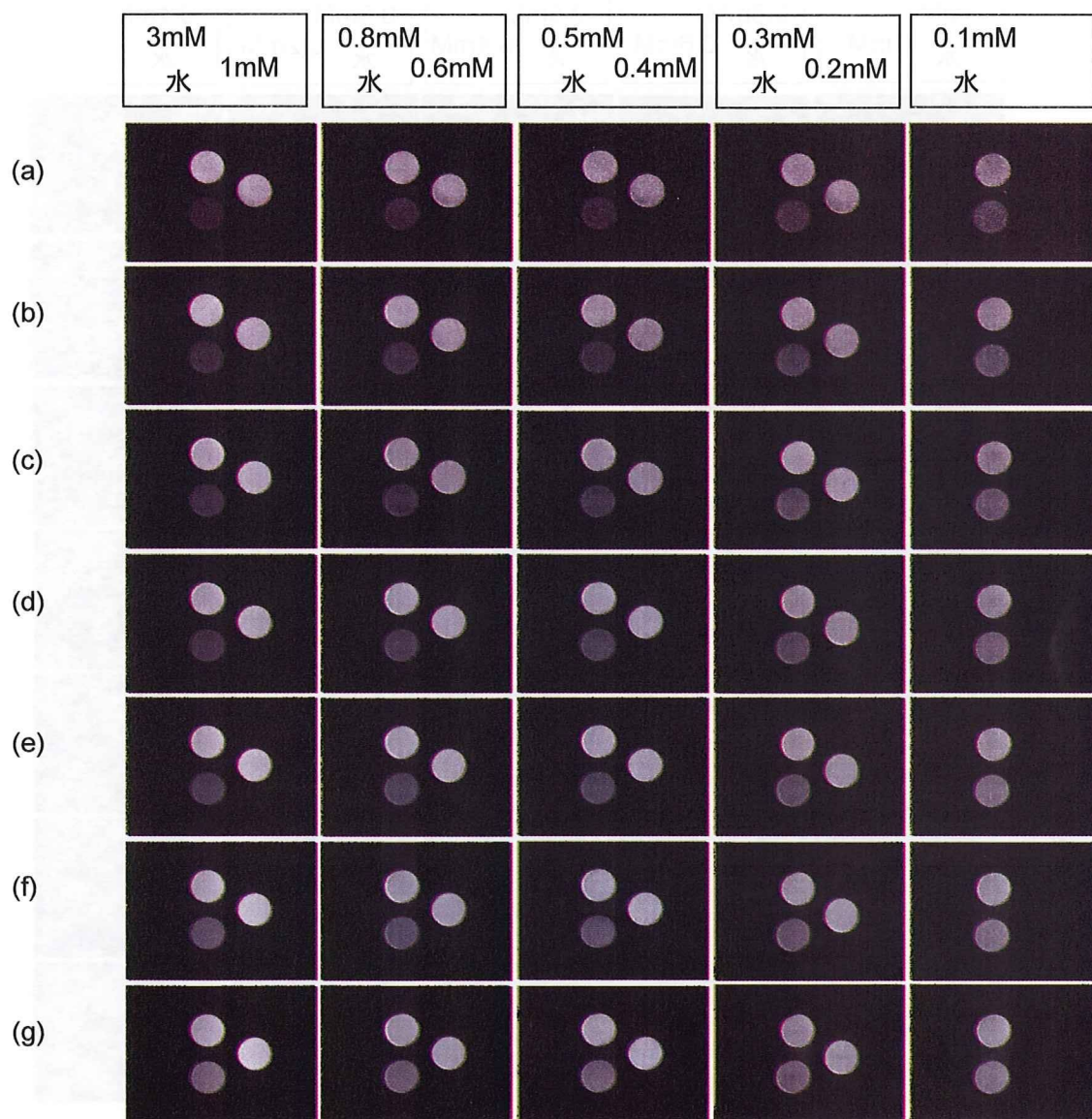


図 3. 造影剤水溶液の濃度及びTRを変化させ撮像したT1強調画像(濃度は0.1 mMから3.0 mMまで変化させた) (a) TR=100 (b) TR=200 (c) TR=500 (d) TR=800 (e) TR=1000 (f) TR=2000 (g) TR=3000

造影剤濃度の増加により、コントロール(水)と比較してコントラストの上昇が見られた。

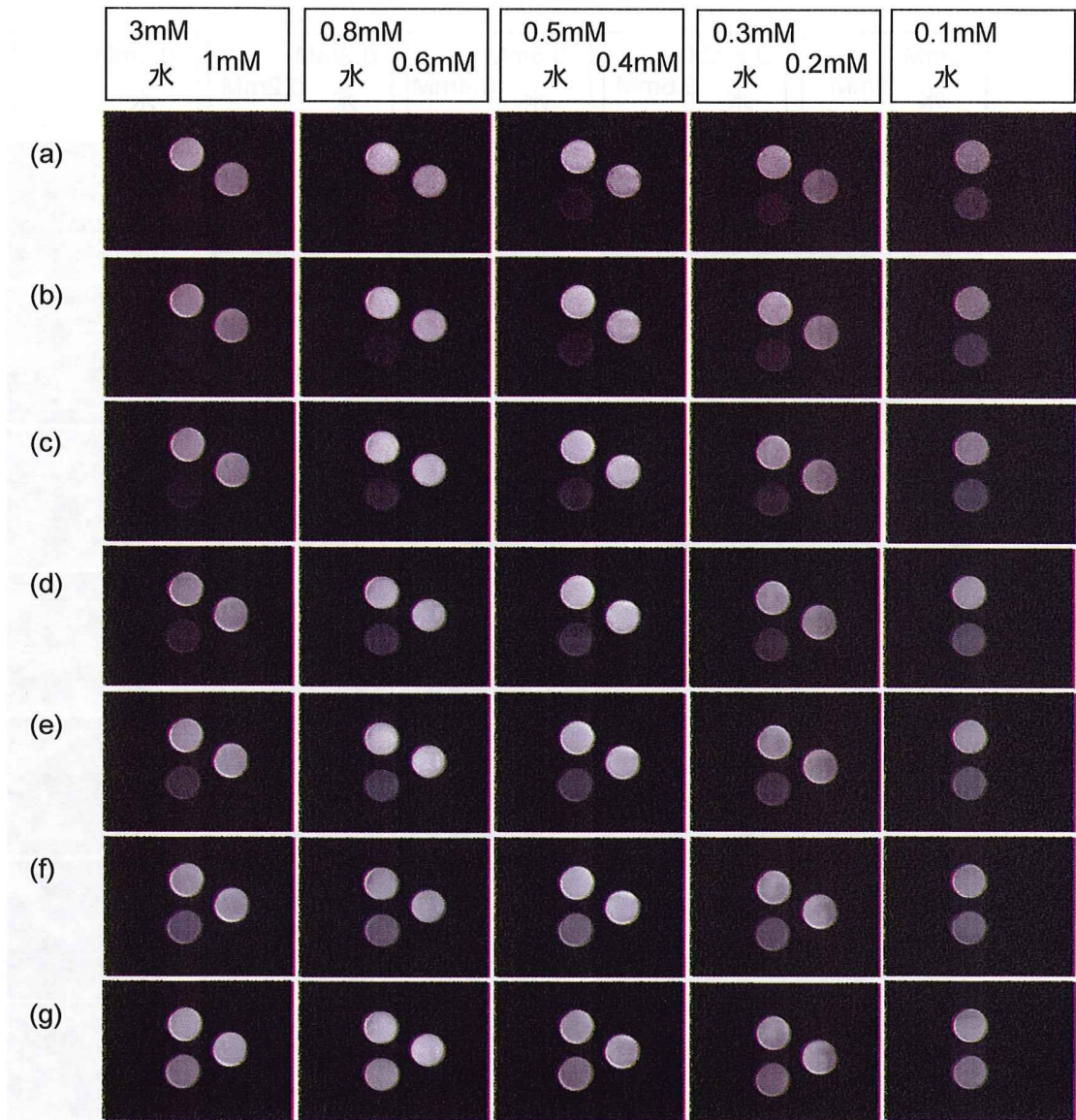


図 4. 造影剤水溶液の濃度を変化させゲルを作成し、得られたゲルを様々なTRで撮像したT1強調画像（濃度は0.1 mMから3.0 mMまで変化させた）(a) TR=100 (b) TR=200 (c) TR=500 (d) TR=800 (e) TR=1000 (f) TR=2000 (g) TR=3000

