

厚生労働省科学研究補助金（萌芽的先端医療技術推進研究事業）

平成16年度
総括・分担研究報告書

ナノテクノロジーによる機能的・
構造的生体代替デバイスの開発
(H14-ナノ-002)

主任研究者：杉町 勝
(国立循環器病センター研究所)

平成17(2005)年3月

厚生労働省科学研究補助金（萌芽的先端医療技術推進研究事業）

平成16年度
総括・分担研究報告書

ナノテクノロジーによる機能的・
構造的生体代替デバイスの開発
(H14-ナノ-002)

主任研究者：杉町 勝
(国立循環器病センター研究所)

平成17（2005）年3月

目 次

1. 総括研究報告書

- ナノテクノロジーによる機能的・構造的生体代替デバイスの開発 1
国立循環器病センター研究所
杉町 勝

2. 分担研究報告書

- I バイオニックナノメディスンによる循環調節機能代替デバイスの開発研究 2 0
バイオニック神経制御システム植込み装置の二次試作
国立循環器病センター研究所
杉町 勝
- バイオニック医学による心不全治療戦略の確立 3 5
国立循環器病センター研究所
高木 洋
- バイオニック医学による重症起立性低血圧治療開発に関する基礎研究 4 4
国立循環器病センター研究所
川田 徹
- バイオニック動脈圧反射装置の臨床開発に関する研究 5 6
高知大学医学部
佐藤 隆幸
- 体内無線通信に関する研究 7 2
株式会社 日立製作所中央研究所
小久保 優
- イヌにおけるバイオニック心不全治療の検討 1 1 1
九州大学大学院
砂川 賢二
- バイオニックナノインプラント・ナノペーシングシステムのための情報通信技
術の研究開発 1 2 3
横浜国立大学大学院
河野 隆二
- 複合酵素を用いるグルコース燃料電池の開発 1 3 7
東北大学大学院
末永 智一

Ⅱ ナノ分子操作技術による血液界面代替デバイスの開発研究 To Surface テクノロジ開発、微細加工工学デバイスの開発	143
国立循環器病センター研究所 妙中 義之	
Ⅲ ナノ生化学系による非細胞性代謝機能代替デバイスの開発研究 装置化へ向けた各種素材および基盤技術の統合	150
国立成育医療センター研究所 絵野沢 伸	
機能性プロテオリポソームの開発	159
大阪大学大学院 久保井 亮一	
薬物代謝機能発現環境の最適化	169
大阪大学大学院 大政 健史	
薬剤輸送トランスポーターのメカニズム解析とバイオ人工肝開発に向けた研究	177
京都大学大学院 植田 和光	
リポソーム微細構造観察法の開発	183
独立行政法人 産業医学総合研究所 三枝 順三	
薬物トランスポーター機能発現環境の最適化	189
自治医科大学 藤村 昭夫	
A T P 再生システムの検討	195
広島大学大学院 黒田 章夫	
3. 刊行物一覧	202
4. 論文別刷り	212

厚生労働科学研究費補助金（萌芽的先端医療技術推進事業）
平成16年度総括研究報告書

ナノテクノロジーによる機能的・構造的生体代替デバイスの開発

主任研究者 杉町 勝（国立循環器病センター研究所 部長）

研究要旨：

医学の進歩によってもなお治療が困難な疾患が数多く存在する。これまでの「原因追求型」の研究では治療の目的を達成できない難治性の疾患に対して生体の機能を代替する、または異常になってしまった生体機能を正常化するための人工の医療機器を用いる新しい治療法の開発が必要である。このいわば「機能再建型」の治療に関する研究は、高齢者の増加や疾患の重症化にともないますますその重要性を増すものと考えられる。

本研究では、①ナノテクノロジーを駆使した高機能 LSI、生体内通信、生体燃料電池による循環調節機能の植込み代替医療機器「神経制御システム」プラットフォームの開発および高機能ペースメーカ「超小型分散ペースングシステム」の基盤技術開発、②多くの循環器系植込み機器の血液界面に必要な生体のもつ抗血液凝固性をナノ分子操作技術を用いて代替し実現する方法の開発、③生体細胞の必要な機能のみを抽出し脂質膜上で代替する非細胞性ナノ生化学系の開発を行うことを目的とする。

本年度の研究では下記の成果を達成した。

- ①バイオニック心不全治療のための植え込み神経制御システムの一次試作を機能確認し、抽出した問題点を改良した二次試作を行った。バイオニック心不全治療は食塩嗜好性やバゾプレッシン分泌を低下させ、中枢作用が関与していた。大動物でのバイオニック心不全治療実験を開始した。体内超音波通信装置を試作し、電波による UWB 通信の可能性を検討した。また電極に酵素などの複合体を固定化した生体燃料電池が現実的な電力を供給しうる見通しを得た。
- ②ナノ表面改質による抗血栓性により人工肺を含む補助人工心臓が可能であることを示した。抗血栓性の機序には細胞接着の阻害が関与していた。
- ③ポリリン酸を用いたエネルギー再生系構築の見通しを得た。プロテオリポソームの異物取り込み能に影響する脂質組成や熱、酸化ストレスに対する安定性を検討した。

分担研究者

杉町 勝	国立循環器病センター研究所 循環動態機能部
高木 洋	国立循環器病センター研究所 循環動態機能部
川田 徹	国立循環器病センター研究所 循環動態機能部

砂川 賢二	九州大学大学院医学研究院 臨床内科部門
佐藤 隆幸	高知大学医学部 循環制御学
河野 隆二	横浜国立大学大学院工学大学院 知的構造の創生部門
小久保 優	㈱日立製作所中央研究所 情報システム研究センタ通信システ

末永 智一	ム研究部 699 研究ユニット 東北大学大学院環境科学研究科 環境科学専攻
妙中 義之	国立循環器病センター研究所 人工臓器部
絵野沢 伸	国立成育医療センター研究所 移植・外科部門
久保井 亮一	大阪大学大学院基礎工学研究科 化学系専攻
大政 健史	大阪大学大学院工学研究科 応用 生物工学専攻
藤村 昭夫	自治医科大学 臨床薬理学
三枝 順三	(独) 産業医学総合研究所 人間 工学特性研究部
植田 和光	京都大学大学院 農学研究科 応用 生命科学専攻
黒田 章夫	広島大学大学院 先端物質科学 研究科

A. 研究目的

現代医学は多くの疾患に有効な治療法を提供してきたが、なお治療が困難な疾患も数多く存在する。これまでに確立した治療法は、明らかになった疾患の原因を早期に排除するにより行われてきた（原因追求型）。しかしながら原因が特定できない場合や、多数の原因が複雑に絡む場合、原因を特定してもその排除ができない場合、疾患が完成して後遺症が残ってしまう場合にはこれまでの方法では治療の目的を達成できないことがある。

このような難治性の疾患に対して生体の機能を代替する、または異常になってしまった生体機能を正常化する「機能再建型」の治療の開発が必要である。今後、高齢者の増加や疾患の重症化にともない「機能再建型」の治療はますますその重要性を増すものと考えられる。

本研究では、①ナノテクノロジーを駆使した高機能 LSI、生体内通信、生体燃料電池によ

る循環調節機能の植込み代替医療機器「神経制御システム」プラットフォームの開発および高機能ペースメーカ「超小型分散ペースングシステム」の基盤技術開発、②多くの循環器系植込み機器の血液界面に必要な生体のもつ抗血液凝固性や種々の特性をナノ分子操作技術を用いて代替し実現する方法の開発、③生体細胞の必要な機能のみを抽出し脂質膜上で代替する非細胞性ナノ生化学系の開発を行うことを目的とする。

