

局所的音響放射力による 流体中のマイクロカプセルの安定な捕捉法の検討

中元隆介, 村松悠佑, 上田沢美, 中屋敷悠介, 梶田晃司, 宮本義孝*, 千葉敏雄**
東京農工大学, *名古屋大学, **国立成育医療センター

Study of A Method for Stable Trapping of Fluid Microcapsules by Local Acoustic Radiation Force

R. Nakamoto, Y. Muramatsu, S. Ueda, Y. Nakayashiki, K. Masuda, Y. Miyamoto* and T. Chiba**
Tokyo Univ. of A&T, *Nagoya Univ., **Nat.C. for Child Health & Develop.

1.はじめに

現在,超音波とマイクロカプセルを用いた DDS(Drug Delivery System)ならびに遺伝子導入法に関する研究が盛んに行われている^{1,2)}。我々はこれまでに,進行波を用いて流体中を流れるマイクロカプセルの捕捉又は誘導が可能である事を確認した^{3,4)}。しかし,僅かな脈流の影響を受け,カプセルの捕捉される位置が大きく変動し,安定した捕捉が実現出来ない問題があった。また,超音波の照射方向がカプセルの流れと対向する向きだけに限定しており,生体応用可能な手法としての検討が不足していた。そこで今回は同等の音源を複数使用して局所的音響放射力を形成する事で,安定なカプセルの捕捉,及び照射方向を様々に変更しての捕捉の検討を行った。さらに様々なパラメータの変化による影響を光学顕微鏡画像から評価し,捕捉性能に対する考察を行った。

2.実験方法

まず,超音波透過性に優れるポリエチレングリコールを使用して内径 2[mm]の直線流路を持つ模擬血管を作成した。次に Fig.1 に示すような実験系を構築し,2 個の集束型トランスデューサを用いて,様々な方向から流路中の 1 箇所局所的音場を形成した。そして,上流からカプセル懸濁液を注入し,集束波の焦点地点に設置したマイクロスコープを用いて,カプセル群の挙動を観測した。また,音圧・流速・カプセルサイズ等をパラメータとして,捕捉量の変化を光学画像から解析した。さらにカプセルが超音波から受ける音響放射力と水流より受ける抗力の関係を算出し,実験結果との比較を行った。

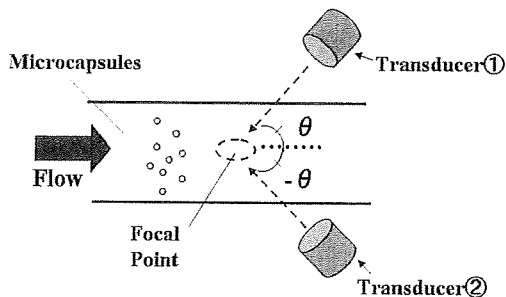


Fig.1 Configuration of the experiment

3.結果

カプセル粒子径を 75[μm], 流速 80[mm/s]とし, $\theta=30[\text{deg}]$, 音圧 210[kPa], 周波数 1[MHz]の正弦波を流路中央に照射した結果を Fig.2 に示す。トランスデューサ単独の場合,1 秒間の捕捉位置の変動幅が 2[mm]以上であったが,トランスデューサを 2 個併用した場合は 0.3[mm]以下に減少している事を観測した。又,僅かではあるがカプセルの捕捉量の増大も観測した。一方, θ の値を様々に変化させて実験を行った結果, $\theta=150[\text{deg}]$ 付近での捕捉を確認した。さらにカプセル粒子径を 4[μm]に変更した結果,流速が 20[mm/s]以下であるという条件付きながら,同様の捕捉現象を観測した。以上の結果,局所的音場の調整によってカプセルの捕捉の安定性が向上し,水流方向に依存しない様々な照射方向から捕捉出来る事を確認した。

