

- Therapeutic monitoring of mycophenolate mofetile dose by twelve-hour-area under the curve to avoid acute rejection in heart transplant recipients. International Society for Heart and Lung Transplantation 24th Annual Meeting and Scientific Sessions. San Francisco, CA, U.S.A. 2007年4月25日～28日.
- 4) Kamiya C, Kato T.S., Oda N, Mano A, Hashimura K, Hashimoto S, Komamura K, Kitakaze M, Kitamura S. Reduced systolic strain and systolic strain rate could detect sub-clinical acute rejection in heart transplant recipients. International Society for Heart and Lung Transplantation 24th Annual Meeting and Scientific Sessions. San Francisco, CA, U.S.A. 2007年4月25日～28日. Poster.
  - 5) Hashimoto S, Kato T, Oda N, Mano A, Kamiya C, Hashimura K, Komamura K, Nakatani S, Kitakaze M, Nakatani T. Time lapse analysis of changes in doppler-derived index of coronary flow reserve over time could reduce frequency of endomyocardial biopsy. The 71st Annual Scientific Meeting of the Japanese Circulation Society. Kobe. 2007年3月15日～17日.
  - 6) Kato T, Hashimoto S, Kamiya C, Oda N, Mano A, Hashimura K, Kitakaze M, Komamura K, Kitamura S, Nakatani T. Clinical utility of coronary perfusion reserve and strain obtained by echocardiography for sub-clinical acute rejection in heart transplant recipients. The 71st Annual Scientific Meeting of the Japanese Circulation Society. Kobe. 2007年3月15日～17日.
  - 7) Kato T, Wada K, Oda N, Mano A, Kamiya C, Komamura K, Hashimura K, Kitamura S, Kitakaze M, Ueda H, Nakatani T. Therapeutic monitoring of mycophenolate mofetile dose by twelve-hour-area under the curve to avoid acute rejection in heart transplant recipients. The 71st Annual Scientific Meeting of the Japanese Circulation Society. Kobe. 2007年3月15日～17日. Poster
  - 8) Kamiya C, Kato T, Oda N, Mano A, Hashimoto S, Nakatani T, Kitakaze M. Reduced systolic strain and systolic strain rate could detect sub-clinical acute rejection in heart transplant recipients. The 71st Annual Scientific Meeting of the Japanese Circulation Society. Kobe. 2007年3月15日～17日.
  - 9) 中谷武嗣, 庭屋和夫, 田鎖 治, 船津俊宏, 中嶋博之, 加藤倫子, 眞野暁子, 小田 登, 津田悦子, 越後茂之, 北風政史, 小林順二郎, 八木原俊克, 北村惣一郎. 末期心不全患者に対する治療選択としての心臓移植と補助人工心臓. ワークショップ, 第107回日本外科学会定期学術集会. 大阪. 2007年4月11日～13日.
  - 10) Nakatani T, Funatsu T, Kato T, Mano A, Oda N, Yanase M, Nakajima H, Iba Y, Kobayashi J, Yagihara T, Kitamura S. Over one year support by left ventricular assist system at NCVC. シンポジウム, 第45回日本人工臓器学会大会 第2回国際人工臓器学術大会, 大阪, 2007年10月28日～31日.
  - 11) Fujisato T, Terada D, Niwaya K, Minatoya K, Kishida A, Nakatani T,

Kitamura S. Tissue regeneration by acellular scaffolds prepared by detergent-free treatment. シンポジウム, 第45回日本人工臓器学会大会 第2回国際人工臓器学術大会, 大阪, 2007年10月28日～31日.

12) 加藤倫子, 橋本修治, 築瀬正伸, 小田

登, 眞野暁子, 橋村一彦, 植田初江, 駒村和雄, 北村惣一郎, 中谷武嗣. 心臓移植後拒絶反応の非侵襲的評価法; 経胸壁心エコーによるストレイン映像法の有用性. シンポジウム, 第43回日本移植学会総会, 仙台, 2007年11月22日～24日.