A-1. バイオニックナノメディスンによる循環器調節機能デバイスの開発研究

重症心不全は高度な現代医療をもってしてもなお予後の不良な疾患である。近年の調査によれば、重症心不全の5年生存率はこの40年間にわずか10%しか改善していないことが報告されており、心不全患者の治療にはさらに画期的な治療法が必要である。心不全は心臓だけの病気ではなく、循環器系の調節系にも大きな変化がもたされていることが明らかになっている。この循環調節系の異常は心不全の病態の維持、重症化に関与していることも次第に明らかになっており、循環調節系に人工的に介入することで心不全の進行や重症化を阻止できるのではないかと考えられる。

すでにバイオニック迷走神経刺激による心不全治療によって、重症心筋梗塞後ラットの心臓リモデリングが抑制、心機能低下が抑制され、生存率の劇的な改善が見られることが明らかになった。

本年度は、昨年度開発したバイオニック心不全治療のための植込み治療機器の一次試作に関して機能確認を行い、抽出した問題点を改良した二次試作を開発した。それとともにバイオニック迷走神経刺激による心不全治療の機序をさらに検討し、大動物への展開、副作用への対応の検討を行った。また超小型分散型ペースメーカに必要な体内通信とバイオ燃料電池の開発を行った。

A-2. ナノ分子操作技術による血液界面代替デバイスの開発研究

循環器系組織は常に血液にさらされているため、それらの機能を代替するデバイスの長期維持は、血液凝固の回避能に大きく依存している。血液適合性はデバイスのナノメートルレベルでの極最表面層の物性と構造で決定される。予め精緻に構造設計されたナノ構造体をデバイス表面にカセット化する To Surface テクノロジ（表面へのナノ操作）を最大限に利用することにより、既存技術では不可能であった長期使用可能な高機能治療デバイスが実現可能となり、高度先端医療の推進が加速されると考えられる。

A-3. ナノ生化学系による非細胞性代謝機能代替デバイスの開発研究

血液濾過透析や血漿交換を組み合わせた血液浄化法は中空糸カラムの出現により急速に発展し、現在も劇症肝炎をはじめ様々な疾患に対する治療法の基幹をなしている。しかしながら、ひとりの患者に対し大量の血漿が必要であることや亜急性劇症肝炎では昏睡からの一時的な覚醒効果はみられるものの最終的な救命率の向上は得られないなど問題点も多い。このような現行の血液浄化法の限界の背景には、中空糸カラムによる血中物質の除去が単に膜の孔径にのみ依存し、生体にとって要不要の別なく排除してしまうという原因が考えられる。

工学的手法を補う目的で肝細胞あるいは腎細胞を利用したバイオ人工肝・人工腎の開発がなされているが、生細胞を用いる場合、医療機器としての品質管理や安全性確保が難しい。そこで細胞全体から、バイオ人工臓器の構成に必要な機能だけを選択・抽出し、ナノメートルスケールの人工膜上に生理機能を構築するという戦略が考えられる。細胞表面に存在し、細胞内外の物質輸送を行うチャネル

ルタンパク分子を人工膜に固定化するという新規な発想による血液浄化システムを開発する。こうして再構成された人工合成膜により生きた細胞のように統合した選択的・能動輸送を実現させることが目標である。

B. 研究結果および C. 研究結果

BC-1. パイオニックナノメディスンによる循環器調節機能デバイスの開発研究

BC-1-1. パイオニック神経制御システムの試作

本年度は昨年度の一次試作の機能評価を行ったのち、明らかになった問題点を検討し解決するために二次試作を行った。まず基本的な機能の確認を体外で行った。搭載ソフトウェアのデバッグを行った結果、仕様で規定される範囲内において、神経刺激の条件（パルス幅、パルス頻度、パルス電流）、心臓刺激の条件（パルス幅、パルス頻度、パルス電圧）、心拍検出の閾値、デマンドペーシングの論理（過度の徐脈に対しては心臓刺激が発生）、心拍数の履歴による神経刺激条件の決定論理（畳込積分による条件算出）などを確認した。これらはいずれも無線通信により条件の変更が可能であった。しかしながら Bluetooth 方式に比し外部給電 RFID 方式ではアンテナが大きい上に通信が不安定であった。通信の不安定さは体内での使用ではさらに明らかとなった。一方、体内での使用の検討から、エポキシ樹脂による簡易防水処理に代わりチタン性の金属容器への収納が必要と考えられた。アンテナ部分は金属外への配置が可能であるが容器との相互作用も生じるため、通信機能の安定性向上が必須と考えられた。

そこで回路、通信用素子、アンテナ等の見直しを行った結果、安定した無線を確保しつつ金属容器による回路の完全防水を確保する見通しを得た。また一次試作では搭載ソフトウェア自体の無線通信による書き換えはでき

なかった（パラメタのみが変更可能）、二次試作では搭載ソフトウェア自体の書き換えを可能とした。今後この二次試作を用いてイヌでの最適神経刺激条件の設定を行う。

BC-1-2. バイオニック心不全治療の機序検討

バイオニック心不全（迷走神経刺激）治療の機序については本年度もさらに検討した。8週令のオス SD ラットの左冠状動脈の基部を結紮し急性心筋梗塞（40～50%）を作った。1週間後、生き残った心筋梗塞ラットを2群（迷走神経刺激群、非刺激群）に分け、刺激群ではテレメトリ装置、無線電気刺激装置（右迷走神経）を植え込んだ。さらに回復させ1週間後まで生存したラット35匹（刺激群20匹、非刺激群15匹）に自由に飲み水、高張食塩水（1.8%NaCl）と餌を与えた。平均心拍数を20～30bpm低下させるように迷走神経を（電流0.1～0.13mA、パルス幅0.2ms、頻度20Hz）1分間に10秒だけ間欠刺激した。週1回ハロセン麻酔下で頸静脈から約1.5mlの採血を行った。バイオニック心不全治療を6週間で終了し、再度ハロセン麻酔下で、血行動態を測定した後、屠殺して組織学的に心臓リモデリングを評価した。心不全治療6週間後までではあるが、ラットの生存率も検討した。

両群間の飲水量（食塩を含まない水の摂取量）に有意差は認めなかったが、食塩摂取量は（高張食塩水の摂取量）、治療して1週目から、迷走神経刺激群で有意に低かった（ 4.3 ± 3.0 vs 5.2 ± 3.4 g/kg/day, $p < 0.05$ ）。バゾプレッシンの血中レベルは迷走神経刺激群で有意に低く（ 631 ± 210 vs 880 ± 197 pg/ml, $p < 0.005$ ）、BNPの血中レベルもVS-Na群で有意に低かった（ 305 ± 76 pg/ml vs 429 ± 55 pg/ml, $p < 0.001$ ）。

