

た。FGF-2を2日毎に追加し、約7-10日後にNeurospheresの形成を確認し移植実験に用いた。

新生ラット脊髄経路障害モデル及び細胞移植

出生早期の新生ラット(Fischer 344系あるいはSprague-Dawley系)を用いて、低体温麻酔下に下位胸椎レベルにおいて脊髄完全切断を行った。2週間親ラットの下で生存させた後、麻酔下に再び創部を開放し、脊髄切断部位の両断端に培養ラット神経幹細胞の定位微量注入を行い閉創した。コントロール群では培養液のみの注入とした。

神経回路標識(皮質脊髄路)

出生後9週目に、ネブタール麻酔下に10%biotinylated dextran amine水溶液(BDA; Molecular Probes, Eugene, OR, USA)あるいは10%Dextran Rhodamine水溶液(D-Rho; Molecular Probes, Eugene, OR)を、定位的に大脳皮質下肢運動野に微量注入を行った(Takami et al.)。

組織学的解析

出生後12週目に、ネブタール麻酔下に4%paraformaldehyde溶液(0.1 M, pH 7.4)を用いて灌流固定を行い、脊髄のゼラチン包埋凍結切片を作製した(Takami et al.)。

神経回路解析では、BDA標識された皮質脊髄路をavidin-biotin/oxidase染色法により観察、またD-Rho標識された皮質脊髄路は直接蛍光顕微鏡下に観察した。移植細胞の分化・生着あるいは遊走能の評価は、グリーンラット由来神経幹細胞移植群において蛍光免疫組織化学法にて行った。

C. 研究結果

培養神経幹細胞

移植に用いた胎児ラット脊髄由来の神経幹細胞Neurosphere像を示す(図1A)。さらに、*in vitro*にて分化誘導を行うと、神経細胞(TuJ1)及びグリア細胞(GFAP)への分化が明らかとなった(図1B)。

標識神経回路の観察

成体ラット脊髄挫傷におけるBDA標識された皮質脊髄路の例を示す(図2)。脊髄挫傷部に近づくに従いAxonal sproutingを示すが、最終的には典型的な神経終末像(Axonal bulbous terminals)を形成する(Takami et al.)。

本研究では、移植神経幹細胞により皮質脊髄路がどのような応答を示すか形態学的に明らかとする。つまり、ほとんどの皮質脊髄路が神経終末像を呈するのか、あるいは移植部位に向かって伸長し局所のAxonal sproutingを示しつつ機能的シナプス架橋を形成するのか明らかにする予定である。

D. 考察

神経幹細胞移植による神経回路構築の試み

近年、細胞移植による損傷脊髄の再生あるいは修復の基礎研究が活発に進められており、特にその中でも神経幹細胞は、その細胞生物学的特性から移植細胞として大いに注目されている(Han and Fischer, 2000)。神経幹細胞は多分化能と自己複製能力を有する神経系前駆細胞であり、多分化能によりニューロン、アストロサイト、オリゴデンドロサイトという中枢神経を構成する中心的な細胞に分化し、増殖し継代を繰り返すことが可能(自己複製能力)である(岡野, 2000)。この特異的な性質のため神経発生に関する基礎研究のみならず、神経再生あるいは修復を中心とした細胞移植医療という新たな分野で

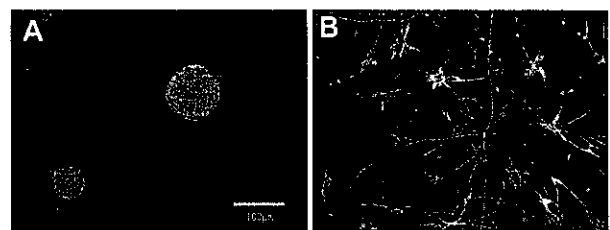


図1. A. 胎児ラット脊髄由来の神経幹細胞Neurosphere B. *in vitro*分化誘導後には神経細胞マーカー(緑: TuJ1)陽性及びグリアマーカー(赤: GFAP)陽性細胞の存在が明らかとなった。青はTO-PRO-3核染色を示す。

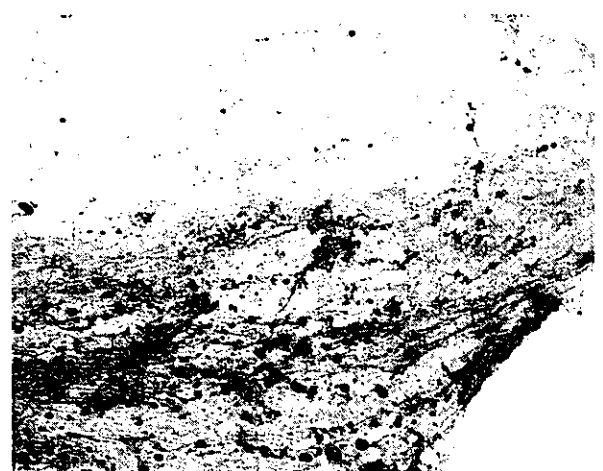


図2. 皮質脊髄路のBDA標識: 脊髄挫傷部における神経終末像(Axonal bulbous terminals)(X100)。

注目される存在となってきた。損傷脊髄の再生あるいは修復の分野においては、神経幹細胞移植の有効性を示唆する基礎研究成果が報告され、将来の臨床応用に大きな期待がかけられている (Okano et al., 2001)。その中であって、これまで中枢神経の形成異常に対する応用性については全く検討されていない。脊髄髄膜瘤は無脳症、水頭症とともに代表的な先天性中枢神経奇形疾患で、本邦での発生頻度は以前と比べて増加傾向にあり、成因として遺伝的素因の他に環境素因の関与も指摘されている (Copp, 1998)。最近の早期診断、早期手術治療 (閉鎖術)、新生児管理の進歩により生命予後に関しては改善が見られるものの、脊髄・末梢神経機能障害 (下肢運動知覚障害、膀胱直腸障害) に関しては依然として根治的な治療法がないのが現状である。脊髄髄膜瘤が発生段階における尾側神経孔の癒合不全に起因する神経管形成不全であることから、神経機能障害の一因に脊髄から末梢神経あるいは末梢神経から脊髄への神経回路形成不全も関与しているものと思われる。発生過程における神経回路形成は、①神経細胞の誕生及び移動、②神経突起の形成、③神経突起の誘導 (神経軸索の伸長)、④神経軸索の分枝、⑤神経軸索の標的認識、そして⑥シナプス形成の過程を経て完成となる。脊髄髄膜瘤における神経回路形成不全 (特に皮質脊髄路) では、主に③以下の過程が障害されているものと推定される。神経幹細胞移植により再び神経回路が誘導され最終的に本来のターゲットとシナプスを形成する可能性については不明であるが、局所神経回路形成のための機能的な新生ニューロンの補充と新生軸索のための新生グリア環境の構築は充分可能と思われる。