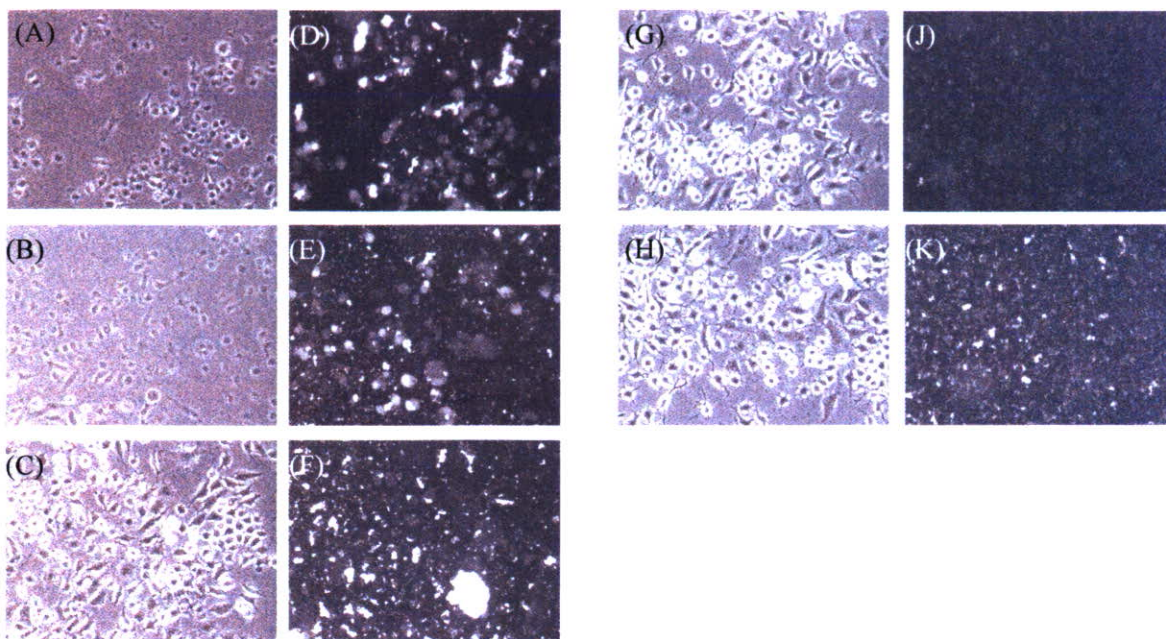


Figure 1. Phase and fluorescence image of L6 cells transfected with PVA-DOTA-Gd by electrophoration method. (A-F) The concentration on PVA-Gd was 100 mM (A and D), 200 mM (B and E) and 300 mM (C and F) when the repeat number of electrophoration was 30 times. (G-K) The repeat number was 0 (G and J), 10 (H and K) when the concentration of PVA-DOTA-Gd was 300 mM.

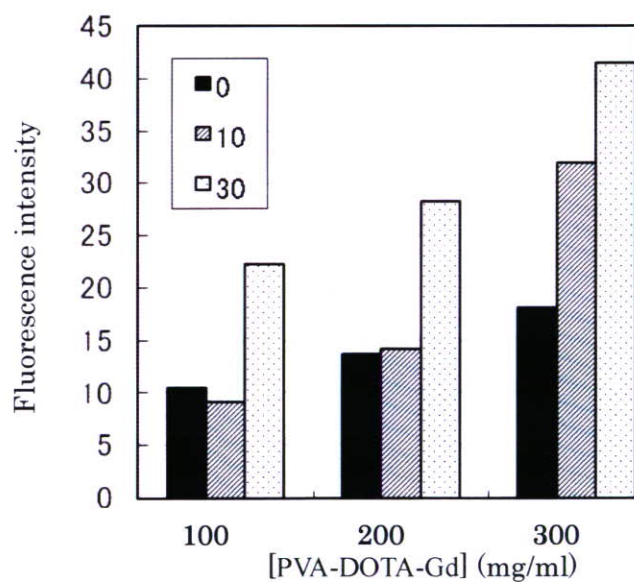


Figure 2. Fluorescence intensity of PVA-DOTA-Gd in the transfected cells. The repeated number of electrophoration was 0 (filled bar), 10 (gray bar) and 30 (dashed bar) against the concentration of PVA-DOTA-Gd.

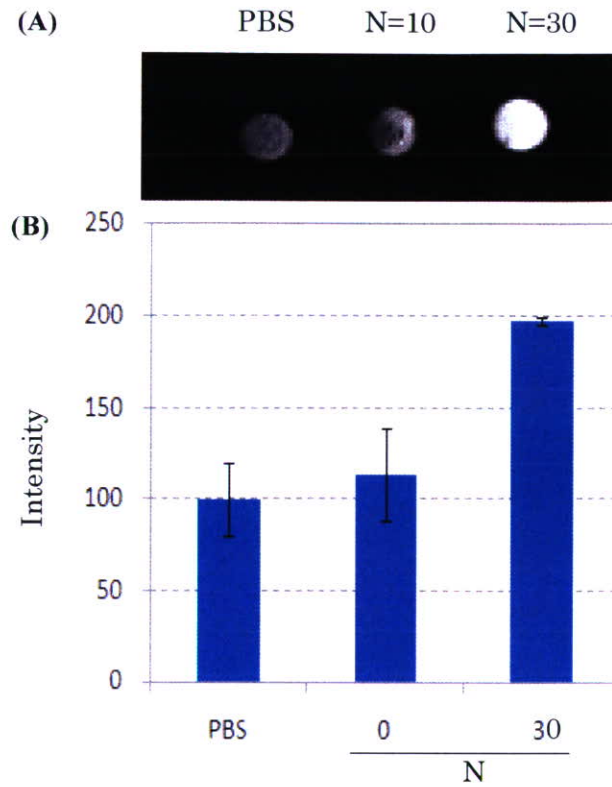


Figure 3. (A) MRI images of L6 cells transfected with PVA-DOTA-Gd by electrophoration method. N is the repeat number of electrophoration. (B) Quantitation of MRI signal intensity of the L6 cells from MRI images analysis.