両群間で梗塞領域の大きさには有意差がなかったが、心重量（体重当たり）は迷走神経刺激群で有意に小さく（ 2.92 ± 0.40 vs $3.42 \pm$

0.42 g/kg, $p < 0.005$ ）。非刺激群のみで高張食塩水投与によりさらに心重量が有意に増加した（ 3.42 ± 0.42 vs 3.14 ± 0.22 g/kg, $p < 0.05$ ）。高張食塩水を自由に摂取させることで、非刺激群では心室リモデリングがより進行した。しかし高張食塩水を自由に摂取させてもバイオニック心不全治療を行えば、食塩摂取は増加せず心室リモデリングが抑制された。

高張食塩水を自由に摂取させて迷走神経刺激によるバイオニック心不全治療を行ったところ、有意差はないが生存率は改善傾向であった（75% vs 91%, $p = 0.17$ ）。同じ経過期間の時点で比較すると、これらの生存率は平成14年度行ったバイオニック心不全治療での生存率曲線上にほぼ重なった。

BC-1-3. バイオニック心不全治療の大動物への展開

重症心不全ラットで劇的に見られた迷走神経刺激によるバイオニック心不全治療法の子後改善効果を臨床へ向けてトランスレーションするため、イヌにおけるバイオニック心不全治療の検討を行った。有効性を大動物で確認するとともに、安全性について検討する実験を開始した。副作用がなく効果が最大の迷走神経刺激条件を設定することを目的とした。心不全モデルは冠動脈内に血管閉塞用のコイルを留置して作製した。主幹冠動脈に加え側副血行路に接続する細い冠動脈を塞栓することにより心筋梗塞を作製してその範囲を制御することが可能となった。またイヌにおける迷走神経刺激法を検討したところ、迷走神経の比較的強い刺激により徐脈を誘発することが可能であった。しかし強い刺激では実験動物が悪心を催した。覚醒下において、刺激頻度5～21Hz、刺激幅210～450 μ s、刺激強度3～5Vの組み合わせにおいて、実験動物に対して悪心を催さずかつ筋収縮を引き起こさずに、心拍数を10%低下させる刺激パターンを決定することができた。最適刺激は、10Hz、

450 μ s、2Vであった。しかしながら長期の刺激安定性が不十分であるので迷走神経電極の改良を行っている。

BC-1-4. バイオニック心不全治療の副作用抑制方法の検討

副作用抑制の方法として、大動脈減圧神経刺激による交感神経抑制・迷走神経賦活法の検討を行った。減圧神経刺激では循環器系以外への遠心路や求心路の刺激がなく、迷走神経に混入した交感神経を刺激することも避けられる。減圧神経刺激の急性救命効果をラットで確認したところ、中等度の刺激条件で生存率が向上し、その大部分は迷走神経の賦活を介する作用であることが明らかになった。

BC-1-5. 超小型分散ペースングシステムの開発

超小型ペースメーカは、多数配置して最適の時相にペースングすることで超低電力除細動に用いられる可能性がある。昨年度はシミュレーションによって、超小型ペースメーカの植込み部位で不応期を脱した瞬間にオーバードライブペースングを行うことで除細動が可能であることを示した。しかしながらシミュレーションには多くの仮定が使われているため、実際に動物の心臓での検証が必要である。本年度は、不応期を脱した瞬間を正確に捉えることができる光マッピングによる測定を用いて、オーバードライブペースングを行うことのできる装置を開発した。

BC-1-6. 体内通信の開発

電波方式に関しては、中心周波数と帯域、情報の伝送方式などを検討し、UWB 無線方式が対干渉性、低電力化の点で優れていることを明らかにした。生体内及び生体外の無線通信を実現するために、体内伝搬路モデルを考えた。人体の各組織の電氣的組成を数値化した人体数値ファントムを用いて FDTD 法

による電磁界シミュレーション解析を行うことにより、遅延時間領域での多重波伝播特性の評価を行った。また、生体内で UWB 通信を行うことを計算機シミュレーションし、ビット誤り率を評価基準とすると最適中心周波数は 2.5GHz となった。さらにその結果を基にして回線設計を行うことにより、最小給電電力は 10.2 μ W、最大通信可能距離は 8cm となった。また、1m の距離にある体外機器との通信を行う際の最大埋め込み可能深さは 3cm となった。生体に対する影響として、熱効果を表す指標である SAR を基準とした評価を行い、出力 2mW、中心周波数 2.5GHz の場合の平均 SAR の最大値は 0.7W/kg となり、わが国における規制基準 2.0W/kg を下回ることがわかった

超音波方式に関しては、送信側振動子と受信側振動子をそれぞれ水に浸し対面させた昨年度の超音波伝搬特性実験において、実験的に求めた振動子の共振周波数が理論的に求めたものと一致しないという問題が生じていた。本年度はこの原因を系統的に検討し、同軸ケーブルのインピーダンス不整合、電流伝搬（漏れ）、振動子自身の損失などの問題があることを解明した。昨年度の試作機を改良した設計を行い、振動子のパッケージングケース、整合回路、バッファアンプ、送信側/受信側の電子回路を個別の電池で駆動などの対策を施した試作機を新たに開発した。また、FSK 変調された通信信号を最適な条件で遅延検波するための方式を検討し、改良した試作機にはこのための機能も実装した。今後は、改良試作機を使った実験によって、超音波通信の真の特性を検証する。

BC-1-7. 複合酵素修飾グルコース型燃料電池の開発

ビタミン K₃ ポリマーの調製を行い、基礎特性を評価した。ビタミン K₃ 被覆電極のサイクリックボルタモグラムの検討した結果、ポリ

マー化されたビタミン K₃ の隣接分子間での電子交換によって膜内での電子伝導が起こっていることが示された。これは酵素と複合化してメディエータ機能を担うために必要な特性であり、20%の修飾率および薄膜化の手法が応用に適した薄膜物性を与えたといえる。

次にビタミン K₃ ポリマーとジアフォラーゼの複合薄膜のサイクリックボルタモグラムの検討した結果、除酸素した溶液に NADH を添加すると還元電流が減少し、ビタミン K₃ がジアフォラーゼのメディエータとして機能し得ることを示唆した。一方、酸化電流は NADH 濃度に比例して増加し電極・NADH 間の電子移動スキームが機能していることが示された。さらに微細カーボン粉末を添加し複合薄膜内の電子の移動を円滑にしたところ NADH の酸化電流値が 100 倍以上に増加した。

このようにして作製した複合薄膜をグルコース脱水素酵素膜でさらに被覆したアノードを作製し、PDMS 被覆 Pt カソードを組み合わせて、電池を構成した。得られた最大電力は平均で 12.8 μW/cm² であった。継続して計測したところ、出力は 4 日間で 30% まで低下したがその後は 2 週間以上保持された。

BC-2. ナノ分子操作技術による血液界面代替デバイスの開発研究

BC-2-1. To Surface テクノロジーの開発に関する研究

ナノ分子操作表面処理による抗血栓性効果の機序を検討した。表面処理により吸着タンパク質は低濃度では減少したものの、高濃度では増加した。また吸着タンパク質は無処理でのアルブミン分画に対し、表面処理では低分子量分画 (17.2 kDa 以下) であった。また無処理では線維芽細胞が 12 時間後に接着し仮足を伸展させた野に対し、表面処理では 24 時間後においても接着細胞は観察されず球形形態を保持したままであった。これらの結果はフィブロネクチンおよびビトロネクチンを

添加した条件においても同様であった。

24 時間の急性実験では表面からのヘパリン溶出を認めなかった。また慢性実験では全実験期間 (67、50 日間) にわたって抗凝血療法を行わなかったにもかかわらず血小板数、凝固機能は生理的範囲であり、人工肺内部での血栓形成は観察されなかった。ガス交換能も実験期間中にわたって良好に経過した。