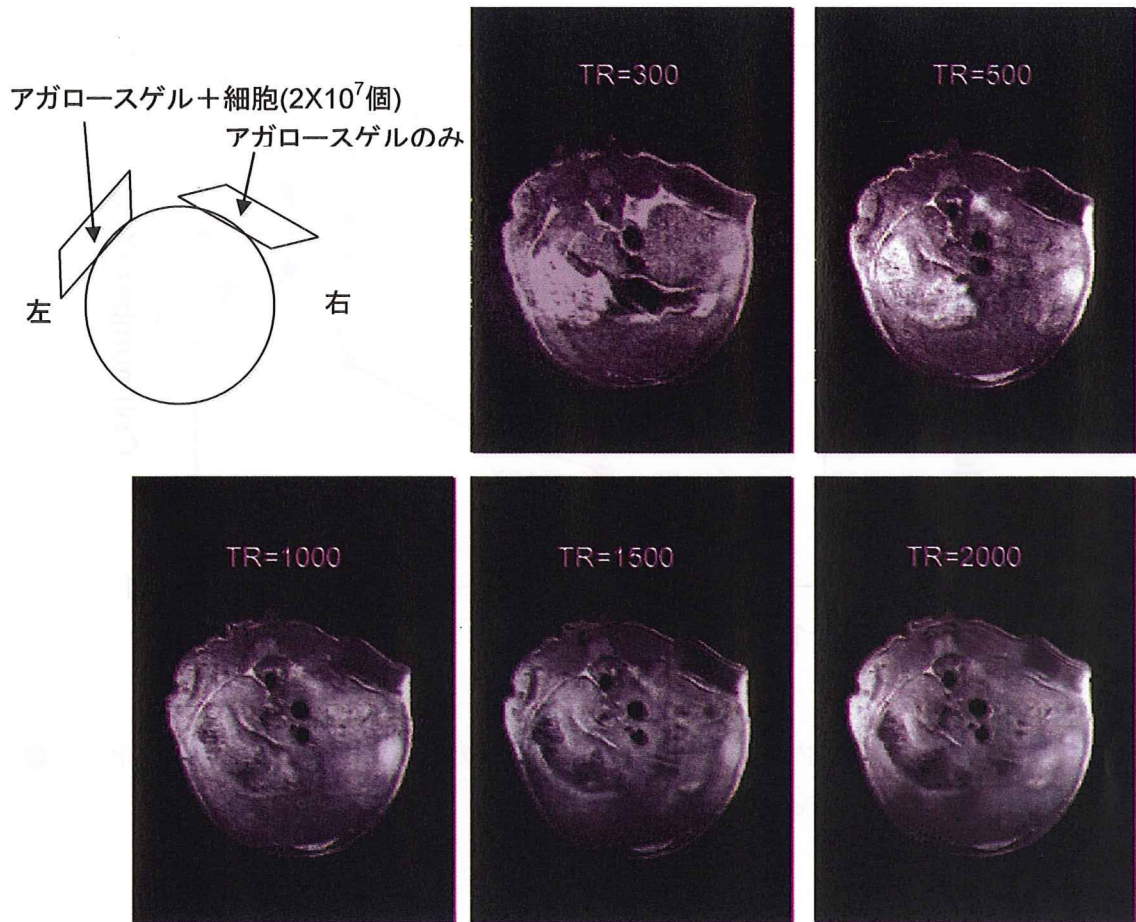


図 5. 細胞のin vivo撮像

造影剤を導入した細胞をアガロースゲル中に内包し、マウスの皮下へ移植した。コントロールとして、アガロースゲルのみを用いた。コントロールと比較して、細胞が存在するところで、コントラストの上昇が見られた。