脊髄髄膜瘤実験モデル

本研究で解析した皮質脊髄路は運動性伝導路の主回路であるにも関わらず、その回路形成は極めて遅く、ラットの場合では生後数週をかけて完成する (Gribnau et al., 1986)。起始ニューロンである大脳皮質第5層ニューロンは、胎生17日 (胎生22日で出生) に脳室周囲の神経上皮より発生し、胎生17.5日に神経軸索の先端が内包に到達する。その後、胎生18日に橋核、19日延髄、21日に錐体交叉、22日 (生後0日: P0) で第2頸髄を通過し、生後9日に第2-3仙髄に到達する。従って、出生早期に下位胸椎レベルにて脊髄を切断する本研究モデルでは、切断時には皮質脊髄路自身の障害はなく、その後の脊髄経

路の障害となる (新生ラット脊髄経路障害モデル)。皮質脊髄路がいかにその経路を決定するかの分子機構は未だ明らかではない (Sato et al., 1994; Takami et al., 1998)。しかも経路障害と脊髄発生段階での異常との相関性については今後の検討を要するものの、発生段階あるいは新生の皮質脊髄路が神経幹細胞あるいはそこから分化した新生ニューロン及びグリア細胞といかに関わり、最終的にどのような神経回路を構築するかを検討することは極めて興味深い。さらに、神経管欠損モデルとして知られるSPD (splotch-delayed) マウス (Vogan et al., 1993) などでの神経幹細胞移植が可能となれば、正常マウスとこれら変異動物における神経回路自身の応答の違いも明らかとなるのではないと思われる。

細胞供給源の問題解決に向けて

神経幹細胞移植を実現するためには、細胞の供給源についても解決しなければならない。これまでの基礎研究レベルでは、あくまでもラット胎児脳あるいは脊髄由来の神経幹細胞が用いられてきた。実際の施行を想定した場合には、ヒト中絶胎児組織からの細胞培養を必要とするため、倫理的問題を解決する必要が生じる。最近の研究報告では成人脳にも未分化な神経幹細胞が存在することが明らかとなり、自家移植の可能性が高まる。未分化幹細胞 (造血、血管あるいは間葉系幹細胞) から神経系細胞への分化・誘導も積極的に試みられており、実際にヒト臍帯血から神経細胞マーカー陽性細胞が分離可能であることが報告された (Ha et al., 2001)。本研究では臍帯血からの神経幹細胞の分離・培養を目指しており、そうならば患児にとっては自家移植となり、免疫拒絶反応の問題を回避できる。

E. 結論

本研究では、脊髄髄膜瘤における神経回路形成障害に対する神経幹細胞移植による神経機能回復効果を考察するため、まず発生段階あるいは新生の皮質脊髄路に対する神経幹細胞移植の効果について、神経回路構築の観点から検討する。現在までに、ラット胎児脳あるいは脊髄から神経幹細胞を分離・培養したが、今後はさらに将来の自家移植治療を想定した臍帯血からの分離・培養を目指す。

F. 文献

- Bartolomei JC, Greer CA. Cell transplantation for spinal cord injury repair. *Neurobiology of Spinal Cord Injury*. Edited by Kalb RG, Strittmatter SM. 195-213, 2000. Human Press Inc., Totowa, NJ
- Copp AJ. Prevention of neural tube defects: vitamins, enzymes and genes. *Curr Opin Neurol* 11: 97-102, 1998
- Gribnau AA, de Kort EJ, Dederen PJ, Nieuwenhuys R. On the development of the pyramidal tract in the rat. II. An anterograde tracer study of the outgrowth of the corticospinal fibers. *Anat Embryol (Berl)* 175:101-110, 1986.
- Ha Y, Choi JU, Yoon DH, Yeon DS, Lee JJ, Kim HO, Cho YE. Neural phenotype expression of cultured human cord blood cells in vitro. *Neuroreport* 12:3523-7, 2001.
- Han SS, Fischer I. Neural stem cells and gene therapy: prospects for repairing the injured spinal cord. *JAMA* 283:2300-2301, 2000.
- McLone DG. Congenital spinal cord anomalies. *PRINCIPLES OF SPINAL SURGERY*. Edited by Menezes AH, Sonntag VKH. 447-463, 1996. McGraw-Hill Companies Inc.
- Okano H, Ogawa Y, Sawamoto K, Miyata T, Miyao S, Watanabe M, Toyama T, Nakamura M, Bregman BS, Uchiyama Y. Transplantation of in vitro expanded neural stem cells results in neurogenesis and recovery of motor function after spinal contusion injury in rats. *Abst Soc Neurosci* 325.11, 2001.
- 岡野栄之. 神経幹細胞. 再生医学と生命科学. 浅島 誠、岩田博夫、上田 実、中辻憲夫編. 蛋白質核酸酵素, 45:2063-83. 2000.
- Reynolds BA, Tetzlaff W, Weiss S. A multipotent EGF-responsive striatal embryonic progenitor cell produces neurons and astrocytes. *J Neurosci* 12:4565-74, 1992.
- Sato M, Lopez-Mascaraque L, Heffner CD, O'Leary DD. Action of a diffusible target-derived chemoattractant on cortical axon branch induction and directed growth. *Neuron* 13:791-803, 1994.
- Takami T, Oudega M, Bates ML, Wood PM, Kleitman N, Bunge MB. Schwann cell but not olfactory ensheathing glia transplants improve hindlimb locomotor performance in the moderately contused adult rat thoracic spinal cord. (submitted).
- Takami T, Yoneda T, Nagano T, Hakuba A, Takagi H, Sato M. Identifying mRNAs involved potentially in corticopontine projection by modified differential display. *Osaka City Medical Journal* 44: 17-33, 1998.
- Takami T, Oudega M, Bethea JR, Wood PM, Kleitman N, Bunge MB. Methylprednisolone and Interleukin-10 reduce gray matter damage in the contused Fischer rat thoracic spinal cord but do not improve functional outcome. *J Neurotrauma* (in press).