BC-3. ナノ生化学系による非細胞性代謝機能代替デバイスの開発研究

本年度はデバイス構築に追加的にさらに必要な素材を検討した。

BC-3-1. ATP 再生系の検討

ポリリン酸-ポリリン酸キナーゼ系が動作するかをルシフェラーゼ反応で調べたところ、全量 10 μl の反応系で 2mM ポリリン酸、1mM ADP、4mM MgCl₂ で反応させると、30 分で 14nmol、60 分で 34nmol の ATP が産生された。次に種々の条件下で verapamil の取込能を調べた。完全な反応系に比し、エネルギー源である ATP を除いた場合や MDR1 を含まないリポソーム単独では verapamil の取込はなく、MDR1 によるエネルギー依存的な特異吸収であることがわかった。一方、ポリリン酸-ポリリン酸キナーゼを用いた ATP 再生系下でも良好な取込が観察された。この場合も MDR1 を含まないリポソームでは取込がないことから、エネルギー依存的な輸送が行われたものと推察された。

試験管内で調整したポリリン酸顆粒とポリリン酸合成酵素を使用して、ATP 再生系を構築した。ATP を消費する系としてはグルコース、ヘキソキナーゼを用いた。グルコースのリン酸化によって生じるグルコース 6 リン酸は直ちにデヒドロゲナーゼによってグルコン酸になり、生じた還元力によって NADPH が生成する。ATP は入っていないため ADP が ATP に再生されない限りグルコースがリン酸化されず NADPH が生産されない。NADPH

の定量をすることによってATPが合成されているかを確認した。その結果、ポリリン酸-マグネシウム-カルシウム顆粒は可溶性のポリリン酸に比べて速度は1/3に低下するものの、ATPを供給するエネルギー源になりえることがわかった。

BC-3-2. プロテオリポソーム作成法の最適化と機能評価

精製 MDR1 を人工リポソーム(PC : PE : PS = 4 : 4 : 2)に再構成し、さまざまな薬剤で誘導されるATP加水分解活性を酸化チタンカラム法を用いて測定した。その結果、ローダミン 123 とベラパミルによって誘導されるATP加水分解活性が典型的なベル型の濃度依存性を示した。それぞれ 125 mM と 30 mM で最大を示し、それ以上の高濃度ではATP加水分解は抑制された。ビンプラスチンは 10 mM 以下の濃度ではATP加水分解を促進したが、高濃度では阻害作用を示し、200 mM 以上においては輸送基質を外から加えない状態以下に抑制した。また、コルヒチンは濃度依存的に徐々にATP加水分解を促進したが、2 mM においても最大にはならなかった。

プロテオリポソーム調製において問題になるのは組み込んだ膜タンパク質の機能発現である。まず MDR-1 の配向性を確認すると生体内と逆方向であり、薬物がリポソーム外水相から内水相に輸送され MDR-1 配向リポソームを薬物除去に利用できる可能性が示唆された。次にローダミン B をモデル薬物として MDR-1 配向リポソームの薬物除去能を評価した。MDR-1 による薬物除去量の最大値(Q_{max})を様々な脂質組成で検討した結果、単純脂質組成より混合脂質組成の方が優れた除去能を持ち、特に POPC/Chol, DOPC/DOPE 系での排出量と活性が高いことが分かった。さらにATP加水分解活性もローダミン除去能と同様の傾向を示した。

プロテオリポソームの透析システムへの応

用の可能性は示されたものの、透析の操作条件下でのプロテオリポソームの劣化条件を検討する必要がある。そこで熱・酸化的ストレス条件下でのプロテオリポソームの安定性を検討した。Na⁺/K⁺-ATPase を組み込んだプロテオリポソームによる熱安定性を誘電分散スペクトルにより検討したところ、脂質膜の流動性に対応する特性周波数(fc₂)は、25℃以上の温度条件ではプロテオリポソームでリポソームより低く、膜タンパク質の組み込みによる膜流動性の低下が示唆された。活性化エネルギーはリポソーム 42.2kJ/mol、プロテオリポソーム 19.9kJ/mol であり熱安定性が低下したことが示唆された。膜に組み込んだATP加水分解活性は経時的に約 50%に低下し、水溶性タンパク質活性の約 90%に比し膜タンパク質はかなり不安定であることが推察された。

酸化ストレスによっても膜流動性およびプロテオリポソーム機能が低下する。プロテオリポソームの失活挙動の原因を探ったところ、MDR1 を疎水核として凝集融合することで不安定性を説明可能であると考えた。ATP を大過剰で共存させると凝集や活性低下の抑制が認められたので類似物質の探索が必要と考えられた。

BC-3-3. 薬物代謝モデル系の構築

薬物代謝を評価できるベクターとしてレポーター遺伝子に EGFP と d2EGFP を用いたベクター、CYP_{1A2}-EGFP および CYP_{1A2}-d2EGFP の 2 種類の発現ベクターを構築した。本ベクターを用いて、トランスフェクションアレイにより、肝由来の HepG2 細胞株を形質転換した。誘導薬剤による蛍光誘導に関しては、得られたトランスフェクション後の細胞を誘導処理することにより行った。具体的には、誘導薬剤である clotrimazole、dexamethasone、phenytoin、rifampicin をそれぞれ 10 μM 添加して培養を行った。添加後から形態観察を行ったところ、添加後 1 日

目で p3A4cp-d2EGFP は誘導薬剤を添加したものが、p3A4cp-EGFP は溶剤のみを含めた全種類の細胞で誘導を示す蛍光が確認された。添加後 3 日目頃から p3A4cp-d2EGFP に蛍光強度の差が見られ始め、dexamethasone を添加した細胞が最も強い蛍光を示した。P3A4cp-EGFP は全種類の添加に関して蛍光が観察されたが、応答の優劣は確認できなかった。d2EGFP は半減期が約 2 時間と短く、応答の on-off を検出するのに適している。一方、EGFP は蛋白質が安定であるため細胞内にて分解されにくく、検出感度としては高いものの応答をみるには適していないと考えられる。

BC-3-4.薬物トランスポータに関する研究

胆管閉塞時、高コレステロール食負荷時の ABCA8 および近縁遺伝子の発現変化を検討した。胆管閉鎖により mRNA 発現を肝においては ABCA8 に加え ABCA5、ABCA7、ABCA9 の mRNA の発現が有意に増加した。またこの変化は蛋白レベルでも確認することができた。

胆管閉塞時には血中の抱合型ビリルビンだけではなく、胆汁酸、総コレステロール濃度も上昇するため、胆管閉塞時に観察できた発現変化が抱合型ビリルビン自体によるものか、それ以外に随伴する因子によるものか判断できない面がある。そのため、血中の胆汁酸、総コレステロール濃度が上昇し、かつ抱合型ビリルビン濃度の変化しないモデルとして、14 日間の高コレステロール食負荷後における ABCA 群遺伝子発現の変化を検討した。それによると肝においては ABCA8 に加え ABCA7、ABCA9 の mRNA の有意な変化はあるものの、ABCA8 の mRNA は有意な上昇は見られなかった。