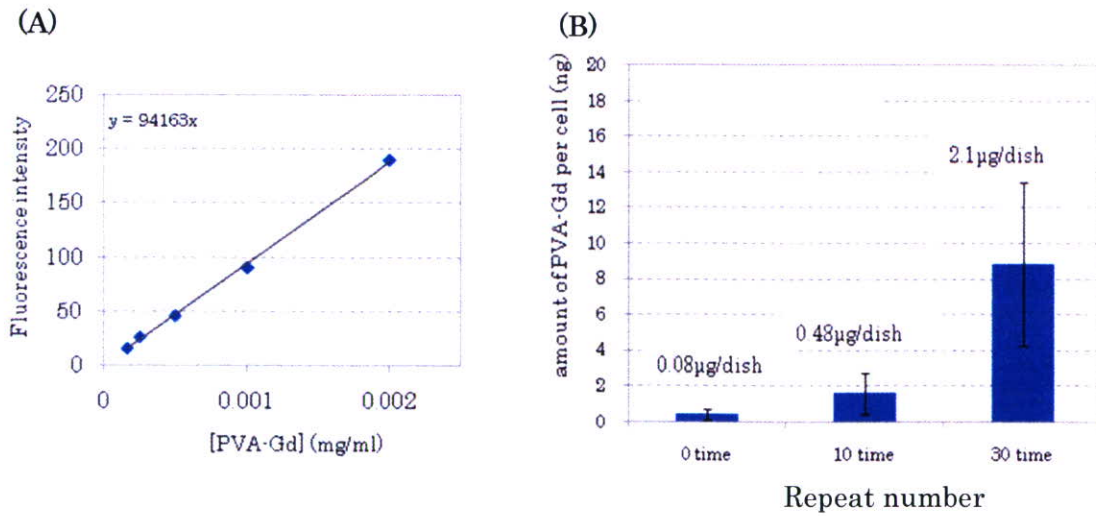


Figure 4. (A) Standard curve of fluorescence intensity against the concentration of PVA-DOTA-Gd. (B) Amount of transfected PVA-DOTA-Gd in the cells calculated from the standard curve. The repeat number of electrophoration was shown the horizontal axis.

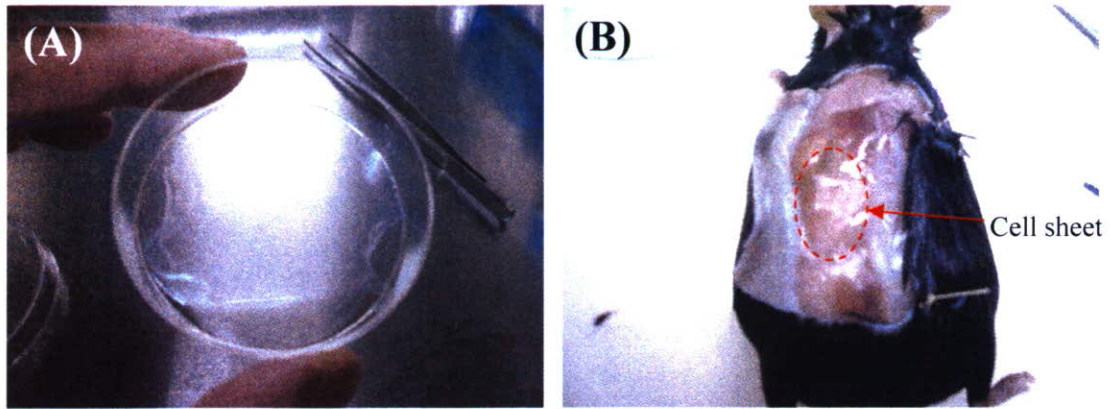


Figure 5. (A) Photograph of L6-cell sheet transfected with PVA-DOTA-Gd by electrophoration, and (B) transplantation of the cell sheet for C57BL/6 mice on subcutaneous tissue.

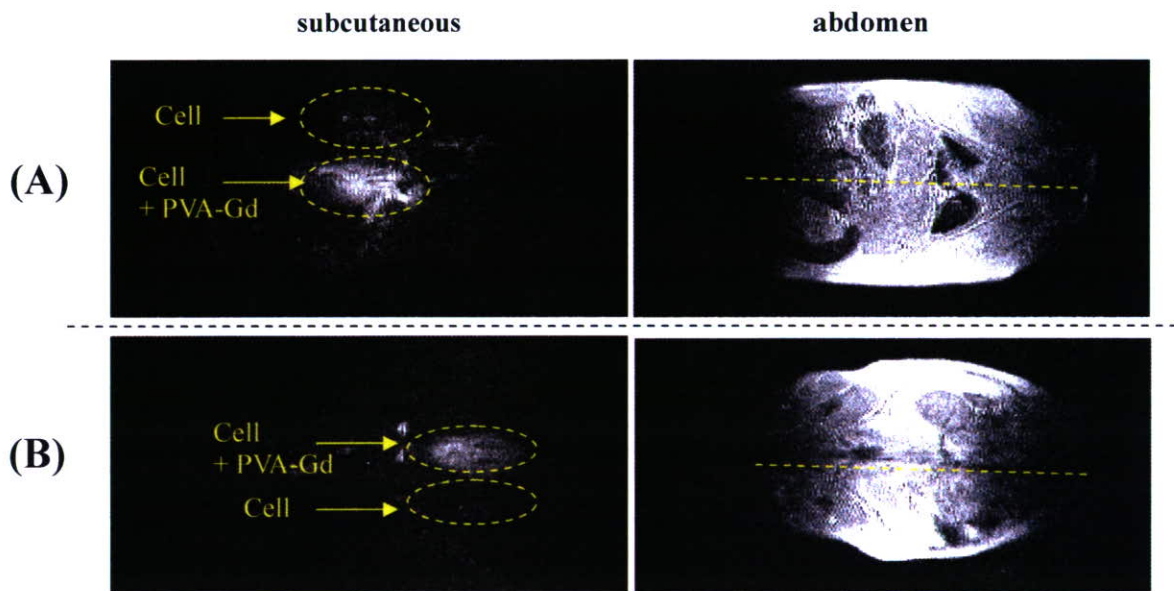


Figure 6. MRI images of transplanted mice on subcutaneous or abdomen slice image. Two mice (A and B) were measured by MRI, and transplanted positions of cell-sheet with or without PVA-DOTA-Gd was different between the two mice.