ヒト神経幹細胞の安定・大量培養法の開発 —細胞増殖測定法の改良—

産業技術総合研究所 テイッシュエンジニアリング研究センター(TERC)¹ 国立大阪病院脳神経外科・臨床研究部²
兵庫医科大学脳神経外科³ 慶應義塾大学医学部生理学⁴

原 正之¹ 金村 米博¹ 山崎 麻美² 有田 憲生³ 岡野 栄之⁴ 三宅 淳¹

研究要旨

12週以下の週令のヒト胎児脳もしくは脊髄由来の神経幹細胞の培養をneurosphere法により各種増殖因子を含む無血清培地にて行い、細胞を十分に増殖させた後、牛胎児血清(FBS)を含む培地中で神経細胞やグリア細胞(主にアストロサイト)に分化させた。ヒト神経幹細胞の増殖は遅く、かつ細胞が凝集した状態で存在するため、これまでは細胞増殖の測定が煩雑で困難であった。このため、種々の生物化学的測定法を検討し、細胞数の直接計測によらずともMTT法やATP濃度の測定法など酵素反応系を利用した代替的方法で増殖の経過を簡便に測定できることを明らかにした。比較対照としては、BrdUの取り込みによる細胞分裂の測定法を用いた。これら3つの方法により測定された細胞の倍化時間はいずれも約80時間であった。

A. 研究目的

我々は産業技術総合研究所・テイッシュエンジニアリング研究センターにおいて、中枢神経系の疾患の再生医学的治療に供する目的で、安定(癌化や染色体数変化の無い)、安全(細菌やウイルス感染の無い)かつ大量(脳や脊髄の変性疾患等の細胞移植治療に必要十分な細胞数)のヒト神経幹細胞の培養方法の確立を目的として、研究を行っている。ヒト胎児由来の神経幹細胞は神経細胞やグリア細胞(アストロサイト、オリゴデンドロサイト等)に分化させることによりretrospectiveにその存在が確認できる。Musashi 1、Nestin、RC2など幹細胞や前駆細胞に多く発現している選択的な分子マーカーがいくつか存在するが、特異的な細胞表面マーカーが無いため、prospectiveに幹細胞を同定・選別することが難しい¹⁻⁴⁾。このため、蛍光フローサイトメトリー(FACS)と新規な分子マーカーの探索を含めた幹細胞分離技術の開発を行う予定である。また、ラット、マウスなど齧歯類の神経

幹細胞と比較してヒト神経幹細胞は分裂増殖が遅く大量培養が難しいことが、研究者の間では経験的に知られているものの、定量的な比較は行われておらず、齧歯類の細胞に適した条件に準じてヒト神経幹細胞の培養条件を設定している場合が多い。ヒト神経幹細胞の多分化能を保持したままの増殖に最適な培養条件を検討することは、本研究の最も主要なテーマであり、培地組成や培養器具の検討と改変など培養条件の詳細な検討を計画している。さらに、培養・増幅した後の神経幹細胞を神経細胞もしくはグリア細胞に分化させる際に、目的とする神経細胞への分化比率を上げるための分化誘導技術も、我々の研究チームの取り組むべき課題である。当面は神経細胞/グリア細胞の比率を高める分化誘導条件を検討し、神経伝達物質の種類による神経のサブタイプの制御法についても検討を行う予定である。

無血清培地を用いた浮遊培養系において神経幹細胞を含む細胞を凝集塊として培養する方法(neurosphere法)で培養を行う場合、ヒト神経幹細胞の増殖は齧歯類のそ

れと較べて遅く、かつ細胞が凝集塊 (neurosphere) を形成した状態で増殖するため、細胞をバラバラにして単一細胞化し、その細胞数を計測する測定は操作として煩雑であるのみならず、細胞に傷害を与えてしまい、細胞増殖の計測それ自体のために多くの貴重な細胞が失われるという問題があった。培養条件の詳細な検討のためには頻繁に細胞増殖能の測定を行う必要があり、細胞数の直接計測法に替わる生物化学的方法で、細胞の増殖を測定し、倍化時間を求める技法の開発が強く求められていた。このため、MTT法の一つであるWST-8法、ATP測定法、BrdU取り込み測定法の3つの方法を比較検討し、前者2法が細胞増殖測定の良い指標となることを見いだしたので報告する。

B. 研究方法

妊娠中絶胎児 (9~12週令) の前脳部位の組織よりトリプシン処理を経て分離された神経幹細胞を、DMEM/F12、B27、EGF、FGF-2、LIF、等を含む基本培地を含む培養フラスコ中で37℃、CO25%下で培養した。細胞はneurosphereを形成した状態で浮遊培養系にて増殖するため、通常の細胞の培地交換は約3日おきに、未使用の培地と、conditioned medium (細胞遠心分離後の培地上清) とを等

量混合して新規フラスコに植え継ぐ方法にて行った。培養を開始してから150日程度経過した細胞を細胞分化能の検証と、細胞増殖速度の測定に用いた。

細胞分化能の検証については、neurosphereを1%(v/v)ウシ胎児血清を含み、EGF、FGF-2、LIF、を除いた培地下でカバーガラスに接着させ、分化誘導を行った。

細胞増殖速度を測定し、細胞の倍加時間を求めるために、細胞を96wellマイクロプレートに $2.5\sim 5.0\times 10^3$ cells/wellとなるように播種し培養した。その後、培養時間1日(24時間)と6日(144時間)の間培養し、以下に述べるそれぞれの方法で細胞の増殖測定を行った。

BrdUの取り込み及び検出にはCell proliferation ELISA-BrdU Kit (Roche) を使用した。BrdU取り込み8時間の後、抗体反応及び発色によるマイクロプレートリーダーでの検出を行った。

MTT改良法であるWST-8による細胞増殖の検出法にはCell counting Kit F (Nacalai Tesque) を用いた。培養細胞の入った各ウェルへWST-8を 10μ l添加後5時間インキュベートし、マイクロプレートリーダーにて検出を行った。