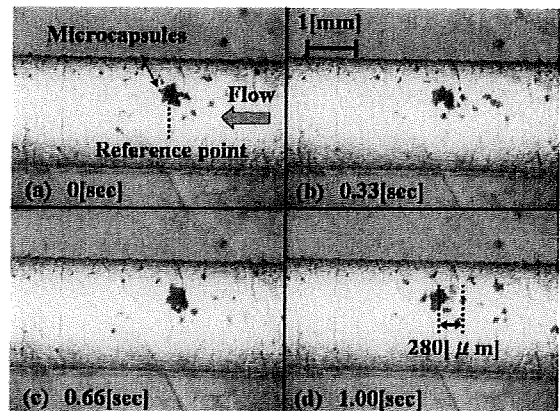


Fig.2 Time series image of trapped microcapsules
(Sound pressure 210[kPa], Flow velocity 80[mm/s])

4.まとめ

複数のトランスデューサを使用することによって,カプセルの捕捉位置が安定する事を示した。今後はシミュレーションにより実験結果との比較を行いながら,生体内での実現を目指す。

5.参考文献

- 1) Yamakoshi et al, JJAP, 46, 7B, pp.4847-4850 (2007)
- 2) 工藤他:IEICE, J89-A, 9, pp.746-753 (2006)
- 3) 梶田他:生体医工学, 46, 2, pp.275-282 (2008)
- 4) Muramatsu et al: Proc.of USE, 29, pp.291-292 (2008)

脂肪組織由来幹細胞を用いた超音波遺伝子導入法の検討 Ultrasound-mediated gene transfer in adipose tissue-derived stem cells

○宮本 義孝^{1,2}, 金 季利², 上野 瞳², 林 衆治¹, 千葉 敏雄²○

Yoshitaka Miyamoto^{1,2}, Keri Kim², Hitomi Ueno², Shuji Hayashi¹, Toshio Chiba²

(¹名大・医学系研究科・先端医療バイオロボティクス学講座,²国立成育医療センター・臨床研究開発部)

(¹Dept Advanced Medicine in Biotechnology and Robotics, Nagoya University,² Clinical Research &Development, National Center for Child Health and Development)

Keyword : Adipose Tissue-Derived Stem/Progenitor Cells/Ultrasound Contrast Agent/Sonoporation

【目的】近年、脂肪組織の中に、多分化能を有する脂肪由来幹細胞 (Adipose tissue-derived stem cells:ASCs) の存在が明らかとなり、骨髄に代わる移植・再生医療の新たな細胞源として注目されている。特に、これらの組織幹細胞に特定の遺伝子を導入することにより、移植する際の目的細胞へ分化誘導することが可能となる。現在、遺伝子導入研究は、遺伝子導入効率の点からウイルスベクターを用いたものが主流であるが、臨床応用と安全面を考慮すると、非ウイルスベクターを用いた超音波遺伝子導入法 (ソノポレーション) も有力な手法の一つである。そこで、われわれは、超音波造影剤を用いて、脂肪組織由来幹細胞への遺伝子発現効率を検証したので報告する。【方法】マウス皮下脂肪組織を採取し、コラゲナーゼを用いて脂肪細胞を分離し SVF を得た。SVF を培養し、最終的に、骨・脂肪に分化可能な ASCs を得た。ASCs にプラスミド (CMV-LacZ ベクター、pEGFP ベクター) を導入して 48 時間後に遺伝子発現効率を測定した。本実験では、超音波遺伝子導入装置 (ソノポール 4000, ネッパージェン株式会社)、超音波造影剤 (ソナゾイド,第一三共株式会社) を使用した。【結果】ASCs への超音波照射条件 (周波数: 3.122MHz,Duty 比 50%, Burst Rate 2.0Hz, Duration 10sec, 出力強度 1.15-1.21 W/Cm²) を設定し、ソナゾイド (5-10% v/v 培養培地)、プラスミド DNA (20 μg/mL) を加え実験を行ったところ、ASCs での遺伝子発現が見られた。しかしながら、ASCs での発現効率は非常に低く、今後、超音波遺伝子導入条件の最適化が必要である。同時に、超音波造影剤存在下での超音波照射による ASCs の死滅や細胞形態の異常についても検証しなければならない。【結論】以上の結果より、ASCs に対して、超音波を用いた遺伝子導入が可能であることが確認された。今後、超音波遺伝子導入法による ASCs の分化誘導に向けた遺伝子発現の可能性について検討する予定である。