脱細胞化組織の再細胞化のための造影剤送達法

分担研究者 藤里 俊哉 大阪工業大学工学部  
教授

研究要旨 細胞への高分子化造影剤の送達方法としては、主にエレクトロポレーションを用いているが、さらなる高効率法の検討も重要である。そこで、最近、遺伝子導入法としても注目されているソノポレーション法を用い、直接あるいは間接的に細胞に対して超音波を照射して造影剤を細胞内に送達し、導入条件と細胞内への造影剤の送達量を研究した

**A. 研究目的**

近年の再生医学を中心とする医学・生物学分野の発展に伴い、細胞外物質の細胞内への導入方法が検討されてきた。この方法に関する研究は、細胞への遺伝子導入を中心として数多く研究されており、遺伝子治療のみならず、美容医学まで幅広い分野における重要な基盤技術の一つとなっている。細胞に遺伝子を導入する技術は多様であり、例えば、リポフェクション法や DEAE デキストラン法など生化学的手法から、パーティクルガン法やマイクロインジェクション法など物理的手法まである。これらは、生物実験のプロトコルに組み込まれて使用されており、一般的な方法である。しかし、それぞれには長所と短所を有しており、目的に応じて使い分けなければならない。リポフェクション法は、導入する遺伝子と陽性荷電脂質などからなる脂質二重膜小胞(リポソーム)で電気的な相互作用により複合体を形成し、貪食

や膜融合により細胞に取り込ませる方法であり、DEAE デキストラン法による動物細胞内への遺伝子の取込みや核内への輸送メカニズムは、DEAE-デキストランと DNA が巨大複合体を形成し、細胞のエンドサイトーシスが促進されるというモデルが考えられている。一方、物理的手法であるパーティクルガン法は、遺伝子を金ナノ粒子等に担持させ、その粒子を細胞に打ち付けて粒子ごと遺伝子を細胞内に導入する方法であり、マイクロインジェクション法は、マイクロオーダーに先鋭化したマイクロピペットを用いて、顕微鏡下で細胞に直接差し込んで遺伝子を導入する方法として知られている。これらは、主に遺伝子導入研究分野において用いられている手法である。

上記の方法に加えて、ソノポレーション法及びエレクトロポレーション法が細胞内へ導入方法として知られている。これらは超音波または電圧を用い、細胞

膜構造を不安定化し、細胞外物質の拡散により細胞内へ取り込ませる物理的手法である。利点として、細胞種に依存せず、細胞外物質を大量に、かつ大量の細胞に簡便に導入できることが挙げられる。さらに、エレクトロポレーション法と比較して、ソノポレーション法は細胞へのダメージが少ないことが報告されている。

本研究では、細胞移植治療における移植細胞のラベル化を目的としている。そのため、造影剤を細胞内に効率良く、大量に導入する必要がある。そこで、細胞内導入法としてソノポレーション法を選択し、その条件探索を行うと共に、細胞への影響（毒性など）について検討を行った。

## B. 研究方法

以上の目的に対して、1. ソノポレーション（間接系）2. ソノポレーション（直接系）という、細胞への2種類の導入方法を選択し、以下の研究方法を設定した。導入する高分子造影剤として、ポリビニルアルコール（重合度：1700、けん化度：98%）を主鎖とし、側鎖にガドリニウムキレートを有するポリビニルアルコール誘導體（PVA-DOTA-Gd：側鎖の導入率8%）を用いた。また、この造影剤は、フルオロセインによる蛍光ラベルも行なわれている。移植細胞のモデルとして、マウスの胎児皮膚から分離された培養細胞であるNIH-3T3細胞を用いた。培地は、10% bovine calf serum を含んだ Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM-LG)を用いた。ソノポレーションは、ソニトロン 2000（ネッパージェー

ン）を使用し、 $\phi 11, 17$  mm のプローブを用いた。

### B-1. ソノポレーション（間接系）

超音波が細胞と間接的に接触する系を組み立てた。概略図を図 1 に示す。15 mL 遠沈管中で  $1.0 \times 10^6$  個の細胞に対し DMEM 培地を 1.7 mL 加え、マイクロバブル 200  $\mu\text{L}$  ( $5.0 \times 10^8 / \text{mL}$ , ネッパージェーン) を添加した。PVA-DOTA-Gd 溶液 100  $\mu\text{L}$  (100 mg / mL) を加え全量 2 mL になるよう調製した。37 °C 恒温槽中で超音波の照射を行い、 $\text{W}/\text{cm}^2$ 、プローブとの距離(図 1. 赤矢印)を変化させ、最適条件の検討を行った(Duty cycle = 20 %, time = 30 s)。