ATP測定法による細胞増殖の検出にはCellTiter-Glo (Promega) を使用した。

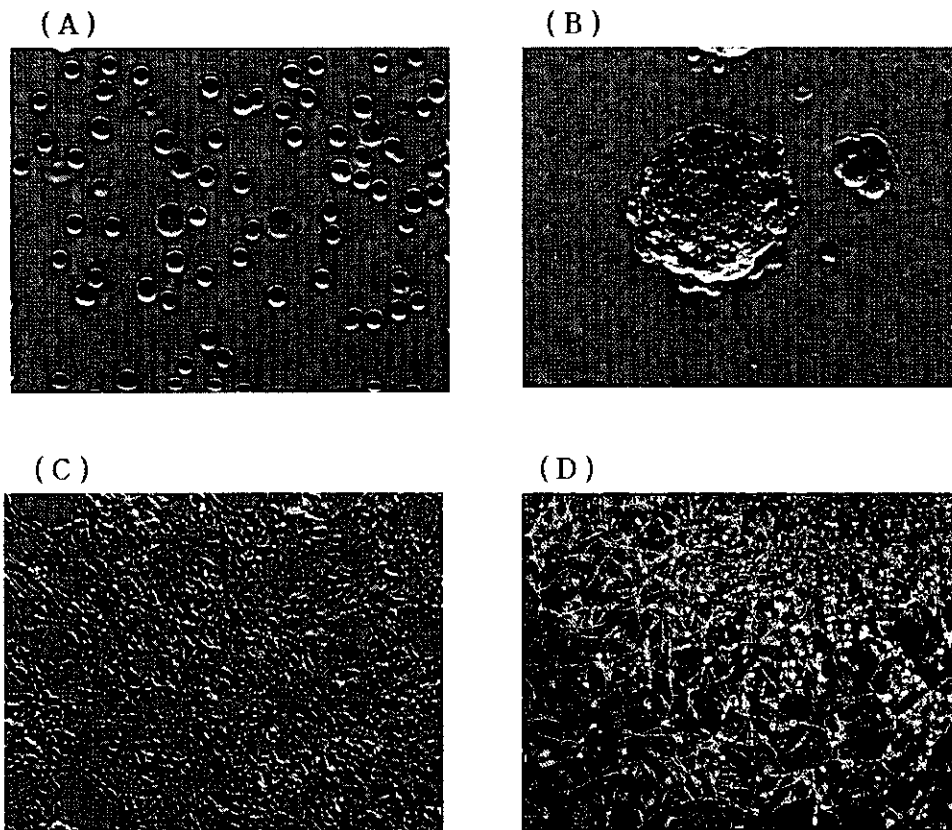


図1：神経幹細胞を、トリプシン処理ヒト胎児前脳組織より分離した状態 (A)、培養後neurosphereを形成した状態 (B)、基板に接着して神経細胞およびアストロサイトに分化した状態 (C) の位相差顕微鏡像、神経細胞分化誘導後の細胞の免疫染色像 (D)。緑色は神経細胞のマーカである抗TuJ1抗体、赤色はアストロサイトのマーカである抗GFAP抗体にて染色。

1日間、および6日間培養した細胞についての上記3つの方法により得られた、細胞増殖に比例すると考えられる測定値を用い、細胞の倍化時間（doubling time: D.T.）の計算は、培養時間t1での細胞数をN1、t2での細胞数をN2として以下の式に従って行った。

$$[D.T.] = (t2-t1) \log 2 / (\log N2 - \log N1)$$

（倫理面への配慮）

難治性中枢神経疾患の治療に大きく貢献する可能性が高いとはいえ、ヒト胎児由来の細胞を研究に用いることは社会倫理的に重要な問題を含むと考えられるため、第3者による慎重な審議を必要とする。ヒト胎児組織由来の神経幹細胞を用いた培養方法の検討については、平成11年8月に、岡野栄之が当時所属していた大阪大学医学部の倫理委員会において承認を受け、平成11年11月に山崎麻美が所属する国立大阪病院において、倫理委員会の承認を得て、両機関の共同研究として、研究を開始していた。この経緯と成果を受け継ぎつつ、平成13年4月に大阪府池田市に設立されたTERCにおいては、ヒト胎児組織由来の神経幹細胞の培養法についての検討を8月より開始した。TERCにおける実験開始に先立ち、テッシュエンジニアリング研究センター・医の倫理委員会において、「ヒト胎児由来神経幹細胞の選択的分離法および安定・大量培養法の開発、およびそれを用いた脳・脊髄の再生・修復法の開発のための基礎的研究」と題する研究申請を行い、2度の委員会審議を経て承認を受けた。（倫理委員会の構成、研究申請と議論の概要についてはTERCのHP <http://unit.aist.go.jp/terc/> 内の倫理委員会の項目参照）。

将来的には他の臓器の臓器由来の細胞を用いる可能性も考慮し、「ヒト臍帯血、ならびに胎盤組織からの体性幹細胞の分離とその特性の解明と基礎的研究」についても11月に倫理委の承認を受けて研究の準備を進めている。

C. 研究結果

ヒト胎児前脳組織をトリプシン処理した後、回収された神経幹細胞を含む単一細胞集団は図1（A）のような球形の細胞形態を有しているが、基本培地中で一週間程度培養すると増殖し、図1（B）のような細胞凝集塊（neurosphere）を形成することが確認された。さらにneurosphereを再度、バラバラにして培養すると再びneurosphereを形成することが確認された。Neurophere

を1%ウシ血清を含む培地に入れ、分化誘導を行うと、neurophereがカバーガラスに接着した後、分化誘導してきた細胞が遊走して一面に広がり、図1（C）に示すような樹状突起ならびに神経突起を伸ばして神経細胞としての形態を示す細胞へと分化した。図1（D）に示したように分化後の細胞について免疫染色を行うと、比較的早期に発現する神経細胞のマーカー分子であるTuJ1陽性の細胞に加えて、多くのGFAP陽性の細胞が観察された。分化誘導後の全細胞中での神経細胞の割合は細胞のロットなどにより変動するが、概ね10～30%程度であった。

以上の実験結果より、我々の今回用いた培養プロトコールで、自己増幅能と多分化能を保持したヒト神経幹細胞の増殖とその培養に成功したことが示唆される。後述の細胞増殖速度の測定方法の検討にはこの細胞集団を用いた。

Neurophere状態での細胞の増殖過程を測定するために、3種類の生物化学的測定方法を用いて細胞の増殖速度を測定した。BrdU取り込み法により測定された細胞の倍加時間は79.6時間、MTT法の一種であるWST-8を用いて測定された時間は81.9時間、ATP濃度測定法を用いた場合は82.3時間であり、倍加時間の値は評価方法によらずにはほぼ一致していた。

D. 考察

BrdU取り込み法は細胞内のDNA合成の指標であり、細胞の分裂増殖を評価する方法として最も標準的なトリチウム標識チミジン取り込み法と同じ原理を応用した評価法であり、今回用いた3つの方法の中では、もっとも直接的に細胞増殖を反映するものと考えられる。WST-8法は細胞増殖測定の簡便な方法として広く用いられるMTT法の改良型で、原理的にはミトコンドリア内の脱水素酵素活性に依存する方法であり、細胞の代謝活性を測定反映するため、細胞数が同じであっても酵素量が増減すれば値が増減する可能性がある。しかしながら、今回の系では反応時間を変えて測定した時間依存性の測定、細胞数を変えて測定した容量依存性の測定ともに直線性が得られている。また、細胞内のATP量を測定するATP測定法についても、細胞の代謝活性の微妙な変化に応じて変動しうる測定であり、細胞増殖を直接的に反映する方法ではないが、時間依存性、容量依存性の直線性は確かめられた。