P-114 ヒト可溶化羊膜(HSAP)の脂肪組織由来幹細胞への影響

宮本義孝¹, 腰高由美恵¹, 湯川 博¹, 野口洋文²,
岩田 久³, 小林 護⁴, 加茂 功⁴, 桜川宣男⁴,
林 衆治¹

¹名古屋大学大学院 医学系研究科 先端医療バイオロボティクス学講座, ²ベイラー研究所, ³中部大学, ⁴(株)生物資源応用研究所

【目的】 妊娠中の胎児を包む羊膜は、羊水の分泌・保持や胎児の保護だけでなく、様々な細胞の増殖や分化に対して有用な細胞外基質を豊富に含んでおり、角膜再生や組織再生時の足場材料として数多く利用されている。桜川らは、インフォームドコンセントにより供与されたヒト羊膜を可溶化し、培養皿コート剤としてヒト可溶化羊膜(HSAP)を開発した。現在、HSAPコーティングにより、線維芽細胞や羊膜間葉細胞等の増殖充進効果が認められている。近年、多分化能を有する脂肪由来幹細胞(Adipose tissue-derived stem cells: ASCs)の存在が明らかとなり、骨髄に代わる移植・再生医療の新たな細胞源として、非常に注目を集めている。そこで、われわれは、ASCsの増殖と分化能に対するHSAPの効果・影響を検証したので報告する。**【方法】** プラスチック培養皿およびHSAPコート培養皿上に、ASCsを播種し、37℃、5% CO₂インキュベーター下で培養した。3日間培養後に、脂肪および骨分化誘導培養液に交換し、その細胞形態を観察した。**【結果】** ASCsの培養において、プラスチック培養皿と比べて、HSAPコート培養皿は、細胞増殖充進作用を示し、細胞の形態も良好であった。また、分化誘導を行ったASCsは、脂肪および骨への形態変化が見られた。今後、HSAPの移植・再生医療への応用が期待される。

ヒト脂肪組織由来幹細胞における細胞凍結保存液の検討

¹名古屋大学医学研究科先端医療バイオロボティクス学, ²ベイラー研究所, ³セーレン株式会社, ⁴中部大学
宮本義孝¹, 大石幸一¹, 湯川博¹, 野口洋文², 佐々木真宏³, 岩田久⁴, 林衆治¹

Cryopreservation of Human Adipose Tissue-Derived Stem/Progenitor Cells

Yoshitaka MIYAMOTO¹, Koichi OISHI¹, Hiroshi YUKAWA¹, Hirofumi NOGUCHI², Masahiro SASAKI³, Hisashi IWATA⁴, and Shuji HAYASHI¹

¹*Department of Advanced Medicine in Biotechnology and Robotics, Nagoya University Graduate School of Medicine, 65 Tsurumai-cho, Showa-ku, Nagoya 466-8550, Japan*

²*Baylor All Saints Medical Center and Baylor Research Institute, 1400 8th Avenue, Fort Worth, TX 76104 USA*

³*Technical Center, Seiren Co. Ltd., 48-113-2 Yonozu, Mikuni-cho, Sakai, Fukui 913-0036, Japan*

⁴*Department of Biomedical Sciences, Chubu University College of Life and Health Sciences, 1200 Matsumoto-cho, Kasugai, Aichi 487-8501 Japan*

Adipose tissue-derived stem/progenitor cells (ASCs) have attracted attention as a promising cell source that replaces marrow stromal cells (MSCs). In this study, we developed an improved method for the cryopreservation by changing the component of a freezing medium (three freezing mediums including 10% DMSO, culture medium-DMSO, CELLBANKER 2, and culture medium-DMSO (serum-free), 0.1mol/L maltose and 1% sericin). Sericin, a protein hydrolysate (with an average molecular weight of 30 kDa) is very rich in serine and obtained from raw silk during the degumming process. We further measured the viability and the adipo/osteogenic potential of frozen human ASCs using three freezing mediums. After thawing of cryopreserved human ASCs in the freezing medium, the cell viability was shown to be more than 95% from the trypan blue dye exclusion test. The cell proliferation of thawed human ASCs in CELLBANKER 2, and culture medium-DMSO (serum-free), 0.1mol/L maltose and 1% sericin had higher rate in comparison to culture medium-DMSO. The adipogenic induction shows similar tendency as cell proliferation. Additionally, we investigated osteogenic differentiation of cryopreserved human ASCs for 4 weeks. The frozen human ASCs were positive for von Kossa staining, suggesting that the cells had osteogenic differentiation capabilities.