超音波照射後、PBS 洗浄を 2 回行い、細胞外に存在する造影剤を除去した。Trypan blue 溶液 (Nacalai Tesque) を用いてソノポレーションにより死亡した細胞をカウントし、細胞の生存率を算出した。その後、細胞溶解液を加え 1 時間、37 °C でインキュベートした。1 時間後、溶液を 96 well plate に 100  $\mu\text{L}$  加え、ルミノメーターを用いて蛍光強度を測定し、造影剤の導入効率を検討した。また、照射後、10 cm シャーレに細胞を播種し、明視野、蛍光顕微鏡観察を行った。

### B-2. ソノポレーション（直接系）

超音波が直接細胞と接触する実験系を組み立てた。概略図を図 2 に示す。6 well dish を用い、 $1.0 \times 10^6$  個の細胞に対して DMEM 培地を加え、造影剤 10 unit mmol を添加し、全量 3 mL になるよう調製した。マイクロバブルの量、 $\text{W}/\text{cm}^2$ 、Duty 比、時間を変化させ、最適条件の検討を行った。

超音波照射後、PBS 洗浄を 2 回行い、細胞外に存在する造影剤を除去した。Trypan blue 溶液を用いてソノポレーションにより死亡した細胞をカウントし、細胞の生存率を算出した。その後、細胞溶解液を加え 1 時間、37°C でインキュベートした。1 時間後、溶液を 96 well plate に 100  $\mu$ L 加え、ルミノメーターを用いて蛍光強度を測定し、造影剤の導入効率を検討した。また、照射後、10 cm シャーレに細胞を播種し、明視野、蛍光顕微鏡観察を行った。

## C. 研究結果

### C-1. ソノポレーション（間接系）

間接的に超音波を照射する条件で、出力及び照射距離を変化させ、細胞の生存率を測定した（図 3a）。図 3a より、出力が 0.5  $W/cm^2$  の条件において、距離による生存率の差はほとんど見られず、生存率は 80 %程度であった。また、1.0  $W/cm^2$  の場合でも、0.5  $W/cm^2$  と比較してわずかであるが生存率の低下が見られ、70 %程度であった。距離による違いはほとんど見られなかった。一方、1.5  $W/cm^2$  まで出力を増加させると、距離による生存率の差が顕著に見られた。1.5  $W/cm^2$  条件下、距離が 6 cm の場合、生存率は 45 %まで低下し、細胞に多くのダメージを与えることがわかった。また、距離の増加に従い、生存率が 80 %まで回復することから、1.5  $W/cm^2$  が導入条件の最大値であるといえる。

次に、造影剤の細胞内導入について検討を行った（図 3b）。コントロールとして、細胞のみ（造影剤なし）の蛍光強度を測定した。コントロールの場合、蛍光強度が 1700 程度であったのに対し、ソ

ノポレーションを行った場合では、多少のばらつきが見られるものの、2000 前後の値が得られた。この結果より、細胞内に造影剤が導入されていることがわかった。また、照射距離の違いによる蛍光強度の差は見られなかった。

さらに、明視野、蛍光顕微鏡観察を行った（図 4）。明視野顕微鏡写真より、細胞がシャーレに接着しており、細胞がソノポレーション後も生存状態であることを確認した。しかし、蛍光顕微鏡観察の結果、全ての条件で輝度が高く見える部分は見出せなかった。

### C-2. ソノポレーション（直接系）

マイクロバブルの個数、Duty cycle、 $W/cm^2$ 、照射時間を変化させ、ソノポレーションを行った結果を図 5 に示す。

マイクロバブルの個数を変化させた場合（図 5a）、細胞の生存率は 80-100 % となり、細胞に対して影響がなかった。しかし、細胞内への導入率に関して大きな違いが見られ、バブルの数が  $1 \times 10^8$  個の条件で最大値 8000 の値を示した。また、Duty cycle を変化させた結果（図 5b）、Duty cycle の増加と共に細胞の生存率及び細胞内導入率は減少した。測定条件下では、Duty cycle は 10 %が最も良い結果となった。図 5c に  $W/cm^2$  を変化させた結果を示す。この結果より、 $W/cm^2$  の変化に対して、細胞の生存率及び細胞内導入率は影響を受けなかった。また、照射時間を変化させた場合（図 5d）でも、ほとんど変化は見られなかった。

さらに、Duty cycle を変化させた後の細胞をシャーレに播種し、明視野、蛍光顕微鏡観察を行った（図 6）。明視野顕



微鏡写真より、細胞がシャーレに接着しており、細胞がソノポレーション後も生存状態であることを確認した。また、蛍光顕微鏡観察により、造影剤による輝度の高い部分が見られ、Duty cycle が 10 % の条件において、細胞内に最も造影剤が導入されている様子が見られた。この結果より、ソノポレーションの直接系が有用であることがわかった。

#### D. 考察

細胞毒性を抑え、細胞内に大量に導入する方法は、本研究のみならず他の分野においても極めて重要な手法といえる。陽性の造影剤（ガドリニウム造影剤）による緩和効果を利用し、細胞のイメージングを行うためには、細胞内にいかに大量に導入できるかが 1 つの問題点となる。本研究では、細胞内に高分子造影剤を導入する方法として、ソノポレーションを選択し、その導入効率と細胞に与える影響について検討した。細胞に対し間接的に超音波を照射する系では、細胞全体中の蛍光強度の増加は見られたが、蛍光顕微鏡観察により細胞内に造影剤が導入されていることは確認できなかった。これは、細胞 1 個に対して微量な量が導入されているためと考えられる。一方、直接系のソノポレーションでは、蛍光顕微鏡観察でも細胞内に造影剤が導入されていることが見られた。また、条件検討を行うことにより、ソノポレーションを用いた造影剤導入において、最適条件を見つけ出すことができたと考える。