今回の私たちの実験結果より、細胞の代謝活性が著しく変動しないという仮定をおいた上での話ではあるが、MTT法、ATP測定法ともに、BrdU取り込み法やトリチウム標識チミジン取り込み法などの代替的な測定方法として、神経幹細胞増殖の測定に簡便に利用できるものと考えられた。この方法は今後の細胞増殖至的条件の検討に際し、有力な評価方法と考えられる。

幹細胞の分離・純化法については、細胞表面抗原の探索とそれらの抗体を用いたFACS法による方法を検討している。培養した神経幹細胞の移植方法については、共同研究機関の協力を得てラットなどのモデル疾患動物を用いた実験を開始しつつある。

本年度は研究テーマの開始年度にあたり、細胞の培養条件や分離方法の基礎的検討が中心となったが、今後はこれらの研究テーマのさらなる推進に加えて、3次元的な神経組織の構築を可能とするため、神経幹細胞の増殖や分化に適した細胞培養担体の検討や神経幹細胞への遺伝子的導入法の検討なども含めた研究開発を行う予定である。

E. 結論

ヒト神経幹細胞の培養技術に関する研究をテイスシェンエンジニアリング研究センターにて開始し、自己増幅能と多分化能を維持した神経幹細胞の増殖過程の測定を行う際に、WST-8法ならびにATP測定法などの方法が利用可能であることを明らかにした。

F. 文献

- 1) 金村米博、岡野栄之、「神経幹細胞の同定法とその応用」*Clinical Neuroscience* (月刊 臨床神経科学) 20, 14-19 (2002)
- 2) Kanemura Y, Sakakibara S and Okano H. Identification of Musashi1-positive cells in human normal and neoplastic neuroepithelial tissues by immunohistochemical methods. *Molecular Medicine, Neural Stem Cells: Methods and Protocol*. In press
- 3) 金村米博、原正之、岡野栄之：神経幹細胞とその医用応用、生体材料、印刷中
- 4) Kanemura Y, Mori K, Sakakibara S, Fujikawa H, Hayashi H, Nakano A, Matsumoto T, Imai I, Ohnishi T, Fushiki F, Nakamura Y, Yamasaki M, Okano H and Arita N. Musashi1, an evolutionarily conserved neural RNA-binding protein, is a versatile marker of human glioma cells in determining

their cellular origin, malignancy, and proliferative activity. *Differentiation*, 68, 141-152, 2001

研究成果の刊行に関する一覧

著者名	題名	書名(編集者名)	発行者名 (発行地名)	巻：頁 西暦年号
有田 憲生	下垂体腺腫	今日の治療指針2001年版 —私はこう治療している (多賀須幸男, 尾形颯郎, 山田 徹, 北原光夫 編)	医学書院(東京)	231-232, 2001
横田 正幸 藤田 浩一 山浦 生也 中野 敦久 林 宏 尾崎 功 蒲 忠蔵 有田 憲生	塩酸ニカルジピンのくも膜下出血後脳血管攣縮に対する治療効果	脳血管攣縮16 (安井信之編)	中外医学社	341-344, 2001
有田 憲生 池本 秀康	下垂体腫瘍の診断・治療	日本醫事新報		4027, 18-26, 2001
Otsuki, M. Kasayama, S. Yamamoto, H. Saito, H. Sumitani, S. Kouhara, H. Saitoh, Y. Ohnishi, T. Arita, N.	Characterization of premature atherosclerosis of carotid arteries in acromegalic patients.	Chin. Endocrinol		54, 791-796, 2001
中野 敦久 池本 秀康 蒲 忠蔵 横田 正幸 有田 憲生	Picture in picture機能を備えた手術用顕微鏡使用の工夫	日本脳神経外科ビデオジャーナル		9(3): 2001
池本 秀康 松本 強 蒲 忠蔵 横田 正幸 山浦 生也 中野 敦久 尾崎 功 林 宏 有田 憲生	トルコ鞍部病変に対する顕微鏡下手術支援内視鏡の有用性	Advanced Technologyを用いた脳腫瘍の外科 (嘉山孝正 編)	メディカ出版 (東京)	242-248, 2001
森 鑑二 金村 米博 山崎 麻美 有田 憲生	神経管閉鎖不全症における癌抑制遺伝子p53の変異検査	厚生化学研究費補助金 特定疾患対策研究事業 難治性水頭症調査研究班 平成12年度研究報告書		51-56, 2001
Inagaki T. Yamada A. Kato T. Yasuda T. Yamanouchi Y. Kawamoto K.	The Management of Syringomyelia without Chiari Malformation	12th World Congress of Neurosurgery (McCulloch, Reilly, eds)		296-297, 2001
稲垣 隆介 山内 康雄 河本 圭河 神崎 秀陽	胎児診断における超音波診断装置の役割について—特にわれわれの施設での周産期カンファレンスを中心に—	Neurosonology		14: 6-9, 2001

著者名	題名	書名(編集者名)	発行者名 (発行地名)	巻：頁 西暦年号
大崎 尚 永田 文江 稲垣 隆介 山内 康雄 河本 圭司	短絡システム	小児脳神経外科手術	メジカルビュー社	54-57, 2001
山内 康雄 稲垣 隆介 河本 圭司	脳腫瘍再発時の病態生理・治療・予後	小児看護		24 : 354-359, 2001
加藤 隆行 稲垣 隆介 笠井 治文 上田 高宏 山内 康雄 河本 圭司	小児cystic tumorの一例	Oncologyの進歩		11 : 27-28, 2001
大重 英行 稲垣 隆介 今堀 巧 櫻井 靖夫 山内 康雄 上田 高宏 笠井 治文 河本 圭司	小児小脳腫瘍の一例	Oncologyの進歩		11 : 37-38, 2001
久徳 茂雄 稲垣 隆介 山内 康雄 安井 浩司 日原 正勝 南方 竜也 河本 圭司 小川 豊	10年間に経験した頭蓋縫合早期癒合症34例の検討	日本頭蓋顎顔面外科学会誌		17 : 1-12, 2001
Toda M. Iizuka Y. Yu W-J. Ikeda E. Yoshida K. Imai T. Kawase T. Mori H. Sakakibara S. Imai T. Nakamura Y. Iijima T. Suzuki A. Yuasa Y. Takeda M. Okano H.	Expression of the neural RNA-binding protein Musashi1 in human gliomas.	Glia 34		1-7, 2001
Murata T. Nagaso H. Watanabe S. Okano H. Yokoyama K.	The hiiragi gene encodes a poly(A) polymerase, which controls the formation of the wing margin in Drosophila melanogaster.	Dev.Biol.		233 : 137-147, 2001