(Received)

第46回国際低温生物学会(CRYO2009)研究報告.

[Key words: Human adipose tissue-derived stem cells (hASCs), Sericin, Cryopreservation; ヒト脂肪組織由来幹細胞, セリシン, 凍結保存]

緒 言

近年、移植・再生医療分野で、骨髄に代わる新たな細胞源として、多分化能を有する脂肪由来幹細胞(ASCs)が注目を集めている。特に、医療への応用と安全性を考え、この細胞源を有効に利用するためには、1. 人由来細胞を用いた評価、2. 細胞培養や凍結保存方法の検討、3. 異種動物や生物由来物質の影響を排除する必要がある。これまでに、無血清かつ動物由来成分フリーの凍結保存液の開発、すなわち、オリゴ糖やセリシンを利用した凍結保存液組成の検討を行い、品質の維持が難しいヒト肝細胞の凍結保存に有用な保存液組成を見出した^{1, 2)}。

セリシンとは、繭の成分であり、絹になるフィブロインを取り囲むタンパク質である。18種類のアミノ酸(タンパク質を構成する物質)で構成され、特にセリンを多く含み、細胞工学分野での利用も行われている³⁾。そこで、本研究では、セリシン含有凍結保存液を調製し、ヒトASCsの凍結保存に有用かどうかを検証した。同時に、マウスASCsの凍結保存に有効な市販保存液(セルバンカー2)⁴⁾についても検討したので報告する。

材料および方法

1. 実験材料

本実験では、ヒトASCsの培養において、Zen-Bio社製の維持用培地(# PM-1)、脂肪分化誘導培地(# DM-2)および骨分化誘導培地(# OB-1)を用いた。また、セーレン株式会社より、カイコの繭由来タンパク質セリシン(平均分子量約3万)を提供して頂き、本研究に用いた。

2. 細胞培養

ヒトASCsは、インフォームドコンセントにより供給されたZen-Bio社製、継代数2を使用した(# ASC-F, LotASC062801; sex/age/BMI (average)/Number of patients: Female/37/23.29/1 (single)). 25 cm²培養フラスコ(NUNC)上に、ヒトASCsを 2×10^5 細胞/5mL播種し、37°C、5%CO₂インキュベータ内で継代培養を行った(継代数5, and 7)。細胞用培養液は、PM-1を用いた。

3. 凍結保存と解凍

ヒトASCsを継代培養したのち、各凍結保存液を用いて、細胞密度 5×10^6 cells/mlで凍結保存した。凍結保存液として、基本凍結保存液(PM-1培地+10%DMSO)、セルバンカー2(日本全薬工業)、セリシン含有凍結保存液(PM-1培地(serum-free)+10%DMSO, 1%セリシン, 0.1mol/Lマルトース)の3種類を使用した。凍結方法は、調製済みの各サンプルチューブを、バイセル凍結処理容器(日本フリーザー(株))に入れ、-80°Cディープフリーザーで静置し、1-3ヶ月間保管した。融解は、37°C恒温槽中で急速解凍した。

4. 細胞生存率と増殖率の測定

融解後、ヒトASCsの生細胞率をトリパンブルー排除能(最終濃度0.2%)で測定した。

また、細胞の増殖率は、Cell Counting Kit-8(CCK-8; DOJINDO)を用いた。96穴培養皿の各ウェルに、 1×10^4 cells/100uL播種し、37°C、5%CO₂インキュベータ内で培養した(4, 7, 11日)。培養後に、Cell Counting Kit-8溶液を各ウェルに10 ulずつ添加し、インキュベータ内で4時間呈色反応後に、マイクロプレートリーダーを用い、450 nmの吸光度を測定した。