今後、細胞移植を目的として、モデル細胞である NIH-3T3 細胞を移植細胞（例えば間葉系幹細胞）へとステップアップ

させ、導入の効率を向上させる研究をする必要があると考える。また、上記に加えて、他の効率の良い導入方法について検討する予定である。

#### E. 結論

細胞内に高分子造影剤を導入する方法として、ソノポレーション法を選択し、導入実験を行った。超音波の照射方法として 2 系統（細胞に直接的、間接的）の実験を組み立てた。間接的に照射する方法では、細胞内に造影剤の導入が確認できなかった。一方、直接的に照射する方法では、蛍光顕微鏡で観察可能な程度まで細胞内に導入することができた。また、導入条件の最適化を行うことで、細胞へのダメージが少なく、かつ、大量に導入できる条件を見出すことができた。

#### 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

##### G-1. 論文発表

- 1) Fujisato T, Niwaya K, Minatoya K, Kishida A, Nakatani T, Kitamura S. Reduction of Antigenicity and Risk of Infection in Regenerative Tissue Transplantation by Cold Isostatic Pressing. High Press Biosci Biotech. 2007; 1(1): 161-5.
- 2) Kimura T, Iwai S, Moritan T, Nam KW, Mutsuo S, Yoshizawa H, Okada M, Furuzono T, Fujisato T, Kishida A. Preparation of PVA/DNA hydrogels via hydrogen bonds by ultra high pressure

treatment and controlled release of DNA from hydrogels for gene delivery. *J Artif Organs*. 2007; 10: 104-8.

- 3) 澤田和也, 寺田堂彦, 藤里俊哉. 繊維と線維 (生体繊維の洗浄と再生医療への展開). *繊維と工業*. 2007; 63(5): 120-4.
- 4) 藤里俊哉, 北村惣一郎. 心臓弁. 篠義人監修. *再生医療工学の技術*. シーエムシー出版. 2007; 142-7.

## G-2. 学会発表

- 1) Fujisato T, Funamoto S, Yoshida K, Yamaoka T, Kimura T, Kikuchi M, Kobayashi Y, Kishida A, Nakatani T. Regenerative Tissue Scaffolds Prepared by Gamma Ray Irradiation. The 2007 Annual meeting of The Society for Biomaterials. Chicago, USA. 2007年4月18日～21日. *Transactions of the 32nd Annual Meeting of Society for Biomaterials* 2007; 860.
- 2) 江橋 具, 永谷憲歳, 橋本成広, 藤里俊哉. 脱細胞化筋スキャフオールドを用いた骨髄由来間葉系幹細胞の筋分化誘導. 第46回日本生体医工学会. 仙台. 2007年4月25～27日. *生体医工学* 2007; 45(Suppl 1): 108.
- 3) 寺田堂彦, 澤田和也, 緒方裕之, 江橋具, 平工香織, 鎌田和加子, 吉田謙一, 船本誠一, 永谷憲歳, 岸田晶夫, 藤里俊哉, 中谷武嗣. 生体内で自己組織化するバイオ人工血管の開発. 第46回日本生体医工学会. 仙台. 2007年4月25～27日. *生体医工学* 2007; 45(Suppl 1): 191.
- 4) 寺田堂彦, 澤田和也, 江橋 具, 平工香織, 鎌田和加子, 永谷憲歳, 藤里俊哉, 中谷武嗣, 吉田謙一, 船本誠一, 岸田晶夫. 生体内で再細胞化する無細胞バイオ人工血管の開発. 第56回高分子学会年次大会. 京都. 2007年5月29-31日. *Polymer Preprints, Japan* 2007; 56(1): 2111.
- 5) Terada D, Sawada K, Ogata H, Ehashi T, Hiraku K, Kamata W, Yoshida K, Funamoto S, Nagaya N, Kishida A, Fujisato T, Nakatani T. Development of the vascular graft having an in situ repopulation. *Tissue engineering international and regenerative medicine society - North America Chapter 2007 Annual Conference & Exposition*. Toronto, Canada. 2007年6月13日～16日.
- 6) Ehashi T, Nagaya N, Hashimoto S, Fujisato T. Effect of stretch culture of mesenchymal stem cells on their differentiation into skeletal muscle cells. *Tissue engineering international and regenerative medicine society - North America Chapter 2007 Annual Conference & Exposition*, Toronto, Canada. 2007年6月13日～16日.
- 7) Fujisato T, Terada D, Niwaya K, Minatoya K, Kishida A, Nakatani T, Kitamura S. Regenerative vascular graft for aortic root reconstruction in porcine model. *The Society for Heart Valve Disease 4th Biennial Meeting*. New York, USA. 2007年6月15日～18日. *Abstract book of The Society for Heart Valve Disease 4th Biennial Meeting* 2007; 323.
- 8) 寺田堂彦, 藤里俊哉. 移植用生体弁の力学評価. 平成19年度繊維学会年次