著者名	題名	書名(編集者名)	発行者名 (発行情名)	巻：頁 西暦年号
Okabe M. Imai T. Kurusu M. Hiromi Y. <u>Okano H.</u>	Translational repression determines a neuronal potential in <i>Drosophila</i> asymmetric cell division.	Nature		411:94-98, 2001
Sawamoto K. Yamamoto A. Kawaguchi A. Yamaguchi M. Mori K. Goldman S.A. Itakura T. <u>Okano H.</u>	Visualization and direct isolation of neuronal progenitor cells by dual-color flow cytometric detection of fluorescent proteins.	J. Neurosci. Res.		65:220-227, 2001
Sawamoto K. Nakao N. Kakishita K. Ogawa Y. Toyama Y. Yamamoto A. Yamaguchi M. Mori K. Goldman S.A. Itakura T. <u>Okano H.</u>	Generation of dopaminergic neurons in the adult brain from mesencephalic precursor cells labeled with a nestin-GFP transgene.	J. Neurosci.		21:3895-3903, 2001
Sawamoto K. Nakao N. Kobayashi K. Matsushita N. Takahashi H. Kakishita K. Yamamoto A. Yoshizaki T. Terashima T. Murakami F. Itakura T. <u>Okano H.</u>	Visualization and direct isolation of midbrain dopaminergic neurons expressing GFP.	Proc. Natl. Acad. Sci. USA		98:6423-6428, 2001
Uchida M. Hanai S. Uematsu N. Sawamoto K. <u>Okano H.</u> Miwa M. Uchida K.	Genetic and functional analysis of PARP, a DNA strand break-binding enzyme.	Mutat Res		47:89-96, 2001
Ishida Y. Nakamoto H. Imai H. Suzuki S. <u>Okano H.</u> Suzuki H.	Heme oxygenase-1 regulates vascular tone of the peritoneum undergoing peritoneal dialysis.	Advances in Peritoneal Dialysis		17:15-19, 2001
Li R-Y Baba S. Kosugi I. Arai Y. Kawasaki H.	Activation of murine cytomegalovirus immediate-early promoter in cerebral ventricular zone and glial progenitor cells in transgenic mice.	Glia		35:41-52, 2001

著者名	題名	書名(編集者名)	発行者名 (発行地名)	巻 : 頁 西暦年号
Shinmura Y. Sakakibara S. <u>Okano H.</u> Tsusui Y.				
Yagita Y. Kitagawa K. Otsuki T. Kuwabara K. Mabuchi T. Miyata T. <u>Okano H.</u> Hori M. Matsumoto M.	Neurogenesis by progenitor cells in the ischemic adult rat hippocampus.	Stroke		32, 1890-1896, 2001
Miyata T. Kawaguchi A. <u>Okano H.</u> Ogawa M.	Asymmetric inheritance of radial glial fibers to neurons during corticogenesis in mice.	Neuron		31, 727-741, 2001
Kohyama J. Abe H. Shimazaki T. Koizumi A. Nakashima K. Taga T. <u>Okano H.</u> Hata J. Umezawa A.	Brain from Bone: Efficient "meta-differentiation" of marrow stromal-derived mature osteoblasts to neurons with Noggin or a demethylating agent.	Differentiation		68, 235-244, 2001
Keyoung H.M. Roy N.S. Benraiss A. Louissaint A. Jr. Suzuki A. Hashimoto K. Rashbaum W.K. <u>Okano H.</u> Goldman S. A.	Prospective identification, selection and extraction of two distinct pools of neural stem cells from fetal human brain.	Nature Biotech.		19, 843-850, 2001
Sakakibara S. Nakamura Y. Satoh H. <u>Okano H.</u>	RNA-binding protein Musashi2: developmentally regulated expression in neural precursor cells and subpopulation of neurons in mammalian CNS.	J. Neurosci.		21, 8097-8107, 2001
Yamamoto N. Matsunaga E. Yamamoto S. Kobayashi D. Torii M. Kawaichi M. Kishi N. Matsuno K. <u>Okano H.</u> Nakafuku M.	Deltex as a nuclear signal transducer downstream of the Notch receptor.	J.Biol.Chem.		276, 45031-45940, 2001
Saunders P.T.K. Maguire S.M. Macpherson S. Fenelon M.C.	The RNA binding protein Musashi1 (Msi1) is expressed in the cytoplasm and nucleus of Sertoli cells in the rat testis from fetal life to adulthood.	Biology of Reproduction		66, 500-507, 2002

著者名	題名	書名(編集者名)	発行者名 (発行地名)	巻 : 頁 西暦年号
Sakakibara S. Okano H.				
坂本 博昭 山崎 麻美 金村 米博 岡本 伸彦 森 鑑二 北野 昌平 西川 節	葉酸代謝酵素5、10metylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) 遺伝子 C677T の解析。	厚生科学研究費補助金 特定疾患対策研究事業 難治性水頭症調査研究班 平成12年度研究報告書		40-44, 2001
坂本 博昭 北野 昌平	術前管理	小児脳神経外科、脳腫瘍神 経外科 New approach 10、 小児脳神経外科	メジカルビュー社(東京)	2-7, 2001
坂本 博昭 北野 昌平	Tethered spinal cord.	Annual review 神経 2001	中外医学社 (東京)	304-310, 2001
西川 節 坂本 博昭 韓 正訓 安井 敏裕 小宮山雅樹 岩井 謙春 北野 昌平 山中 一浩 中島 英樹 森川 俊枝 岸 廣成	頚椎・頚髄損傷における椎骨動脈損傷の臨床的検討	脊髄外科		15 : 97-103, 2001
山中 一浩 坂本 博昭 北野 昌平 森川 俊枝 井上 健 小林 庸次	Pineoblastomaと思われた1症例	Oncologyの進歩		11 : 32, 2001
Komiyama M. Kitano S. Sakamoto H. Ehara E. Miyagi N. Kusuda S.	Rapid Normalization of Marked Dilatation of the Cerebral Duro-Venous System in a Newborn Infant Mimicking a Great Vein of Galen Varix.	Pediatric Neurosurgery		35 : 149-152, 2001
Komiyama M. Nakajima H. Nishikawa M. Yasui T. Kitano S. Sakamoto H.	Leptomeningeal contrast enhancement in moyamoya disease: its potential role in the post-operative assessment of the collateral circulation through the bypass.	Neuroradiology		43 : 17-23, 2001
Ishii, K. Toda, M. Nakai, Y. Asou, H. Watanabe, M. Nakamura, M. Yato, Y. Fujimura, Y.	Increase of oligodendrocyte progenitor cells after spinal cord injury.	J Neurosci Res.		65:500-507, 2001