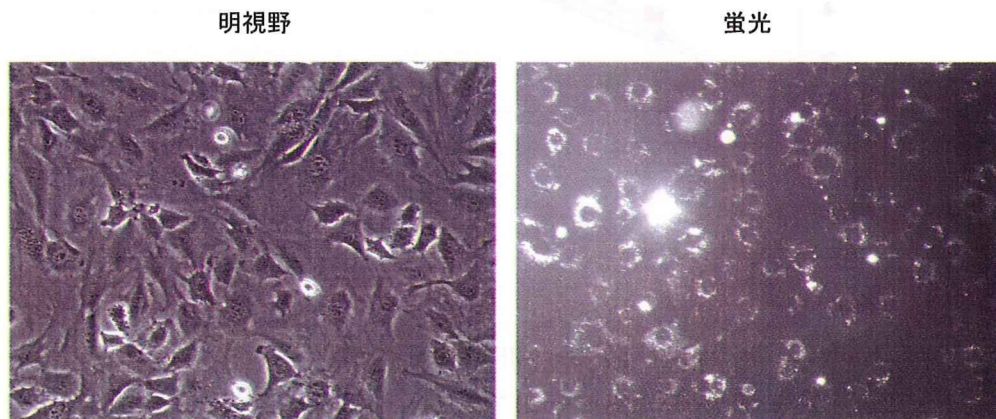


図 6. エレクトロポレーション後、NIH-3T3 細胞の明視野、蛍光顕微鏡観察



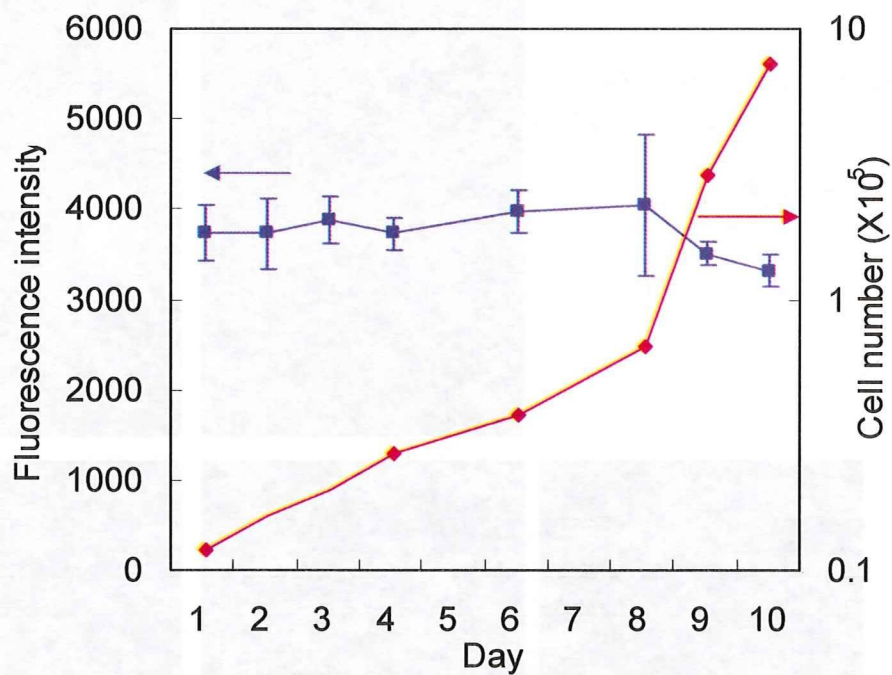


図 7. 全ての細胞内に導入されている造影剤の量および細胞数の経時変化 (■) 蛍光強度 (◆) 細胞数

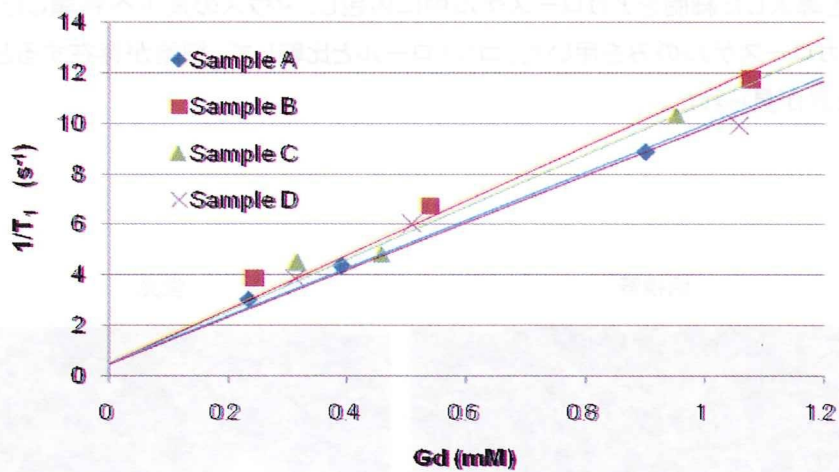


図 8. NMR による T1 測定  
造影剤の緩和度 ( $R_1$ ) はおよそ 10 であった。高い緩和能を有していることが分かった。

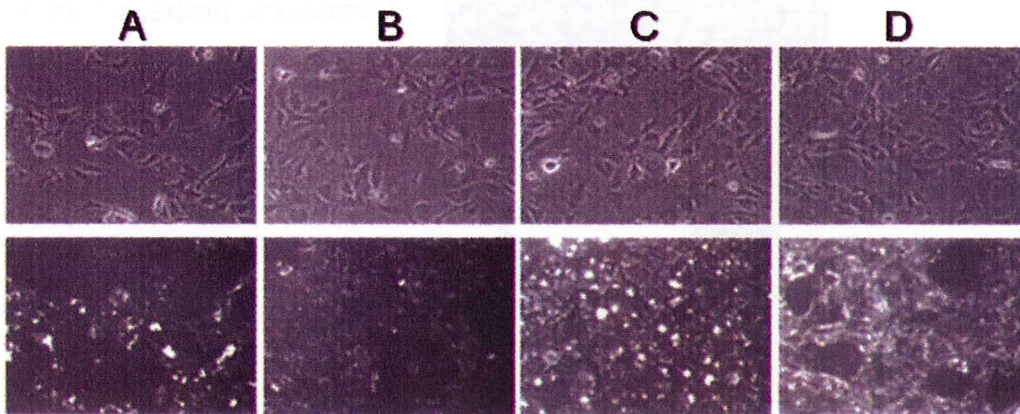


図 9. サンプル A-D を用いたエレクトロポレーション後の細胞の様子  
細胞質内に安定して導入することができた。

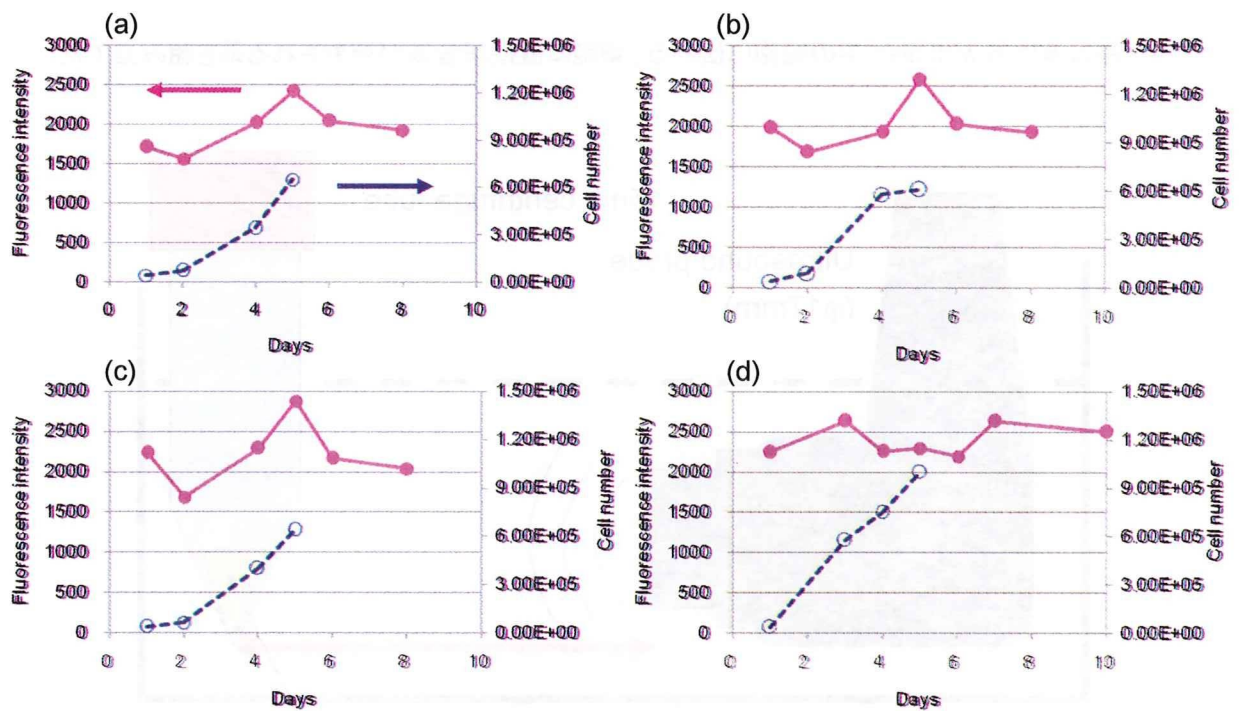


図 10. サンプル A-D の細胞内滞在性  
分子量に寄らず安定して細胞質内に滞在していることが分かった。

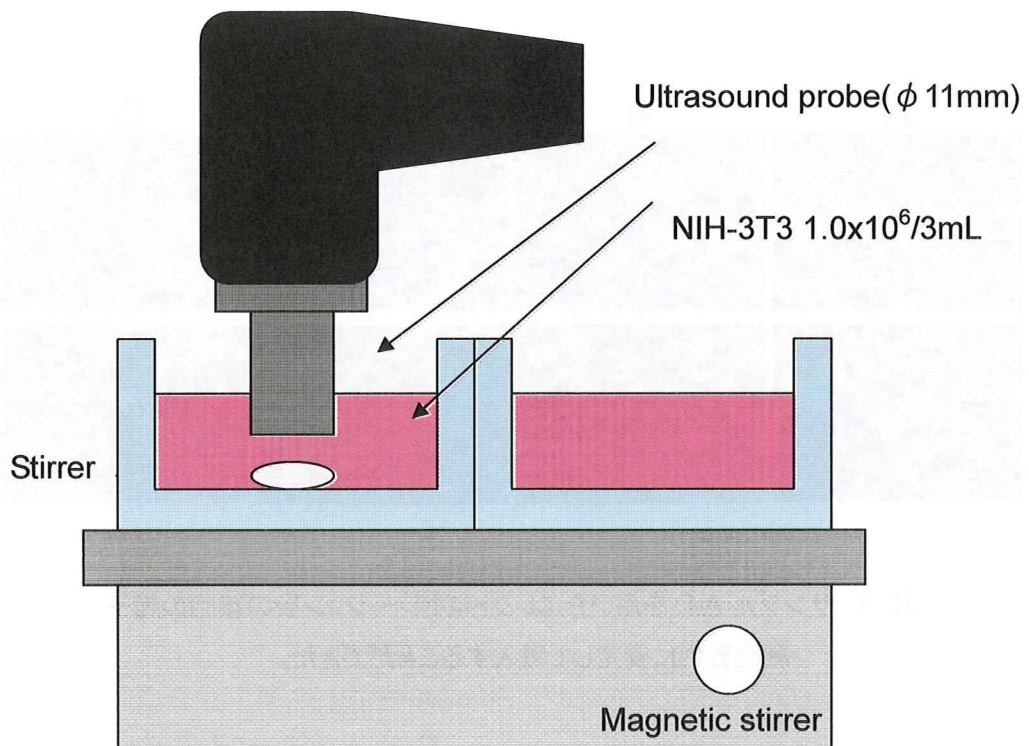


図 11. 直接系ソノポレーションの実験

超音波は 6 well dish 中の細胞に伝わる。細胞に直接超音波が照射される系を組み立てた。

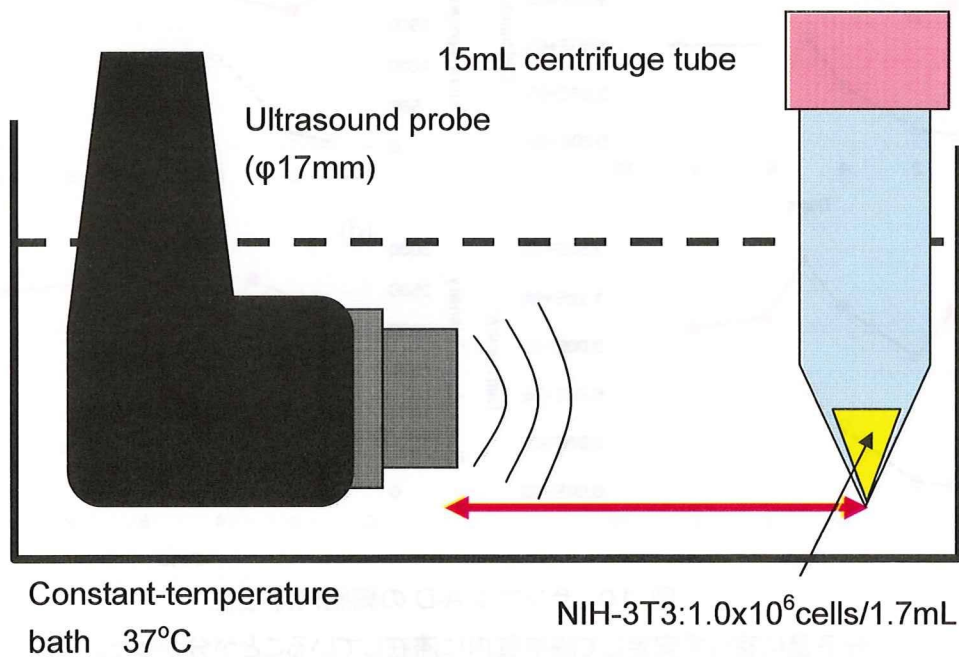