- 大会 第9回生命工学材料とバイオテクノロジーに関するシンポジウム. 東京. 2007年6月20～22日. Fiber Preprints, Japan 2007; 62(2 Symposia): 15.
- 9) 藤里俊哉, 菊地正博, 坂下哲哉, 舟山知夫, 小林泰彦, 船本誠一, 木村 剛, 岸田晶夫, 山岡哲二. 放射線照射による脱細胞バイオスキャフォールドの調製. 第2回高崎量子応用研究シンポジウム. 高崎. 2007年6月21～22日. 第2回高崎量子応用研究シンポジウム要旨集 2007; 185.
- 10) Terada D, Sawada K, Ogata H, Ehashi T, Hiraku K, Kamata W, Yoshida K, Funamoto S, Nagaya N, Kishida A, Fujisato T, Nakatani T. Development of the Regenerative Vascular Graft having in *In vivo* Repopulation. Tissue engineering international and regenerative medicine society - Europe Chapter 2007 Annual Meeting. London, UK. 2007年9月4日～7日. 2007 Tissue Eng 2007; 13(7): 1673.
- 11) Ehashi T, Somekawa S, Udagawa H, Fujisato T. Novel cell seeding method for the tissue-derived acellular scaffolds. Tissue engineering international and regenerative medicine society - Europe Chapter 2007 Annual Meeting. London, UK, 2007年9月4日～7日. Tissue Eng 2007; 13(7): 1735.
- 12) 船本誠一, 橋本良秀, 佐々木秀次, 南広祐, 望月 學, 藤里俊哉, 木村 剛, 小林尚俊, 岸田晶夫. 超高压処理技術を応用した人工角膜の作製と評価. 第15回生物関連高圧研究会20周年記念シンポジウム. 横浜. 2007年9月6～7日. 第15回生物関連高圧研究会 20周年記念シンポジウム要旨集 2007; P-1.
- 13) 寺田堂彦, 藤里俊哉, 中谷武嗣, 北村惣一郎. 再生型生体弁の特性評価. 日本機械学会2007年度年次大会. 吹田. 2007年9月9日～12日. 日本機械学会2007年度年次大会講演論文集 2007; 5: 291-2.
- 14) 林 宏行, 山崎健一, 小林裕之, 宇戸禎仁, 江橋 具, 近藤英雄, 橋本成広, 藤里俊哉. 電気パルスによる骨格筋細胞収縮の制御. 第5回生活支援工学系学会連合大会. つくば, 2007年10月1日～3日. 第5回生活支援工学系学会連合大会講演予稿集 2007; 103.
- 15) 山崎健一, 林 宏行, 小林裕之, 宇戸禎仁, 近藤英雄, 橋本成広, 藤里俊哉. 電気パルスを用いた筋管細胞の収縮制御. 第18回バイオフィロンティア講演会. 福岡. 2007年10月6日～7日. 第18回バイオフィロンティア講演会講演論文集 2007; 23-4.
- 16) Fujisato T, Terada D, Niwaya K, Minatoya K, Kishida A, Nakatani T, Kitamura S. Tissue Regeneration by Acellular Scaffolds by Detergent-Free Treatment. Joint meeting of The 45th Annual Meeting of the Japanese Society for Artificial Organs and The 2nd International Federation for Artificial Organs. Osaka. 2007年10月28日～31日. J Artif Organs 2007; 36(2): S-14.
- 17) Yamasaki K, Hayashi H, Uto S, Ehashi T, Hashimoto S, Tsutsui H, Mochizuki S, Kondo H, Yoshiura M, Fujisato T. Control of skeletal muscle cell contraction by electrical pulse. Joint