これらの発現変化はこの変化は蛋白レベルでも確認することができた。抱合型ビリルビンが増加する病態でのみ転写が誘導され、この排出に深く関わっていることが示唆された。

BC-3-5.リポソーム微細構造観察法の開発

昨年度開発した血管内封入法によりプロテオリポソームを観察したところ、60~150 ナノメートルの中空あるいはタマネギ状の円形構造を認めた。リポソームと同様の形態であるが、リポソームでは電子密度の高低の明瞭な 2 重構造の 2~6 層の膜を有していたのに対し、プロテオリポソームのそれは不明瞭な層状構造に電子密度の高い微粒子が付着しているような膜様構造を呈していた。

タンニン酸によるリポソームおよびプロテオリポソームの観察を検討したところ、リポソームおよびプロテオリポソームは崩壊したものの、本方法を用いるとリポソームおよびプロテオリポソームの脂質膜は電子密度の濃淡の層が交互に繰り返す明瞭な多層構造として、タンパク質は電子密度の低い不定形な網目紋様として観察できる可能性が示唆された。

D.考察

D-1.バイオニックナノメディスンによる循環器調節機能デバイスの開発研究

バイオニック治療戦略は生体調節系に介入できる人工調節系を用いて調節系を代替・置換することにより難治性疾患を治療する戦略である。代替する目標は必ずしも生体調節系そのものではなく、心不全のように生体が異常な調節状態に陥った場合には、人工の調節系により異常な調節状態を是正することにより生体の悪循環を断ち切ることも可能である。機能再建型のバイオニック治療戦略により従来では治療することのできなかった疾患を治療できることが示された。

D-1-1.バイオニック神経制御システムの試作

本年度の研究では、ナノテクノロジーを駆使した小型・超低消費電力の装置という一次試作の特長を残したまま、植え込みバイオニッ

ク神経制御システム（植え込みバイオニック治療装置）を改良し、通信安定性の向上、防水性の確保、搭載プログラムの外部書き換えなどの機能を実現した（二次試作）。今後は二次試作による大動物での最適治療論理の確立が必要である。

D-1-2. バイオニック心不全治療の機序検討

バイオニック心不全治療の機序に関し、昨年度の実験では同程度の心拍数減少効果のある β_1 遮断薬を予め投与しても、バイオニック迷走神経刺激は心筋梗塞後の心機能低下および心臓リモデリング抑制効果が認められたことから、バイオニック迷走神経刺激の効果は心拍数減少（電気的な β 遮断）効果だけでは説明できないことが判明した。したがって、バイオニック迷走神経刺激による治療効果は、交感神経に対する拮抗作用以外の迷走神経刺激固有の作用と考えられた。本年度の実験では高張食塩水摂取を許容した状態でバゾプレッシンの分泌および高張食塩水摂取行動への抑制が見られ、この効果が心機能低下および心臓リモデリングの抑制にも関与していると考えられた。今後、バイオニック迷走神経刺激による治療効果の機序をさらに明らかにする必要がある。

D-1-3. バイオニック心不全治療の大動物への展開 および

D-1-4. バイオニック心不全治療の副作用抑制方法の検討

大動物での有効性の確認と最適治療論理の設定を行うためイヌでの実験を開始した。比較的高い生存率を有しかつ左室リモデリングを検討できる程度の梗塞範囲を有するモデルを作成することが必要である。血管の閉塞により梗塞範囲の制御は可能であるが、上記の条件を達成するにはまだ検討が必要である。イヌ左冠動脈は回旋枝優位であるため、左室後下壁モデルでは広範囲心筋梗塞となり死亡

した。梗塞範囲を小さくしたものでは左室機能異常がほとんど認められなかった。左室前壁モデルでは、壁運動異常を認めたもののがかなり限局した範囲であった。

長期迷走神経刺激に関しては、①径0.2mmのプラチナワイヤではワイヤそのものの剛性のため迷走神経との接触不良が起こる可能性がある、②電気刺激装置を頸部に植え込むときに余剰ワイヤを電気刺激装置に巻き付けるような形で留置しているがこれがリードに捻れを生じさせている可能性がある、③迷走神経刺激において心拍低下効果と悪心発現の閾値は非常に近いということがわかった。

D-1-5. 超小型分散ペースングシステムの開発

徐脈性不整脈患者の生活の質を向上させる以外にも、本プロジェクトでは超小型ペースメーカを多数配置して、心不全患者での電気的不安定性や収縮の非同期性の改善、低電力除細動を検討している。

本年度は光マッピングによる高い時空分解能の測定をもとにオーバードライブペースングを最適に行い除細動の停止をめざして動物実験の装置を開発した。実用化を考える際には、細胞外電位を電氣的に計測することになり空間分解能は低下するが、現時点では最大限に詳細なデータをもとに除細動が可能かどうかを検証する必要があると考えた。

D-1-6. 体内通信の開発

体内の無線通信手段として電波と超音波とが考えられ、H14~15年度にかけてその優劣を検討した。電波については2GHz以上の周波数帯では減衰が大きく体内の無線通信には使いにくいという結論であった。しかし本年度新たに再検討し、UWB方式を中心周波数2.5GHz帯域幅500kHz程度で用いることにより近距離であれば減衰をある程度克服し、かつ対干渉性を高めることができることが明らかになった。

超音波に関しては、昨年度の実験結果から実験装置の不具合が明らかになり、改善を反映させた試作機を新たに開発した。改良機では伝搬距離 4cm でビットエラー率 (BER) $=10^{-3}$ を実現するためには送信基板から 0.5~1.0Vp の電圧を出力する必要がある、伝搬距離 10cm で BER $=10^{-3}$ の場合は 0.8~1.5Vp、伝搬距離 4cm で BER $=10^{-6}$ の場合は 0.7~1.4Vp、伝搬距離 10cm で BER $=10^{-6}$ の場合は 1.2~2.1Vp であった。検討の結果、何れの条件でも 0.362mm 厚の振動子を使った場合に、最も効率の良い通信が可能であることが示唆された。来年度は、改良した試作機を使った実験で動物体内での超音波通信の実験を行う。

D-1-7.複合酵素修飾グルコース型燃料電池の開発

各種バイオセンサで必要とされる出力が $4 \mu W$ 程度であるから、今回得られた出力密度 $12.8 \mu W/cm^2$ (平均値) は実用を期待させる値である。しかし $1cm^2$ は埋め込みを考えると大き過ぎるので、電池サイズの微小化のためにも更に出力密度の向上に取り組む必要性が残されている。今回、ジアフォラーゼ (Dp) の層とグルコース脱水素酵素 (GDH) の層を積層した構造でアノード電極を構成し、良好な結果を得た。酵素間の連係を効率的に行うためには両酵素が混在し分子レベルで隣接しているのが望ましいが、最適化すべきファクターが多すぎて収拾がつかずに今回は頓挫した。結局 2層構造に行き着いたわけであるが、最適化したジアフォラーゼ層を他のデヒドロゲナーゼ層とも組み合わせられる利点は大きいと考えている。それぞれの層の膜厚については (今回は $4.0 \mu m$) 最適値を求める検討を行う予定である。本年度購入したシミュレーションソフトで理論的に理解しながら系統的に調べたい。