図 12. 間接系ソノポレーションの実験系

超音波は恒温槽の水中から遠沈管中の細胞に伝わる。細胞に直接超音波は当たらない、間接的に接触する系を組み立てた。

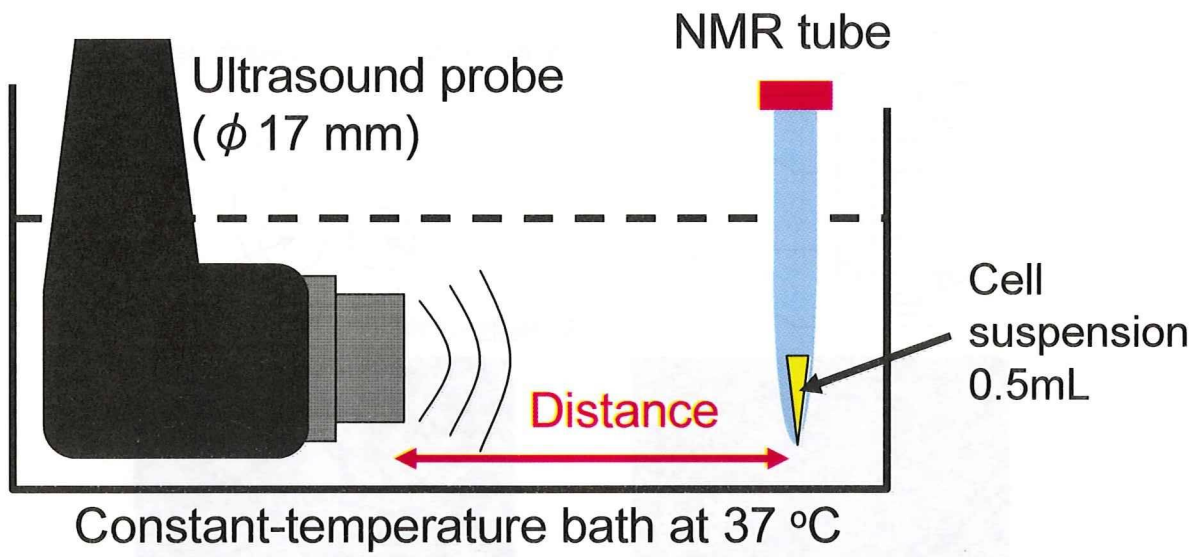


図 13. 高濃度系でのソノポレーションの方法

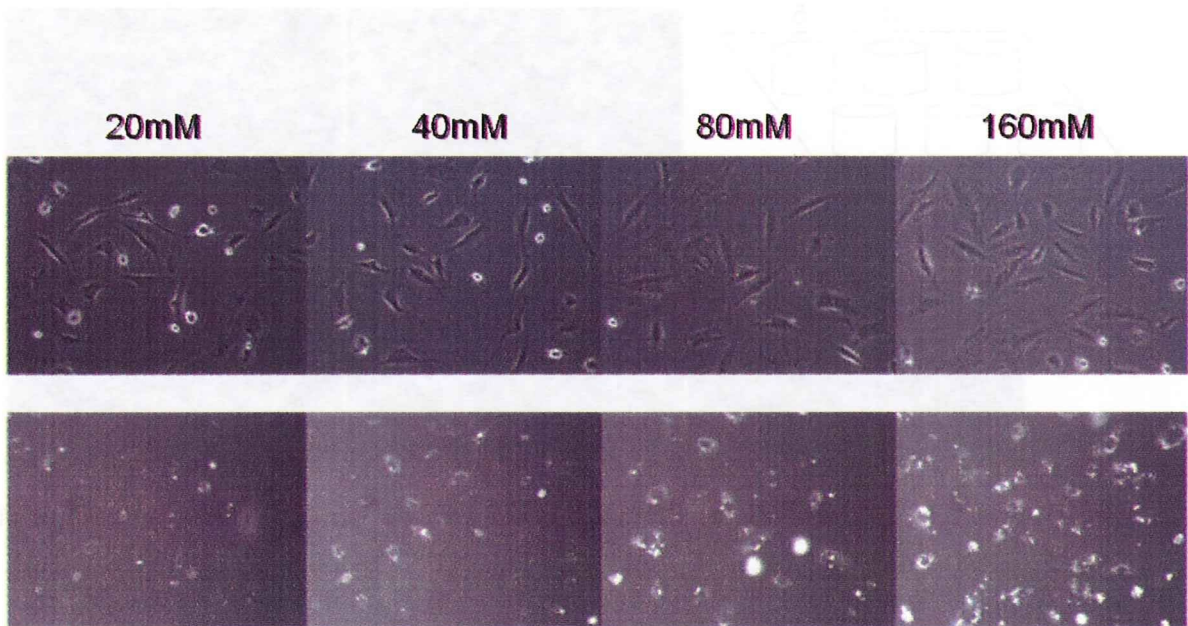


図 14. 高濃度ソノポレーション後の細胞の様子

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。

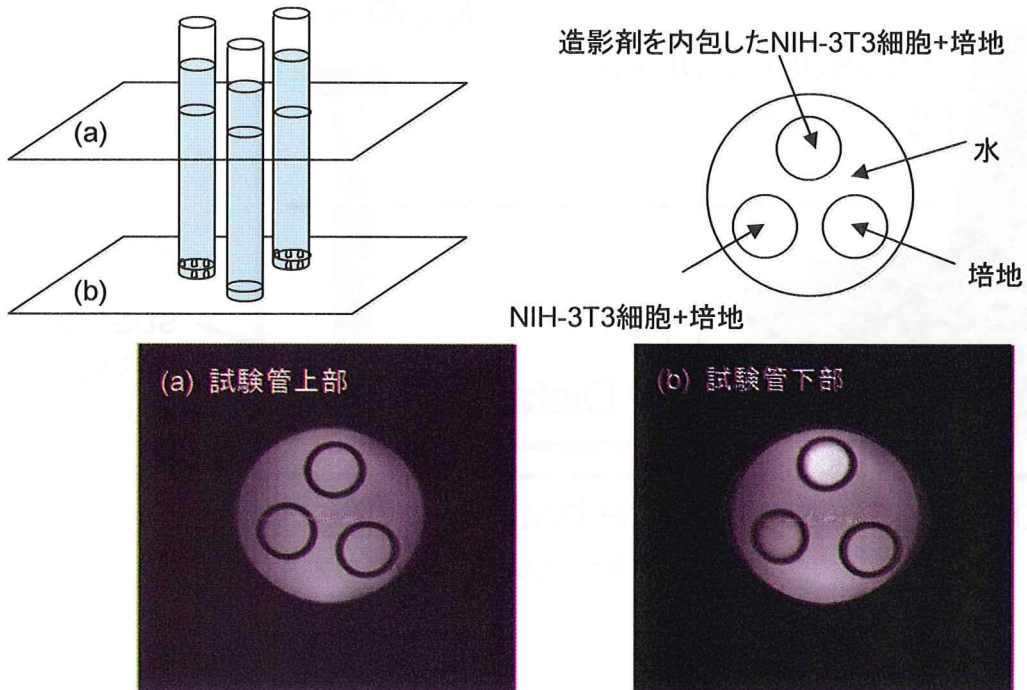


図 15. MRIを用いた細胞の撮

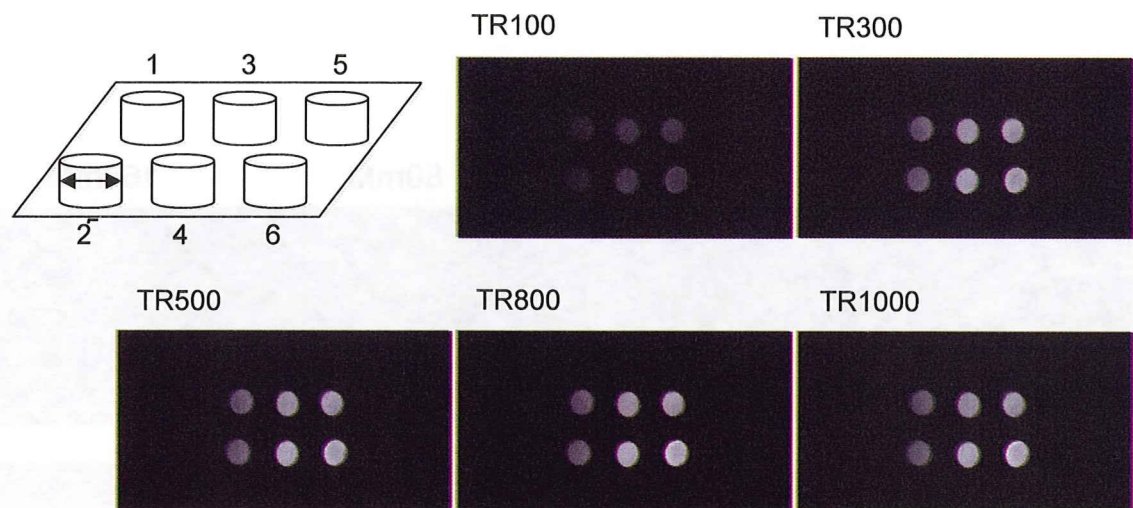


図 16. 細胞数を変化させ撮像したT1強調画像 (1. 2 wt%アガロースゲル(100 $\mu$ l), 2.  $1 \times 10^6$ 個+Gel (100 $\mu$ l), 3.  $5 \times 10^6$ 個+Gel (100 $\mu$ l), 4.  $7.5 \times 10^6$ 個+Gel (100 $\mu$ l), 5.  $1 \times 10^7$ 個+Gel (100 $\mu$ l), 6.  $2 \times 10^7$ 個+Gel (100 $\mu$ l))