著者名	題名	書名(編集者名)	発行者名 (発行地名)	巻 : 頁 西暦年号
Kawakami, Y. Toyama, Y. Uyemura, K.				
Niki, Y. Matsumoto, H. Otani, T. Suda, Y. Toyama, Y.	Metal ion concentrations in the joint fluid immediately after total knee arthroplasty.	Mod Rheumatol		11:192-196, 2001
Aizawa, M. Ito, K. Itatani, K. Suemasu, H. Nozue, A. Okada, I. Matsumoto, M. Isikawa, M. Matsumoto, H. Toyama, Y.	In vivo and in vitro evaluation of the biocompatibility of the hydroxyapatite-PMMA hybrid materials having mechanical property similar to that of cortical bone.	Key Engineering Materials		218-220:465-468, 2002
Matsumoto, M. Chiba, K. Tsuji, T. Mruwa, H. Toyama, Y. Ogawa, J.	Use of a titanium mesh cage for posterior atlantoaxial arthrodesis (Technical note).	J Neurosurg (Spine 1)		96 : 127-130, 2002
Ochi, K. Mori, T. Toyama, Y. Nakamura, Y. Arakawa, H.	Identification of Semaphorin3B as a direct target of p53.	Neoplasia		4(1):82-87, 2002
千葉 一裕 戸山 芳昭	特集/腰部脊柱管狭窄(症) - 臨床症状と診断の進め方	NEW MOOK 整形外科No.9 (越智隆弘、菊池臣一編集)	金原出版	73-80, 2001
松本 守雄 藤村 祥一 石井 貞 戸山 芳昭	特集/腰部脊柱管狭窄(症) - 腰椎変性すべり症に対する前方固定術	NEW MOOK 整形外科No.9 (越智隆弘、菊池臣一編集)	金原出版	212-220, 2001
千葉 一裕 戸山 芳昭	特集/腰部脊柱管狭窄(症) - 変形側弯を伴う腰部脊柱管狭窄症	NEW MOOK 整形外科No.9 (越智隆弘、菊池臣一編集)	金原出版	281-288, 2001
渡辺 雅彦 戸山 芳昭 松本 守雄	慢性関節リウマチの手術療法/RA頭椎病変	リウマチナビゲーター (中村耕三、山本一彦、原まさ子編集)	メディカルビュー社	254-255, 2001
Ptak, A. Takeda, S. Nakamura, C. Miyake, J.	Modified atomic force microscope applied to the measurement of elastic modulus for a single peptide molecule	J. Applied Physics.		90, 3095-3099, 2001
Kageshima, M. Mark A. Lantz, Suzanne P. Jarvis, Tokumoto, H. Takeda, S.	Insight into conformational change of a single alpha-helix peptide molecule though stiffness measurements, Chem.	Physics Letters		343, 77-82, 2001

著者名	題名	書名(編集者名)	発行者名 (発行地名)	巻：頁 西暦年号
Arkadiusz Ptak, Nakamura, C. <u>Miyake, J.</u>				
Takeda, S. Arkadiusz Ptak, Nakamura, C. <u>Miyake, J.</u> Kageshima, M. Suzanne P. Jarvis Tokumoto, H.	Measurement of the Length of the α Helical Section of a Peptide Directly Using Atomic Force Microscopy	Chemical Pharmaceutical Bulletin		49, 2001 in press
X-Y. Liu, Q. Yang, Nakamura, C. <u>Miyake, J.</u>	Avidin-biotin-immobilized liposome column for chromatographic fluorescence on-line analysis of solute-membrane interactions	J. Chromatography B		750, 51-60, 2001
X-Y. Liu, Yang, Q. Kamo, N. <u>Miyake, J.</u>	Effect of liposome type and membrane fluidity on drug-membrane partitioning analyzed by immobilized liposome chromatography	J. Chromatography A		913, 123-131, 2001
X-Y. Liu, Nakamura, C. Qing Yang <u>Miyake, J.</u>	Phospholipase A2-Catalyzed Membrane Leakage Studied by Immobilized Liposome Chromatography	Anal. Biochem.		293, 251-257, 2001
Dong-Jin Qian, Nakamura, C. <u>Miyake, J.</u>	Spectroscopic Studies of the Multiporphyrin Arrays at the Air-Water Interface and in Langmuir-Blodgett Films	Thin Solid Films		397, 266-275, 2001
Dong-Jin Qian, Nakamura, C. <u>Miyake, J.</u>	Layer-by-layer assembly of metal-mediated multiporphyrin arrays	Chem. Commun.		in press
Aizawa, H. Kurosawa, S. Tanaka, M. Yoshimoto, M. <u>Miyake, J.</u> Tanaka, H.	Rapid diagnosis of <i>Treponema pallidum</i> in serum using latex piezoelectric immunoassay	Analytica Chimica Acta		437, 167-169, 2001
Aizawa, H. Kurosawa, S. Tanaka, M. Wakida, S. Zainal Abidin Talib, Jong-Woo Park, Yshimoto, M. Muratsugu, M. Jons Hilborn, <u>Miyake, J.</u> Tanaka, H.	Conventional Dagnosis of <i>Treponema Plidum</i> in serum using latex piezoelectric immunoassay	Material Sci. Eng. C		17, 127-132, 2001
K. Gibasicwicz, R. Naskrecki, M. Ziolk, M. Lorenc, J. Karolczak,	Electron Transfer in the Reaction Center of the Photosynthetic Bacterium <i>Rb. Sphaeroides</i> R-26 Measured by Transient Absorption in the Blue Spectral Rnage	J. Fluorescence		11, 33-40, 2001