D-2.ナノ分子操作技術による血液界面代替デ

バイスの開発研究

本研究では生体の細胞膜と同様に 2本のアルキル鎖を有する構造を基本とし、ナノメートルオーダーでこのジアルキル基の鎖長を制御することにより、先端に結合させた生理活性物質、ヘパリンを親水性環境下であたかも血中に溶出したような状態でその活性を十分に発揮させるとともに、実際にはヘパリンが血中に溶出して行くことなく材料表面に留まるための疎水性環境をも同時に維持する技術を開発した。この技術の効果発現の機序検討を行ったところ、表面処理により低分子のタンパク質が吸着するのと同時に、線維芽細胞の接着を抑制した。開発の際に想定した以外の機序の関与も考えられた。

すべての表面にナノ表面処理を施した Platinum Cube NCVC 2000 (人工肺) と遠心ポンプ、送脱血管を組み合わせたシステムは長期抗血栓性に優れ、ヘパリン溶出などの危険性が無く、長期に良好なガス交換性能を維持し、小児用 ECMO として高い安全性と耐久性を持つことが明らかとなった。

D-3. ナノ生化学系による非細胞性代謝機能代替デバイスの開発研究

非細胞性代謝機能代替を実現する機能性膜に必要な技術要素として a) ATP 再利用系 b) 配向性を持ったトランスポータの人工膜への組み込み c) 限外濾過膜表面への脂質人工膜の固定が挙げられる。昨年度まで ATP は系外からの供給を考えていたが、より自律的な機能をデバイスに付与する為、利用され生成した ADP を、ポリリン酸を基質とするポリリン酸キナーゼにより ATP とする系を MDR1 と組み合わせた。ポリリン酸は ATP と同様の高エネルギーリン酸結合によって結合した無機ポリマーで、リン酸を加熱して合成できる単純で非常に安価な化合物である。大腸菌のポリリン酸合成酵素は、ATP の末端のリン酸基をポリリン酸に転移して約 700 個のリン酸が

つながったポリリン酸を合成し、また逆に過剰のポリリン酸と ADP が存在すると、大腸菌のポリリン酸合成酵素は ATP を生産する。この系と昨年度までに確立した MDR1 による ATP 依存性の基質取込系にポリリン酸-ポリリン酸キナーゼ系を組み合わせ測定を行ったところ、前述のように ATP 再生産系は MDR1 活性の発現に十分寄与できることがわかった。

さらに不溶性ポリリン酸の応用が考えられる。ポリリン酸はある種の状況下で不溶性になる。この不溶性ポリリン酸塩は半透膜を通り抜けることがないので、タンパク質-人工基材が複合した機能性膜を動かすために可溶性ポリリン酸よりも有効であると考えられる。本年度、グルコースキナーゼの ATP 消費系に於いて、不溶性ポリリン酸顆粒で活性測定をした結果、可溶性のポリリン酸に比べて速度は 1/3 に低下するものの、ATP を供給するエネルギー源になりえることがわかり、次は MDR1 プロテオリポソームへの応用が期待される。

一方、MDR1 活性における脂質環境について詳しく調べた。最近多くの ABC 蛋白質が脂質 2 重層中のコレステロールと相互作用することが示唆されている。そこで、さまざまな濃度のコレステロールを含有する人工リポソームを調製したところ、コレステロール濃度が 30% に達するまで、濃度依存的に ATP 加水分解活性を増大させることがわかった。また、誘電分散解析法によっても負電荷脂質やコレステロールの添加による膜流動性の抑制が活性向上に重要かつ熱ストレスを維持することがわかった。

MDR1 を組み込んだリポソームに関して言えば、研究の初期 2 年間で活性の発現や生理的配向性と逆向きのリポソーム内腔に向けた基質移動の確認ができた。また、本年度、コレステロールの存在が、活性増加や安定化によく役立つこともわかった。今後、リポソ

ームから、機能性人工膜へと形態を変えるためには、図 4 に示したように、限外膜への脂質膜コーティングと、その場合の分子配向性の均一化を実現しなくてはならない。次年度以降の重点テーマと考えている。

本プロジェクトにおける輸送ターゲットの一つであるビリルビンにアフィニティーのある代表的トランスポータの MRP2 は MDR1 よりも膜貫通領域が多い複雑な構造を有し、活性を保ったまま精製することは非常に困難である。そこで、本研究の当初に発見した新規なビリルビン輸送トランスポータである ABCA8 について、本年度は胆管結紮で同タンパクの転写が促進されることをリアルタイム PCR によって見出した。一方、コレステロール負荷では転写活性の増加は起こらず、抱合型ビリルビンが増加する病態でのみ転写が誘導され、この排出に深く関わっていることが示唆された。さらに、輸送反応の Kinetics やビリルビン輸送リポソームの構築、また将来的には結晶構造解析を行うことも視野に入れ、パキユロウィルスによる ABCA8 タンパクの大量生産系の構築を行った。

以上の他、リポソームの微細構造観察の為に電子顕微鏡による検討では、昨年度確立した血液内封入法に代わるものとして、肺胞のサーファクタントの観察に用いられてきたタンニン酸固定法の検討を行った。また、薬物代謝酵素の活性発現における微細環境の検討では、薬物代謝の機能発現にかかる環境について簡便に検討できる系の構築を行った。これは薬物代謝第 I 相反応（酸素添加反応）の条件最適化を簡便に行うために、薬物代謝誘導と薬物代謝の両方を同時に評価できる肝由来細胞株を構築し、様々な薬物による誘導を蛍光を用いて評価し、かつ同時に薬物代謝反応を代謝によって評価可能なシステムである。

E. 結論

バイオニック心不全治療のための植え込み神経制御システムの一次試作を機能確認し、抽出した問題点を改良した二次試作を行った。バイオニック心不全治療は食塩嗜好性やパンクレッシン分泌を低下させ、中枢作用が関与していた。大動物でのバイオニック心不全治療実験を開始した。

体内超音波通信装置を試作し、電波によるUWB通信の可能性を検討した。また電極に酵素などの複合体を固定化した生体燃料電池が現実的な電力を供給しうる見通しを得た。

ナノ表面改質による抗血栓性により人工肺を含む補助人工心臓が可能であることを示した。抗血栓性の機序には細胞接着の阻害が関与していた。

ポリリン酸を用いたエネルギー再生系構築の見通しを得た。プロテオリポソームの異物取り込み能に影響する脂質組成や熱、酸化ストレスに対する安定性を検討した。

F.健康危険情報

なし

G.研究発表

G-1.論文

1. Kawada T, Yamazaki T, Akiyama T, Shishido T, Mori H, Sugimachi M. Myocardial interstitial choline and glutamate levels during acute myocardial ischaemia and local ouabain administration. *Acta Physiol Scand*. 2005 (in press).
2. Uemura K, Kawada T, Kamiya A, Aiba T, Hidaka I, Sunagawa K, Sugimachi M. Prediction of circulatory equilibrium in response to changes in stressed blood volume. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2005 (in press).
3. Uemura K, Kawada T, Sugimachi M, Zheng C, Kashihara K, Sato T, Sunagawa K. A self-calibrating telemetry system for measurement of ventricular pressure-volume relations in conscious, freely moving rats. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2004; 287: H2906-H2913.
4. Kashihara K, Kawada T, Uemura K, Sugimachi M, Sunagawa K. Adaptive predictive control of arterial blood pressure based on a neural network during acute hypotension. *Ann Biomed Eng*. 2004; 32: 1365-1383.
5. Miyamoto T, Inagaki M, Takaki H, Kawada T, Yanagiya Y, Sugimachi M, Sunagawa K. Integrated characterization of the human chemoreflex system controlling ventilation, using an equilibrium diagram. *Eur J Appl Physiol*. 2004 (in press).
6. Yanagiya Y, Sato T, Kawada T, Inagaki M, Tatewaki T, Zheng C, Kamiya A, Takaki H, Sugimachi M, Sunagawa K. Bionic epidural stimulation restores arterial pressure regulation during orthostasis. *J Appl Physiol*. 2004; 97: 984-990.
7. Miyamoto T, Kawada T, Yanagiya Y, Inagaki M, Takaki H, Sugimachi M, Sunagawa K. Cardiac sympathetic nerve stimulation does not attenuate dynamic vagal control of heart rate via alpha-adrenergic mechanism. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2004; 287: H860-H865.
8. Kashihara K, Kawada T, Li M, Sugimachi M, Sunagawa K. Bezold-Jarisch reflex blunts arterial baroreflex via the shift of neural arc toward lower sympathetic nerve activity. *Jpn J Physiol*. 2004; 54:

- 395-404.
9. Kawada T, Uemura K, Kashihara K, Kamiya A, Sugimachi M, Sunagawa K. A derivative-sigmoidal model reproduces operating point-dependent baroreflex neural arc transfer characteristics. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2004; 286: H2272-H2279.
 10. Uemura K, Sugimachi M, Kawada T, Kamiya A, Jin Y, Kashihara K, Sunagawa K. A novel framework of circulatory equilibrium. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2004; 286: H2376-H2385.
 11. Kawada T, Miyamoto T, Uemura K, Kashihara K, Kamiya A, Sugimachi M, Sunagawa K. Effects of neuronal norepinephrine uptake blockade on baroreflex neural and peripheral arc transfer characteristics. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 2004; 286: R1110-R1120.
 12. Sugimachi M, Okamoto H, Hoka S, Sunagawa K. Faster oscillometric manometry does not sacrifice the accuracy of blood pressure determination. *Blood Press Monit.* 2004; 9: 135-141.
 13. Yamamoto K, Kawada T, Kamiya A, Takaki H, Miyamoto T, Sugimachi M, Sunagawa K. Muscle mechanoreflex induces the pressor response by resetting the arterial baroreflex neural arc. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2004; 286: H1382-H1388.
 14. Tahara N, Takaki H, Taguchi A, Suyama K, Kurita T, Shimizu W, Miyazaki S, Kawada T, Sunagawa K. Pronounced HR variability after exercise in inferior ischemia: evidence that the cardioinhibitory vagal reflex is invoked by exercise-induced inferior ischemia. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2005; 288: H1179-H1185.
 15. Sakuragi S, Takaki H, Taguchi A, Suyama K, Kurita T, Shimizu W, Kawada T, Ishida Y, Ohe T, Sunagawa K. Diagnostic value of the recovery time-course of ST slope on exercise ECG in discriminating false-from true-positive ST-segment depressions. *Circ J.* 2004; 68: 915-922.
 16. Yasuda S, Goto Y, Takaki H, Asaumi Y, Baba T, Miyazaki S, Nonogi H. Exercise-induced hepatocyte growth factor production in patients after acute myocardial infarction: its relationship to exercise capacity and brain natriuretic peptide levels. *Circ J.* 2004; 68: 304-307.
 17. Kamiya A, Michikami D, Shiozawa T, Iwase S, Hayano J, Kawada T, Sunagawa K, Mano T. Bed rest attenuates sympathetic and pressor responses to isometric exercise in antigravity leg muscles in humans. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2004; 286: R844-R850.
 18. Fujiki T, Shimokawa H, Morikawa K, Kubota H, Hatanaka M, Talukder MA, Matoba T, Takeshita A, Sunagawa K. Endothelium-derived hydrogen peroxide accounts for the enhancing effect of an angiotensin-converting enzyme inhibitor on endothelium-derived hyperpolarizing factor-mediated responses in mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2005 (in press).
 19. Kimura Y, Hirooka Y, Sagara Y, Ito K, Kishi T, Shimokawa H, Takeshita A, Sunagawa K. Overexpression of inducible nitric oxide synthase in rostral ventrolateral medulla causes

- hypertension and sympathoexcitation via an increase in oxidative stress. *Circ Res.* 2005; 96: 252-260.
20. Aiba T, Shimizu W, Inagaki M, Noda T, Miyoshi S, Ding WG, Zankov DP, Toyoda F, Matsuura H, Horie M, Sunagawa K. Cellular and ionic mechanism for drug-induced long QT syndrome and effectiveness of verapamil. *J Am Coll Cardiol.* 2005; 45: 300-307.
 21. Zhao Q, Egashira K, Hiasa K, Ishibashi M, Inoue S, Ohtani K, Tan C, Shibuya M, Takeshita A, Sunagawa K. Essential role of vascular endothelial growth factor and Flt-1 signals in neointimal formation after periadventitial injury. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2004; 24: 2284-2289.
 22. Nishida T, Shimokawa H, Oi K, Tatewaki H, Uwatoku T, Abe K, Matsumoto Y, Kajihara N, Eto M, Matsuda T, Yasui H, Takeshita A, Sunagawa K. Extracorporeal cardiac shock wave therapy markedly ameliorates ischemia-induced myocardial dysfunction in pigs in vivo. *Circulation.* 2004; 110: 3055-3061
 23. Ishibashi M, Egashira K, Zhao Q, Hiasa K, Ohtani K, Ihara Y, Charo IF, Kura S, Tsuzuki T, Takeshita A, Sunagawa K. Bone marrow-derived monocyte chemoattractant protein-1 receptor CCR2 is critical in angiotensin II-induced acceleration of atherosclerosis and aneurysm formation in hypercholesterolemic mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2004; 24: e174-e178.
 24. Ohtani K, Egashira K, Hiasa K, Zhao Q, Kitamoto S, Ishibashi M, Usui M, Inoue S, Yonemitsu Y, Sueishi K, Sata M, Shibuya M, Sunagawa K. Blockade of vascular endothelial growth factor suppresses experimental restenosis after intraluminal injury by inhibiting recruitment of monocyte lineage cells. *Circulation.* 2004; 110: 2444-2452.
 25. Kurita R, Tabei H, Iwasaki Y, Hayashi K, Sunagawa K, Niwa O. Biocompatible glucose sensor prepared by modifying protein and vinylferrocene monomer composite membrane. *Biosens Bioelectron.* 2004; 20: 518-523.
 26. Ito K, Hirooka Y, Sagara Y, Kimura Y, Kaibuchi K, Shimokawa H, Takeshita A, Sunagawa K. Inhibition of Rho-kinase in the brainstem augments baroreflex control of heart rate in rats. *Hypertension.* 2004; 44: 478-483.
 27. Nishimura S, Yasuda S, Katoh M, Yamada KP, Yamashita H, Saeki Y, Sunagawa K, Nagai R, Hisada T, Sugiura S. Single cell mechanics of rat cardiomyocytes under isometric, unloaded, and physiologically loaded conditions. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2004; 287: H196-202.
 28. Akiyama T, Yamazaki T, Mori H, Sunagawa K. Effects of Ca²⁺ channel antagonists on acetylcholine and catecholamine releases in the in vivo rat adrenal medulla. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 2004; 287: R161-R156.
 29. Aiba T, Shimizu W, Inagaki M, Satomi K, Taguchi A, Kurita T, Suyama K, Aihara N, Sunagawa K, Kamakura S. Excessive increase in QT interval and dispersion of repolarization predict recurrent ventricular tachyarrhythmia after