4. ヒトASCsから脂肪および骨への分化

脂肪への分化は、ヒトASCsをコンフルエントまでPM-1培地で培養したのち、DM-2培地に交換して、5日間培養した。脂肪への分化を確認する方法として、Oil Red O染色を用いた。

骨への分化は、ヒトASCsをコンフルエントまでPM-1培地で培養したのち、OB-1培地に交換して、4週間培養した。骨への分化を確認する方法として、Von Kossa染色を用いた。

結 果

1. ヒトASCsの凍結保存

解凍後のヒトASCs(継代数2)の生存率は、>95%であった。ヒトASCsの継代培養を行い(継代数5, and 7)、3種類の凍結保存液で凍結保存した。解凍後、ヒトASCsの細胞生存率は、継代数および凍結保存液の違いによる有意差を見られなかった。

(>95%).

続いて、ヒト ASCs(継代数 2, 5, and 7)の細胞増殖能を評価した。解凍後、96 穴培養皿に播種したヒト ASCs の状態は、良好な接着・伸展形態を示した(Fig. 1A)。次に、Cell Counting Kit-8 を用いて、細胞の増殖率を比較検討した。ヒト ASCs(継代数 2)は、さらに継代培養して凍結保存したヒト ASCs(継代数 5, and 7)と比べると、最も高い増殖能を示した。また、継代培養(継代数 5, and 7)を重ねるにつれて、増殖効率が低くなることが確認できた。さらに、ヒト ASCs(継代数 5)を 3 種類の凍結保存液で凍結し、解凍後の増殖率を比較すると、基本凍結保存液と比べて、セリシン含有凍結保存液、セルバンカー2 が高い増殖能を示した⁵⁾。

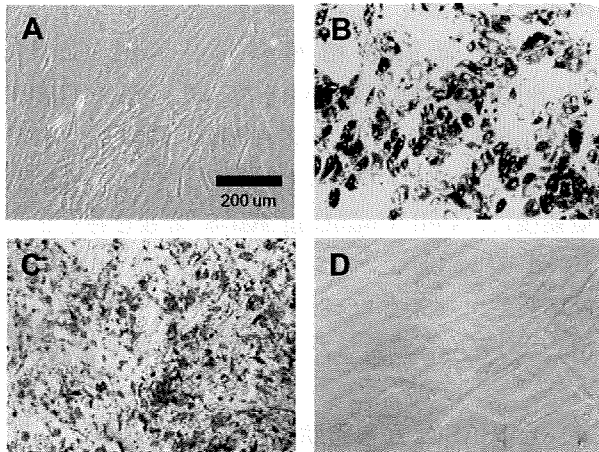


Fig. 1 The capabilities of adipogenic/osteogenic differentiation of refrozen human ASCs (passage number 5). Phase-contrast photomicrographs of refrozen human ASCs before (A) and after adipogenic differentiation (B) / osteogenic differentiation (C and D). cryopreservation media: PM-1 (serum free) +10% DMSO, 0.1mol/L maltose, 1% sericin (B) and (C); PM-1 +10% DMSO (D).

2. ヒト ASCs から脂肪および骨への分化

3 種の保存液で凍結したヒト ASCs(継代数 5)を用いて、脂肪および骨への分化を確認した。脂肪分化誘導培地で培養 5 日目、多くの細胞に脂肪滴が観察でき(Oil Red O 染色)、脂肪への分化が確認できた(Fig. 1B)。

また、骨分化誘導培地で培養 4 週間後、セリシン含有凍結保存液、セルバンカー2 を用いて、凍結したヒト ASCs は、骨への分化が確認できた(Fig. 1C)。

しかし、基本凍結保存液で凍結したヒト ASCs では、培養 4 週間後に、骨への分化は確認できなかった(Fig. 1D)。

考 察

近年、再生・移植医療の細胞源として、体性幹細胞をはじめ、ES 細胞、iPS 細胞⁶⁾を用いた基礎研究が盛んに行われている。特に、体性幹細胞の中でも、骨髄由来幹細胞は、臨床応用がなされているが、十分量の細胞数と安全性を確保しているとは言い難い。これらの問題を解決するために、インフォームドコンセントにより、ご提供頂くドナーに対して、低侵襲かつ安全に、大量の細胞を採取することができる脂肪組織由来幹細胞は、新たな細胞源として期待されている^{7, 8)}。そこで、われわれは、ヒト脂肪組織由来幹細胞における凍結保存液の検討を行い、有効な保存液組成を見出した。