異なる細胞数をアガロースゲルに内包させ、MRI撮像を行った。。細胞数の増加と共に、コントラストがはっきりと見られた。

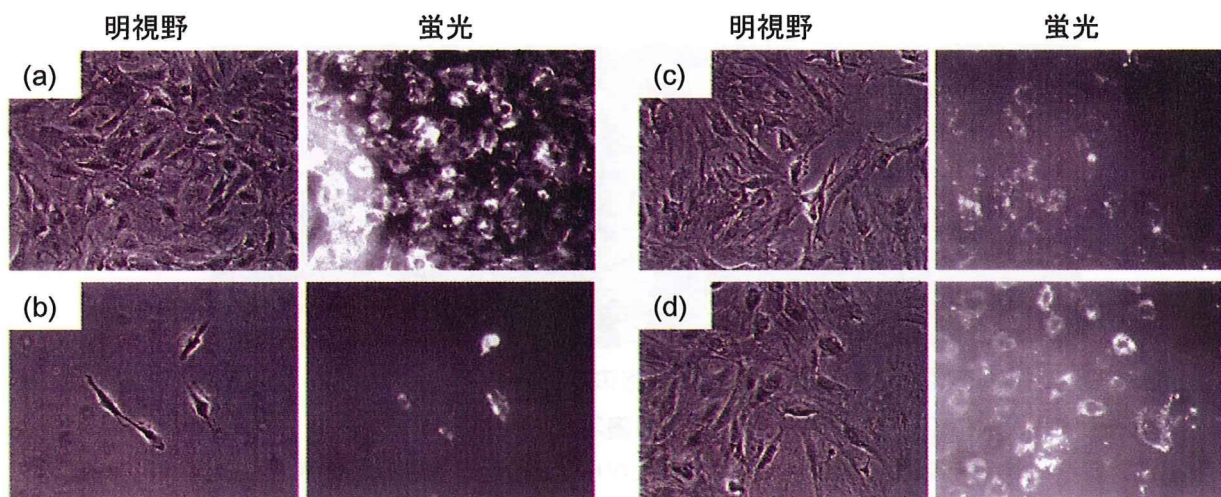


図 17. エレクトロポレーション後、ラット間葉系幹細胞の明視野、蛍光顕微鏡観察 (a) 直後 (b) 継代後 1 日後 (c) 継代後 6 日後 (d) 継代後 10 日後 (左: 明視野画像、右: 蛍光画像) 細胞が分裂、増殖していく過程で、細胞内に導入された造影剤は細胞外に漏れ出すことなく、保持された状態であることがわかった。

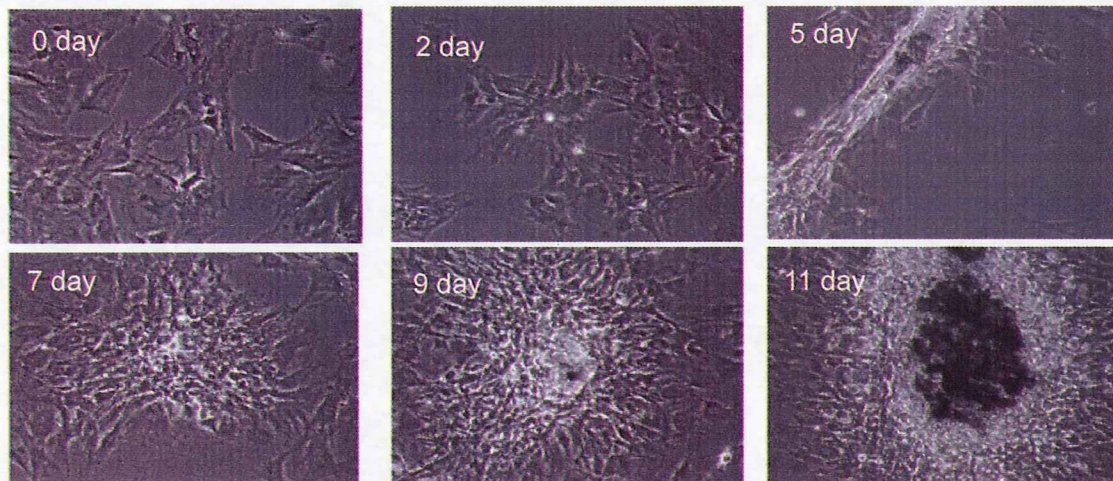


図 18. 造影剤を内包したラット間葉系幹細胞の骨芽細胞への分化誘導 誘導開始から 2 日目までは細胞の形状に変化はなかった。5 日目から、細胞が凝集する様子が観察でき、日数の経過と共に、細胞が塊状になった。

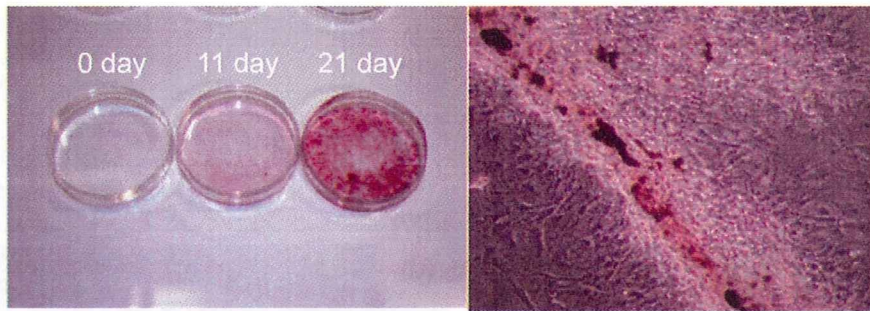


図 19. 造影剤を導入したラット間葉系幹細胞のアリザリンレッド S 染色 (左: 染色したシャーレの全体写真 右: 21 日目のシャーレの顕微鏡写真)  
 アリザリンレッド S で細胞が赤く染色されることから、造影剤を導入した細胞でも、分化能力を失うことなく、骨芽細胞への分化誘導が可能であることがわかった。