- amiodarone. *Pacing Clin Electrophysiol.* 2004; 27: 901-909.
30. Akiyama T, Yamazaki T, Mori H, Sunagawa K. Simultaneous monitoring of acetylcholine and catecholamine release in the in vivo rat adrenal medulla. *Neurochem Int.* 2004; 44: 497-503.
 31. Kakinuma Y, Zhang Y, Ando M, Sugiura T, Sato T. Effect of electrical modification of cardiomyocytes on transcriptional activity through 5' AMP-activated protein kinase. *J Cardiovasc Pharmacol.* 2004; 44: S435-S438, 2004
 32. Zhang D, Ando M, Yamasaki F, Sato T. Neural reflex hypotension induced by very small dose of hypertonic NaCl solution in anesthetized rats. *Jpn J Physiol.* 2005 (in press).
 33. Kudo Y, Kakinuma Y, Mori Y, Morimoto N, Karashima T, Furihata M, Sato T, Shuin T, Sugiura T. HIF-1 α is involved in the attenuation of experimentally induced rat glomerulonephritis. *Nephron Exp Nephrol.* 2005 (in press).
 34. Kakinuma Y, Ando M, Kuwabara M, Katare RG, Okudela K, Kobayashi M, Sato T. Acetylcholine from vagal stimulation protects cardiomyocytes against ischemia and hypoxia involving additive nonhypoxic induction of HIF-1 α . *FEBS Lett.* 2005 (in press).
 35. Takizawa K, Kohno R. Combined iterative demapping and decoding for coded MBOK DS-UWB systems. *IEICE Transactions on Fundamentals of Electronics, Communications and Computer Sciences*, 2004; E87-A: 2621-2629.
 36. Rikuta Y, Kohno R. Characteristics of dual frequency planar monopole antenna for UWB system. *IEICE Transactions on Fundamentals of Electronics, Communications and Computer Sciences*, 2004; E87-A: 2607-2614.
 37. Abreu G, Ochiai H, Kohno R. Linear maximum likelihood decoding of space-time block coded OFDM systems for mobile communications. *IEE Proceedings on Communications - Special Issue on WLAN Systems and Internetworking.* 2004; 151: 447-459.
 38. Mitchell C, Abreu G, Kohno R. Adaptive RAKE receivers with subspace-based Hadamard-Hermite template design for UWB communications. *IEICE Transactions on Fundamentals of Electronics, Communications and Computer Sciences - Special Issue on UWB 2005*
 39. Kokubo M, Oshima T, Yamamoto K, Takayasu K, Ezumi Y, Aizawa S. A GFSK transmitter architecture for a Bluetooth RF-IC, featuring a variable-loop-bandwidth phase-locked loop modulator. *IEICE Trans Electron.* 2005; E88-C.
 40. Sato F, Togo M, Abe T, Ohashi T, Kamrul IM, Matsue T, Kosuge J, Fukasaku N, Nishizawa M. Miniaturized enzyme-based glucose / O₂ fuel cell using vitamin K₃ as electron mediator. *Technical Digest Power MEMS 2004*; 2004: 158-161.
 41. 佐藤冬樹, 都甲真, 西澤松彦. バイオ燃料電池の高性能化に向けた電極表面および電極形状のナノ・マイクロ加工. *エコインダストリー*. 2005 (印刷中)
 42. Mizuno T, Tatsumi E, Nishinaka T, Katagiri N, Oshikawa M, Naito H, Shirakawa Y, Tsukiya T, Homma A, Takewa Y, Takano H, Kitamura S,

- Taenaka Y. Observation of alveolar fibrosis in the goat following up-to-five-months venoarterial bypass using an extracorporeal membrane oxygenation. *J Artif Organs*, 2004; 7: 107-109.
43. 水野敏秀, 巽 英介, 西中知博, 片桐伸将, 佐藤正喜, 田中秀典, 酒井一成, 松田智昌, 武輪能明, 築谷朋典, 本間章彦, 北村惣一郎, 高野久輝, 妙中義之. 長期 VA-ECMO が生体に与える影響の病理組織学的検討. 膜型肺. 2004; 27: 53-56.
44. 白川幸俊, 西中知博, 巽 英介, 片桐伸将, 川瀬浩二, 松田智昌, 田中秀典, 佐藤正喜, 妙中義之. T-NCVC coating 小児用人工肺 (Platinum-Cube NCVC 2000) を用いた安全性についての検討. 膜型肺. 2004; 27: 46-49.
45. Omasa T, Enosawa S. Construction of liver model with genetically engineered human HepG2 cells. *Animal Cell Technology: Basic & Applied Aspects*. 2004; 13: 25-29.
46. Enosawa S, Takahashi N, Amemiya H, Motomiya Y. Transplantation of nonvascularized kidney tissue fragments into the rat liver with the aim of preserving renal function. *Cell Transplantation*. 2004; 13: 413-419.
47. Asada M, Ohmi K, Delia D, Enosawa S, Suzuki S, You A, Suzuki H, Mizutani S. Brap2 functions as a cytoplasmic retention protein for p21 during monocyte differentiation. *Mol Cell Biol*. 2004; 24: 8236-8243.
48. Omasa T, Yamanaka M, Tanimura N, Katakura Y, Kishimoto M, Suga K, Enosawa S. Expression and amplification of glutamine synthetase gene endows HepG2 cells with ammonia-metabolizing activity for bioartificial liver support system. *Enzyme Microbial Technology*. 2004; 35: 519-524.
49. 林 美都子, 絵野沢 伸. 体外血液浄化法の現状と人工細胞による非細胞系バイオ人工肝への期待. *Organ Biology*. 2005 (印刷中).
50. Kuboi R, Shimanouchi T, Yoshimoto M, Umakoshi H. Detection of protein conformation under stress conditions using liposomes as sensor materials. *Sensors and Materials*. 2004; 16: 241-254.
51. Sasaki M, Miyagawa K, Shimanouchi T, Kuboi R. Monitoring of Protein dynamics on membrane under stress condition using dielectric dispersion analysis. *Proc APCCHE*. 2004.
52. Omasa T, Kishimoto M, Kawase M, Yagi K. An attempt at decision making in tissue engineering: reactor evaluation using the analytic hierarchy process (AHP). *Biochemical Eng J*. 2004; 20: 173-179.
53. Kobayashi M, Sugihara N, Ise H, Omasa T, Negishi N. Real time monitoring of drug metabolic enzyme response inside human hepatoma GS-3A4-HepG2 cells by means of electrochemical impedance measurement. *Polymers for Advanced Technologies*. 2004; 15: 232-243.
54. Omasa T, Kajita M, Yoshikawa T, Katakura Y, Kishimoto M, Ohtake H. Rapid construction of gene-amplified CHO cell line by gene targeting. *Proc APPCHE*. 2004; 1P-01-019.
55. Tsuruoka S, Wakaumi M, Yamamoto H, Fujimura A. Chronopharmacology of oxacalcitriol in rat model of osteoporosis. *Eur J Pharmacol*. 2004; 468: 239-245.
56. Tsuruoka S, Nishiki K, Wakaumi M, Wang N, Yamamoto H, Ando H, Imai