以前の報告で、マウス ASCs の凍結保存液として市販品であるセルバンカー2 が有用であること⁴⁾、また、凍結保存が難しい初代ヒト肝細胞の保存に絹タンパク質セリシンが有用であることから²⁾、ヒト ASCs の凍結保存に、これらの凍結保存液を用いた。これらの凍結保存液(セリシン含有凍結保存液、セルバンカー2)を用いると、基本凍結保存液と比べて、ヒト ASCs の増殖能、多分化能が維持されることが明らかになった。今後、ヒト組織由来幹細胞の凍結保存液として、セリシンを用いることにより、異種動物や生物由来物質の影響を排除し、移植・再生医療分野での利用が期待される。

ま と め

多分化能を有するヒト ASCs の継代培養を行い、3 種類の保存液(基本凍結保存液、セルバンカー2、セリシン含有凍結保存液)を用いて、 -80°C 下で凍結保存した(1-3 ヶ月)。融解後、それぞれの細胞の生存率を測定し、その機能評価(増殖能、多分化能)を行った。ヒト ASCs の生存率を比較すると、3 種類の保存液の間で有意差は見られなかった(>95%)。また、ヒト ASCs の増殖能、多分化能(脂肪や骨)を比較すると、セリシン含有凍結保存液、セルバンカー2 を用いた保存液が、基本凍結保存液と比べて、有

意であることが確認できた。以上より、ヒト ASC の凍結保存に、セリシンは有効であることが確認できた。

謝 辞

本研究を行うにあたり、研究を手伝って頂いた横田里奈さんに心より感謝いたします。

文 献

- 1) Miyamoto, Y., Suzuki, S., Nomura, K., and Enosawa, S. Improvement of hepatocyte viability after cryopreservation by supplementation of long-chain oligosaccharide in the freezing medium in rats and humans, *Cell Transplant.*, **15**, 911-919 (2006)
- 2) Miyamoto, Y., Teramoto, N., Hayashi, S., and Enosawa, S. An improvement in the attaching capability of cryopreserved human hepatocytes by a proteinaceous high molecule, Sericin, in the serum-free solution, *Cell Transplant.*, in press
- 3) Sasaki, M., Kato, Y., Yamada, H., and Terada, S. Development of a novel serum-free freezing medium for mammalian cells using the silk protein sericin, *Biotechnol Appl Biochem.*, **42**, 183-188 (2005)
- 4) Oishi, K., Noguchi, H., Yukawa, H., Miyazaki, T., Kato, R., Kitagawa, Y., Ueda, M., and Hayashi, S. Cryopreservation of mouse adipose tissue-derived stem/progenitor cells, *Cell Transplant.*, **17**(1-2), 35-41 (2008)
- 5) Miyamoto, Y., Oishi, K., Yukawa, H., Noguchi, H., Sasaki, M., Iwata, H., and Hayashi, S. Cryopreservation of human adipose tissue-derived stem/progenitor cells using the silk protein sericin. *Cell Transplant* in press
- 6) Takahashi, K., Tanabe, K., Ohnuki, M., Narita, M., Ichisaka, T., Tomoda, K., and Yamanaka, S. Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors, *Cell*, **131**(5), 861-872 (2007)
- 7) Yoshimura, K., Sato, K., Aoi, N., Kurita, M., Hirohi, T., and Harii, K. Cell-assisted lipotransfer for cosmetic breast augmentation: supportive use of adipose-derived stem/stromal cells, *Aesthetic Plast Surg.*, **32**(1), 48-55 (2008)
- 8) Yoshimura, K., Sato, K., Aoi, N., Kurita, M., Inoue, K., Suga, H., Eto, H., Kato, H., Hirohi, T., and Harii, K. Cell-assisted lipotransfer for facial lipoatrophy: efficacy of clinical use of adipose-derived stem cells, *Dermatol Surg.*, **34**(9), 1178-1185 (2008)