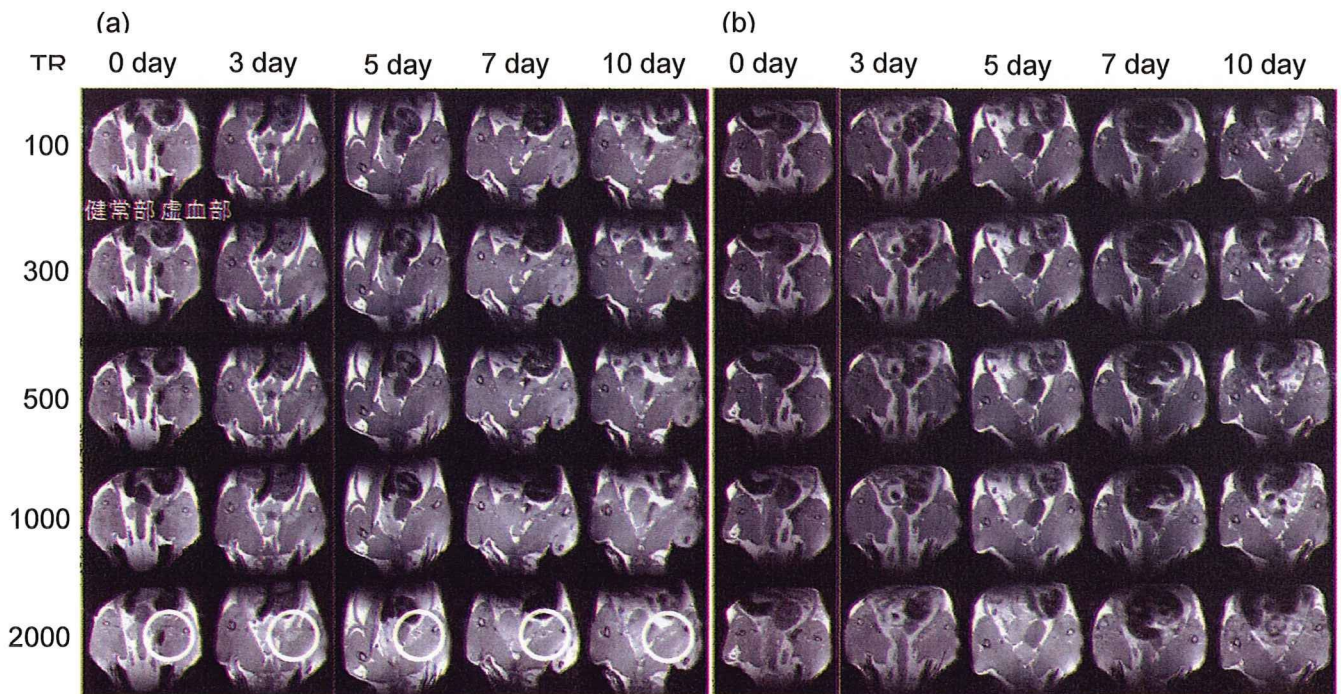


図 20. 造影剤を導入したラット間葉系幹細胞をラット下肢虚血モデルに細胞移植した後の MRI 撮像。ラット F344(14 weeks) 下肢虚血モデルに対し、 $3 \times 10^7$  個のラベル化細胞 + ボルヒール 100  $\mu$ l を混合し、移植した。撮像は 2D-スピンエコー、スライス厚 1 mm で行った。(a) 細胞移植ラット (b) コントロール(ボルヒールのみ)  
 移植直後では、移植した細胞はコントラスト強く観察することができた。移植した細胞は 10 日目でほとんど見ることができなくなった。

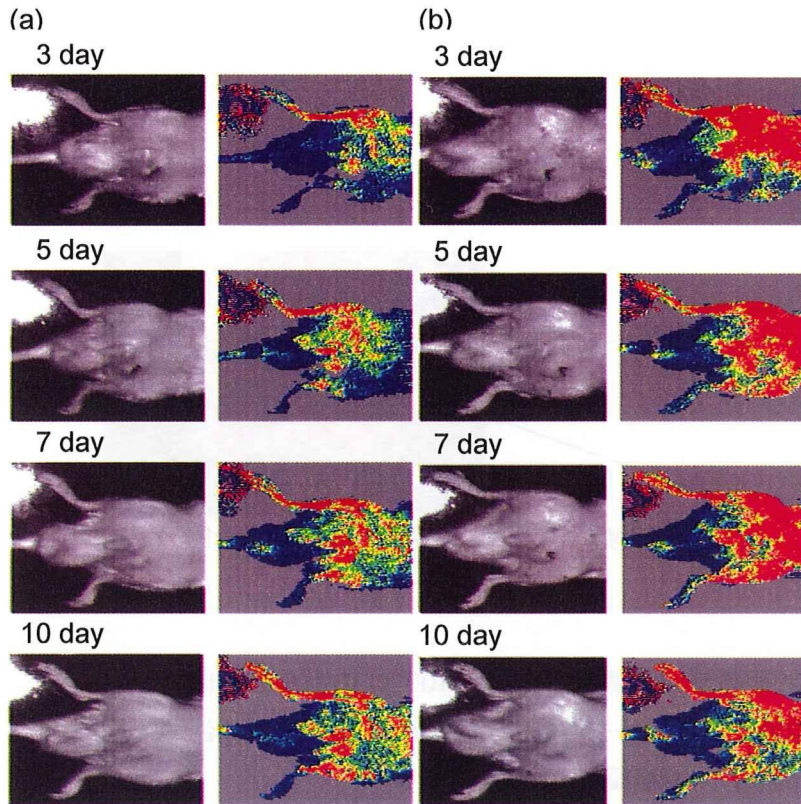


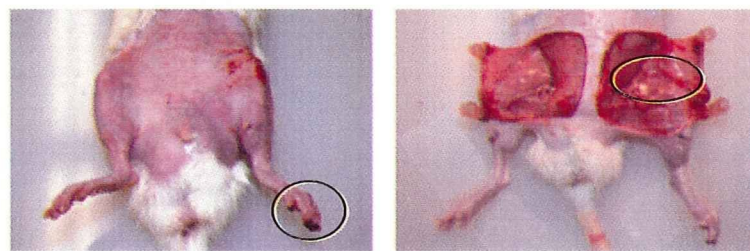
図 21. 細胞移植ラットの血流の変化。

(a) 細胞移植ラット (b) コントロール

Blood flow ratio =

虚血部の血流 / 健常部の血流

細胞移植、コントロール共に血流の回復が見られた。血流の回復過程に差は見られなかった。



細胞移植 20 日後のラットの様子

虚血部の足先は黒く変色し、虚血部の大腿筋肉は細くなっていた。

水平断面

垂直断面

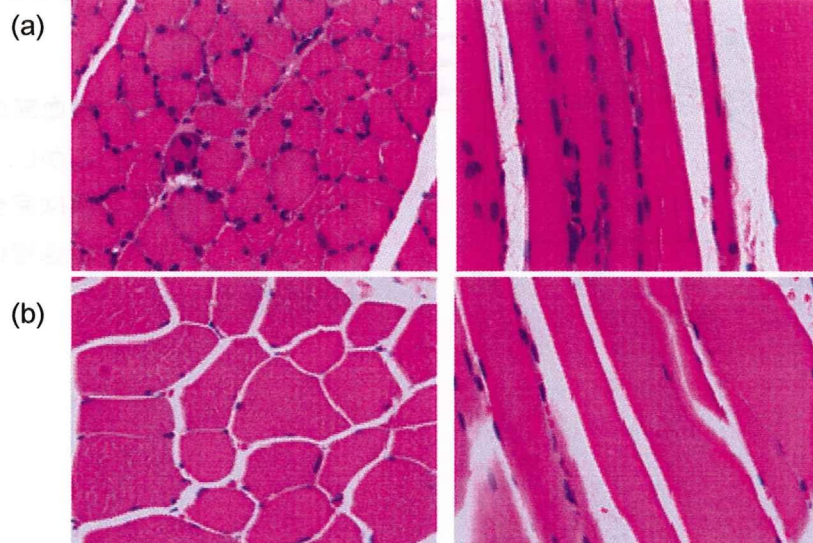


図 22. 細胞移植 20 日後のラットの大腿筋の HE 染色。(a) 虚血部 (b) 健常部

虚血部の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。



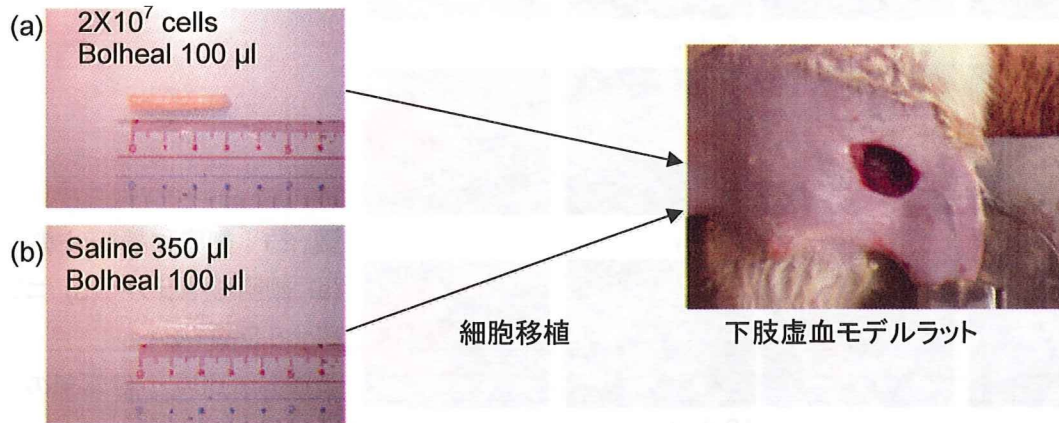


図 23. 細胞移植の流れ。 $2 \times 10^7$  個のラット間葉系幹細胞を 100  $\mu$ l のボルヒールに固めた。大腿動脈・静脈を切断し、下肢虚血モデルラットを作成した。切断した血管の痕に沿って、固めたゲルを置き、開口部を縫合した。(a) 細胞移植 (b) コントロール