著者名	題名	書名(編集者名)	発行者名 (発行地名)	巻：頁 西暦年号
J. Kubicki, J. Goc, <u>Miyake, J.</u> A. Dobek,				
Z. A. Talib, Kurosawa, S. B. Atthoff, Aizawa, H. Kashima, K. Hirokawa, T. Yoshimi, Y. Yoshimoto, M. Hirotu, T. <u>Miyake, J.</u> Hilborn, J.	Plasma polymerization of silicon-containing monomers	J. Photopolymer Science and Technology		14. 129-138, 2001
Aizawa, H. Kurosawa, S. Ogawa, K. Yoshimoto, M. <u>Miyake, J.</u> Tanaka, H.	Conventional diagnosis of C-reactive protein in serum using latex piezoelectric immunoassay	Sensors and Actuators B		76. 173-176, 2001
J. Lukasiewicz, Ihara, M. <u>Miyake, J.</u> D. Wrobel, D. Frackowiak,	Spectral properties of the stilbazolium merocyanines oriented in stretched polymer films and Langmuir-Blodgett monolayers	J. Photochem. Photobiol. A: Chem		138. 235-244, 2001
Nakamura, C. Inuyama, Y. Shirai, K. Sugimoto, N. <u>Miyake, J.</u>	Detection of Porphyrin Using a Short Peptide Immobilized on a Surface Plasmon Resonance Sensor Chip	Biosensors and Bioelectronics		16. 1095-1100, 2001
Nakamura, C. Inuyama, Y. Shirai, K. Nakano, S. Sugimoto, N. <u>Miyake, J.</u>	Analysis for peptide binding to porphyrin using surface plasmon resonance	Synthetic Metals		117. 127-129, 2001
Nakamura, C. Noda, K. Nikolay A. Zorin, Akutsu, H. <u>Miyake, J.</u>	Cytochrome c3 -Langmuir-Blodgett Film for Hydrogen Evolving Device	Synthetic Metals		117. 285-288, 2001
Hara, M. <u>Miyake, J.</u>	Calcium alginate gel-entrapped liposomes	Material Sci. Eng. C		in press
Xue-Ying Liu, Qing Yang, Hara, M. Nakamura, C. <u>Miyake, J.</u>	A novel chromatographic solid support with immobilized unilamellar liposomes for model analysis of solute-membrane interaction: comparison with analysis using immobilized artificial membranes and free liposomal membranes	Material Sci. Eng. C		in press

著者名	題名	書名(編集者名)	発行者名 (発行地名)	巻：頁 西暦年号
Hara, M. Yamaki, A. Miyake, J.	Noninvasive detachment of cultured cells on gels	Material Sci. Eng. C		in press
Hara, M. Yasuda, Y. Toyotama, H. Ohkawa, H. Nozawa, T. Miyake, J.	A novel ISFET-type biosensor based on P450 monooxygenase	Biosensors and Bioelectronics		in press
Kondo, T. Arakawa, M. Hirai, T. Wakayama, T. Hara, M. Miyake, J.	Enhancement of hydrogen production by a photosynthetic bacterium mutant with reduced pigment	J. Biosci. Bioeng		in press
K. Klaczynska, A. Dudkowiak, D. Frackowiak, A. Planner, Hara, M. Miyake, J.	Polarized photoacoustic spectra of green bacteria cells	Current Topics in Biophysics 24		in press
<u>山崎 麻美</u>	二分脊髄・脊髄係留症候群	脊髄脊髄ジャーナル	三輪書店	14(6): 529-531, 2001
<u>山崎 麻美</u>	先天性疾患	New脳神経外科手術マニュアル(石田忠生編)	メディカ出版(大阪)	26-31, 2002
<u>山崎 麻美</u>	小児神経外科疾患の基礎 小児脳神経外科疾患と遺伝子異常	CLINICAL NEUROSCIENCE Vol20	中外医学社(東京)	No3: 263-266, 2002
大槻 秀夫 中谷 進 <u>山崎 麻美</u> 木下 章 岩本 文徳 香川 尚己 北村 文	超音波造影剤とCoded Harmonic Angioを用いた、開頭手術術中超音波アンギオ	映像情報Medical		48-52, 2001
木下 章 中谷 進 大槻 秀夫 <u>山崎 麻美</u> 森内 秀祐 北村 文 澤田 憲治	頰動脈瘤(lateral type)に対するcovered stentの応用について Intra-arterial stents with either PTFE sheets or autologous venous grafts to opacify the wide-necked aneurysms..PartII	日本血管内治療学会誌		3: 4-7, 2002
中山登志子 王腰 曉子 川村 孝 稲葉 裕 森竹 浩三 <u>山崎 麻美</u>	先天性水頭症全国疫学調査成績	厚生科学研究特定疾患対策研究事業 特定疾患の疫学に関する研究班 平成12年度研究業績集		83-86, 2001

著者名	題名	書名(編集者名)	発行者名 (発行地名)	巻：頁 西暦年号
Kaneyama Y. Mori K. Sakakibara S. Fujikawa H. Hayashi H. Nakano A. Matsumoto T. Tamura K. Imai T. Ohnishi T. Fushiki S. Nakamura Y. Yamasaki M. Arita N. Ohnishi T. Fushiki S. Nakamura Y.	Musashi1, an evolutionarily conserved neural RNA-binding protein, is a versatile marker of human glioma cells in determining their cellular origin, malignancy, and proliferative activity.	Differentiation		68:141-152. 2001
金村 米博 岡本 伸彦 森本 一良 森 鑑二 高橋 義男 藤田 浩史 横谷 進 佐藤 博美 松田 純子 西 美和 石田 憲生 山崎 麻美	X-linked hydrocephalusにおけるL1CAM遺伝子異常の解析 —新規遺伝子異常11家系の報告と欧米報告例との比較—	厚生科学研究費補助金 特定疾患対策研究事業 難治性水頭症調査研究班 平成12年度研究報告書		33-39. 2001
伏木 信次 矢追 毅 金村 米博 山崎 麻美	水頭症バンク金前脳胞症患者5例における遺伝子異常の解析	厚生科学研究費補助金 特定疾患対策研究事業 難治性水頭症調査研究班 平成12年度研究報告書		45-47. 2001
岡本 伸彦 山崎 麻美 金村 米博	小脳形成異常症におけるZIC1、Engrailed-2遺伝子異常の検索	厚生科学研究費補助金 特定疾患対策研究事業 難治性水頭症調査研究班 平成12年度研究報告書		48-50. 2001
山崎 麻美 金村 米博 岡本 伸彦	先天性水頭症の遺伝子診断	産婦人科の実際		51:365-372. 2002
Otsuki, H. Nakatani, S. Yamasaki, M. Kinoshita, A. Iwamoto, F. Kagawa, N.	Intraoperative ultrasowd cuteriogrephy using Coded Havmonic Angio.	J. neurosurg		94:992-995. 2001

厚生科学研究費補助金 脳科学研究事業
脊髄髄膜瘤の脊髄・末梢神経機能回復法の開発研究班
平成13年度総括・分担研究報告書

平成14年3月29日 印刷

平成14年4月10日 発行

発行 厚生科学研究費補助金 脳科学研究事業
脊髄髄膜瘤の脊髄・末梢神経機能
回復法の開発に関する研究班
主任研究者 山崎 麻美

〒540-0006 大阪市中央区法田坂2-1-14

国立大阪病院 脳神経外科

製作 クォーター

〒545-0014 大阪市阿倍野区西田辺1-16-6