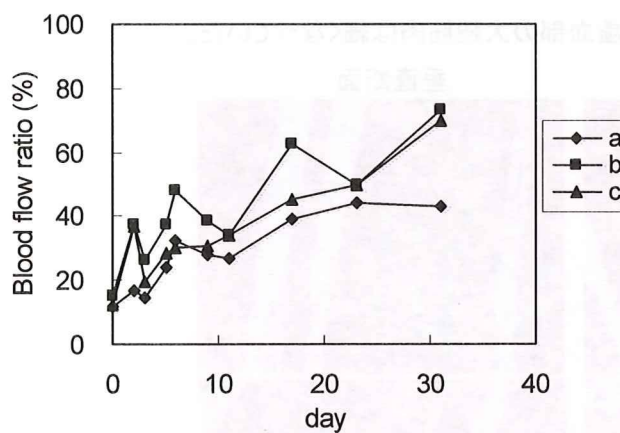


図 24. 血流の回復過程。(a) 細胞移植ラット (b, c) コントロール

Blood flow ratio = 虚血部の血流 / 健常部の血流

日数の経過に従って、虚血部の血流が回復していく様子が見られた。しかし、実験開始後 31 日後においても、虚血部は完全には回復していなかった。血流の回復過程はばらつきが大きい結果となった。

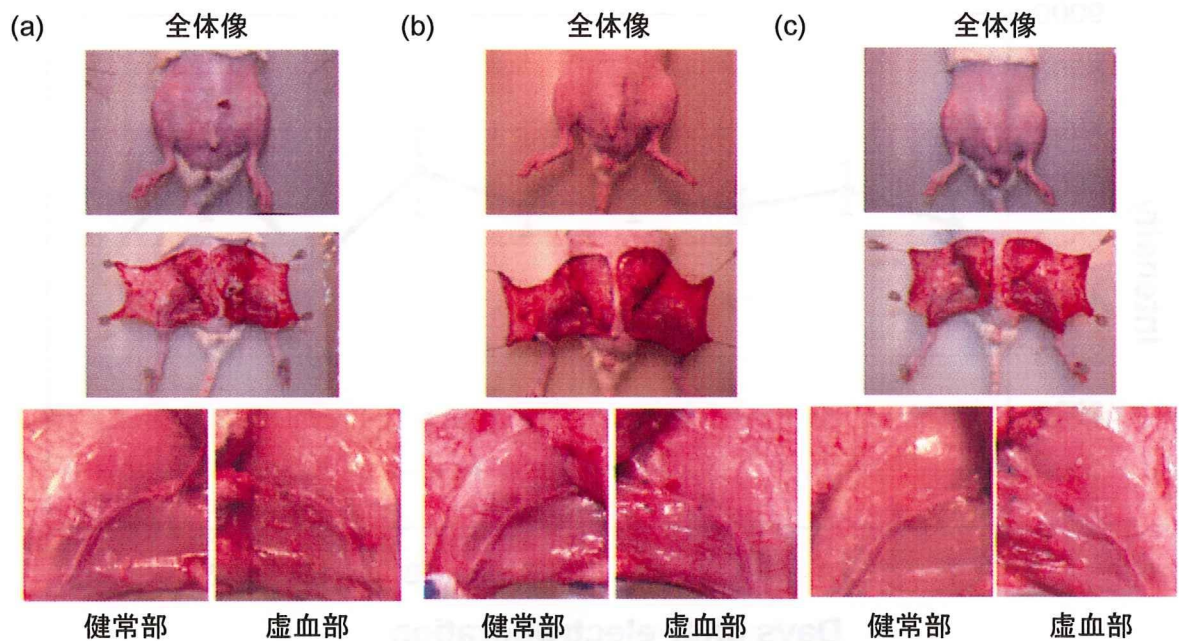


図 25. 細胞移植後 38 日後のラットの様子。(a) 細胞移植ラット (b, c) コントロール  
 虚血部は健康部に比べ、径の小さい血管が多く存在していた。細胞移植とコントロールラットでは、目視において差は見られなかった。

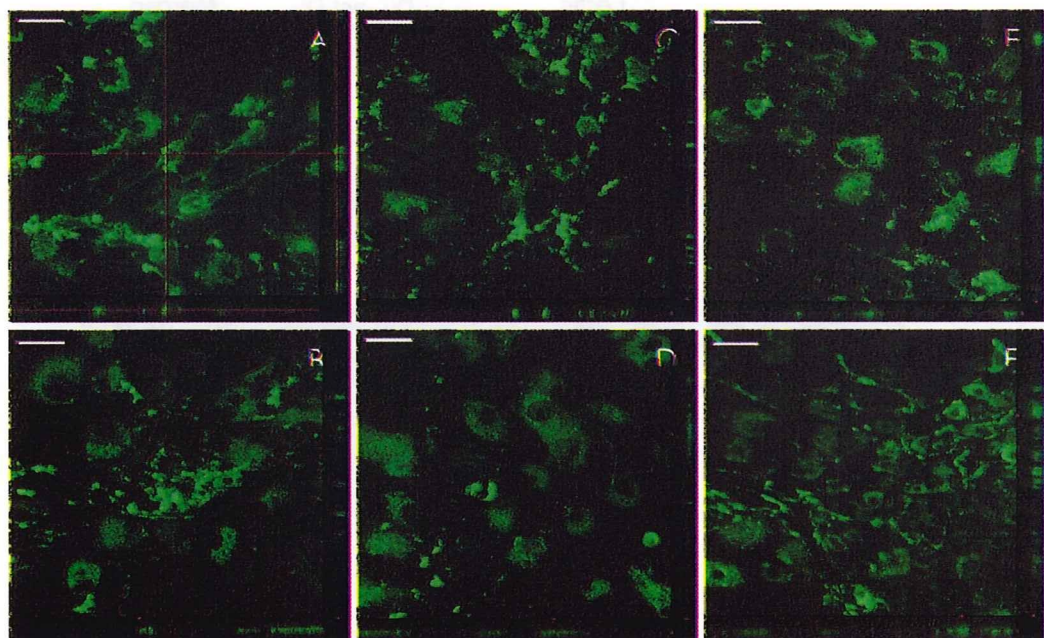


図 26. 造影剤を導入した EPC の共焦点顕微鏡画像。導入はエレクトロポレーション法により行い、造影剤として FITC-Dextran-Gd を用いた。A. 1 日目, B. 5 日目, C. 10 日目, D. 15 日目, E. 20 日目, F. 25 日目. スケールバー 50  $\mu\text{m}$

### FITC-Dextran-Gd3+ contained into EPCs

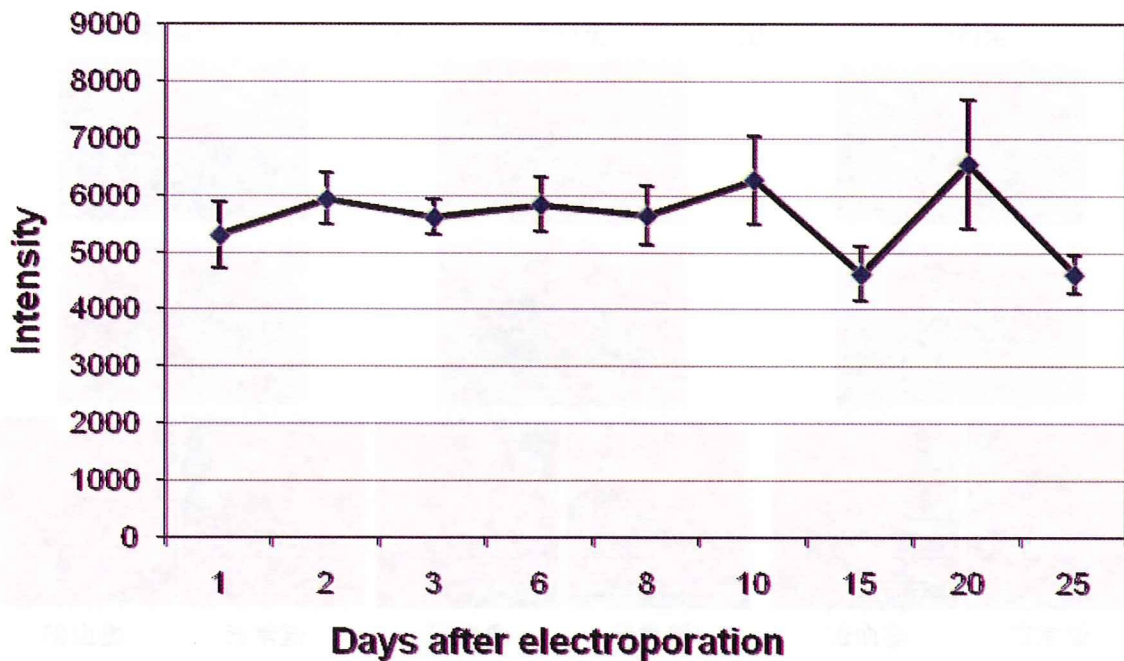


図 27. 造影剤の細胞内滞在性。縦軸は全細胞内に含まれる造影剤の総量を表す。

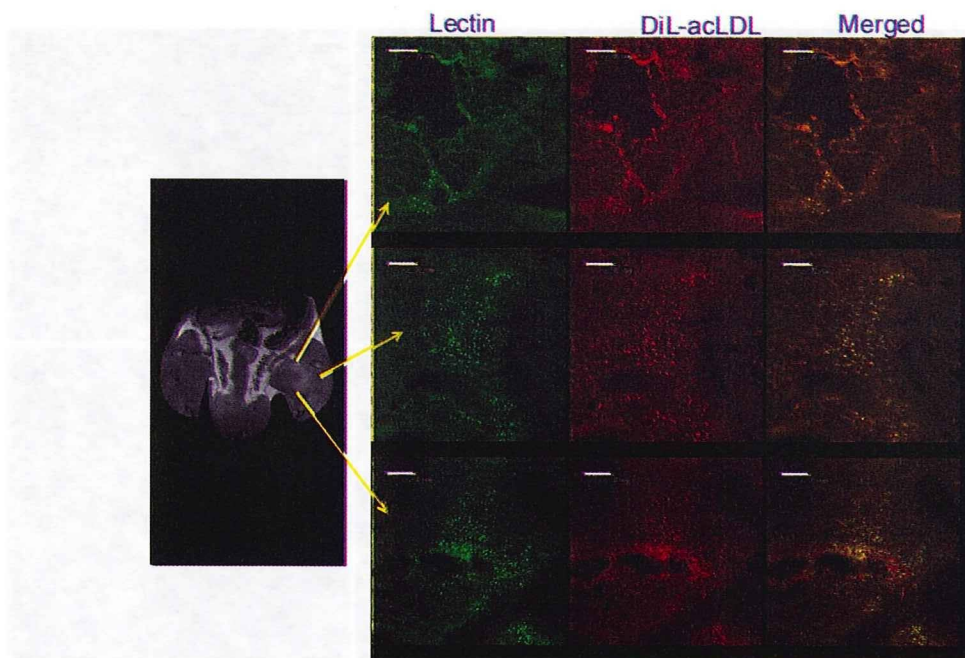


図 28. 細胞移植部の切片の共焦点顕微鏡画像。切片は、細胞移植を行ってから、9日後にラットを犠牲死させ、取り出した。凍結切片は 1,1\_-dioctadecyl-3,3,3,3\_-tetramethylindo-carbocyanine perchlorate-labeled acetylated LDL (DiI-acLDL; 10  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) と FITClabeled *Ulex europaeus* agglutinin (lectin, 10  $\mu\text{g}/\text{ml}$ )により染色した。

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

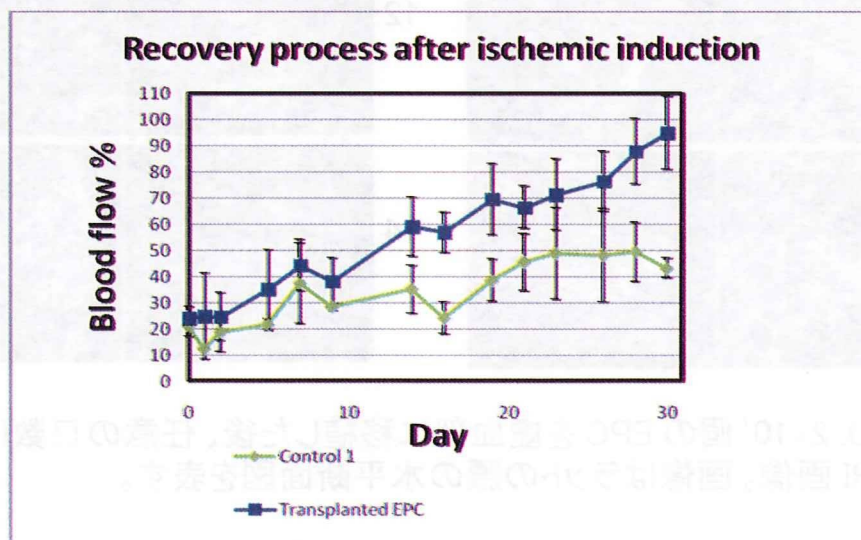
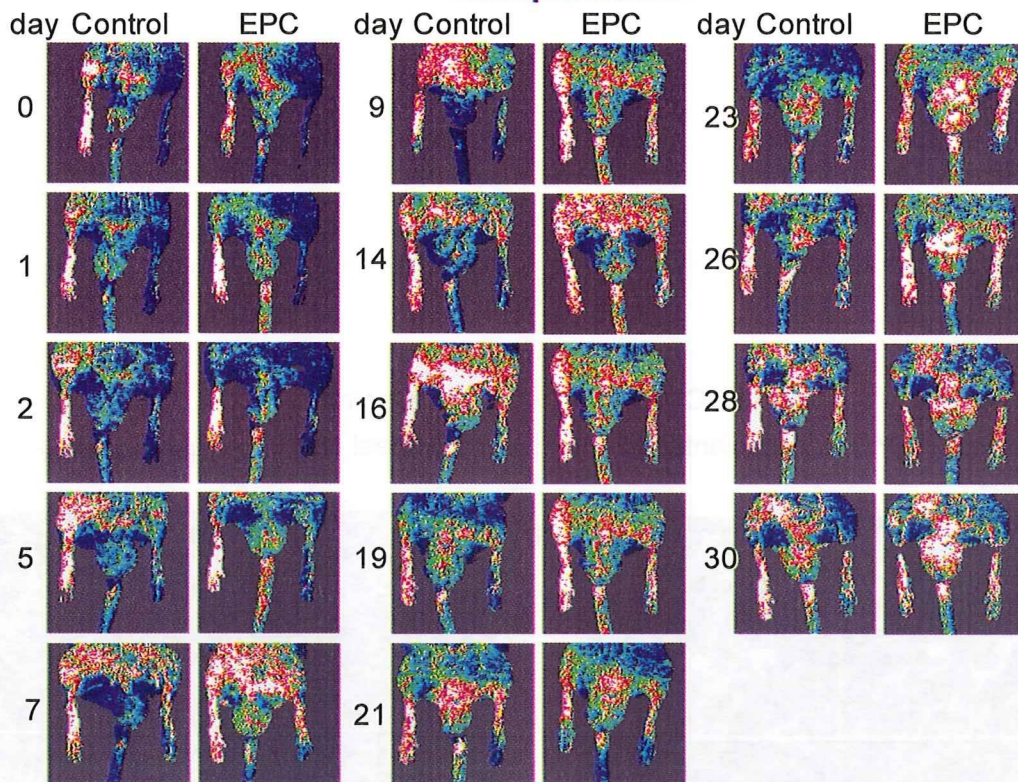


図 29. 細胞移植群とコントロール群の日数経過による血流の回復。血流測定はレーザードップラーを用いた。縦軸は、虚血部の血流量と健常部の血流量の%で表している。