- meeting of The 45th Annual Meeting of the Japanese Society for Artificial Organs and The 2nd International Federation for Artificial Organs. Osaka. 2007年10月28日～31日. J Artif Organs 2007; 36(2): S-37.
- 18) Ehashi T, Somekawa S, Udagawa H, Fujisato T. Novel Method for Interspersed Cell Inoculation into the Tissue-derived Scaffold. Joint meeting of The 45th Annual Meeting of the Japanese Society for Artificial Organs and The 2nd International Federation for Artificial Organs. Osaka. 2007年10月28日～31日. Artif Organs 2007; 36(2): S-99.
- 19) 山崎健一, 寺田堂彦, 近藤英雄, 橋本成広, 藤里俊哉. 無細胞生体由来組織を用いた筋芽細胞の3次元培養. 第10回日本組織工学会, 東京, 2007年11月8～9日. 第10回日本組織工学会抄録集 2007; 62.
- 20) 近藤英雄, 北孝之, 寺田堂彦, 山崎健一, 橋本成広, 藤里俊哉. 生体高分子ゲルを用いた電気インピーダンス法の基礎的検討. 第29回日本バイオマテリアル学会大会. 豊中. 2007年11月26～27日. 第29回日本バイオマテリアル学会大会予稿集 2007; 286.
- 21) 奈良雅尚, 山崎健一, 寺田堂彦, 澤田和也, 近藤英雄, 橋本成広, 藤里俊哉. ポリプロピレン繊維を用いた筋芽細胞の3次元培養. 第29回日本バイオマテリアル学会大会. 豊中. 2007年11月26～27日. 第29回日本バイオマテリアル学会大会予稿集 2007; 335.
- 22) Fujisato T, Yoshida K, Terada D, Niwaya K, Minatoya K, Kishida A, Nakatani T, Kitamura S. Tissue-derived Scaffold for Aortic Root Reconstruction. Tissue engineering international and regenerative medicine society - Asia Pacific Chapter Meeting 2007. Tokyo, Japan. 2007年12月3日～5日. TERMIS-AP 2007 Program & Abstract 2007; 124.
- 23) Fujisato T, Terada D, Sawada K, Yoshida K, Kishida A, Miyamoto K, Niwaya K, Nakatani T, Kitamura S. Evaluation of Acellular Scaffolds for Heart Valve Regeneration. 1st Asian Biomaterials Congress. Tsukuba, Japan. 2007年12月6日～8日. 1st Asian Biomaterials Congress Abstract, 2007; 112.
- 24) Ehashi T, Hashimoto S, Fujisato T. Acellular Skeletal Muscle Scaffold as an Inducer of Muscular Differentiation. 1st Asian Biomaterials Congress. Tsukuba, Japan. 2007年12月6日～8日. 1st Asian Biomaterials Congress Abstract 2007; 264.
- 25) 林宏行, 山崎健一, 宇戸禎仁, 小林裕之, 江橋具, 近藤英雄, 橋本成広, 藤里俊哉. 培養筋管細胞の収縮動態の定量評価. 第20回バイオエンジニアリング講演会. 東京, 2008年1月25～26日. 第20回バイオエンジニアリング講演会講演論文集 2008; No.07-49: 297-8.
- 26) Fujisato T, Terada D, Funamoto S, Minatoya K, Kishida A, Yamaoka T, Nakatani T, Kitamura S. Tissue Regeneration by Decellularized Biological Scaffold Prepared by Detergent-free Treatment. Biologic Scaffold for Regenerative Medicine 5th

Symposium. Phoenix, USA. 2008年2月14日～18日. Biologic Scaffold for Regenerative Medicine, 5th Symposium 2008; 12.

- 27) 藤里俊哉, 寺田堂彦, 湊谷謙司, 山崎健一, 林 宏行, 江橋 具, 小林尚俊, 岸田晶夫, 山岡哲二, 中谷武嗣, 北村惣一郎. 異種組織をテンプレートとする組織再生技術の開発. 第11回日本異種移植研究会. 吹田. 2008年2月23日. 第11回異種移植研究会プログラム・抄録集 2008; 19.
- 28) 藤里俊哉, 寺田堂彦, 湊谷謙司, 山崎健一, 林 宏行, 近藤英雄, 江橋 具, 小林尚俊, 岸田晶夫. 山岡哲二, 中谷武嗣, 北村惣一郎. 生体由来素材スキャフォールドを用いた臓組織再生. 第36回人工心臓と補助循環懇話会. 湯沢. 2008年3月7日～8日. 第36回人工心臓と補助循環懇話会プログラム・抄録集 2008; 78.
- 29) 寺田堂彦, 澤田和也, 緒方裕之, 平工香織, 鎌田和加子, 吉田謙一, 船本誠一, 藤里俊哉, 岸田晶夫, 山岡哲二, 中谷武嗣. 脱エラスチン化血管組織をスキャフォールドとして用いた動脈組織再生. 第7回日本再生医療学会総会. 名古屋. 2008年3月13～14日. 日本再生医療学会雑誌 2008; 7(Suppl): 280.
- 30) 奈良雅尚, 山崎健一, 寺田堂彦, 澤田和也, 近藤英雄, 橋本成広, 藤里俊哉. ポリプロピレン繊維-コラーゲン複合体を用いた筋芽細胞の三次元培養. 第7回日本再生医療学会総会. 名古屋. 2008年3月13～14日. 日本再生医療学会誌 2008; 7(Suppl): 285.
- 31) 山崎健一, 寺田堂彦, 奈良雅尚, 近藤

英雄, 橋本成広, 藤里俊哉. 脱エラスチン組織-コラーゲン複合体を足場としたC2C12細胞の3次元培養. 第7回日本再生医療学会総会. 名古屋. 2008年3月13～14日. 日本再生医療学会誌 2008; 7(Suppl): 285.

- 32) 林 宏行, 山崎健一, 小林裕之, 宇戸禎仁, 近藤英雄, 橋本成広, 藤里俊哉. 電界に対する培養筋管細胞の異方性. 第7回日本再生医療学会総会. 名古屋. 2008年3月13～14日. 日本再生医療学会誌 2008; 7(Suppl): 286.

### G-3. 新聞報道等

- 1) 他人の頭皮で毛髪再生. 朝日新聞. 2008年2月1日.

### H. 知的財産権の出願・登録状況

- 1) 岸田晶夫, 藤里俊哉, 木村 剛, 船本誠一. 脱細胞処理液、脱細胞化組織の調製方法、移植片、及び培養部材. 特許出願2007-217099. 2007年8月23日.
- 2) 岸田晶夫, 木村 剛, 南 広祐, 藤里俊哉. 機能性DNAの製造方法、形質転換体及び疾患治療剤. 特許出願2007-263704. 2007年10月9日.
- 3) 藤里俊哉, 岸田晶夫. 船本誠一, 中谷武嗣, 北村惣一郎, 超高静水圧印加による移植用生体組織の処理方法. 特許第4092397号、2008年3月14日.

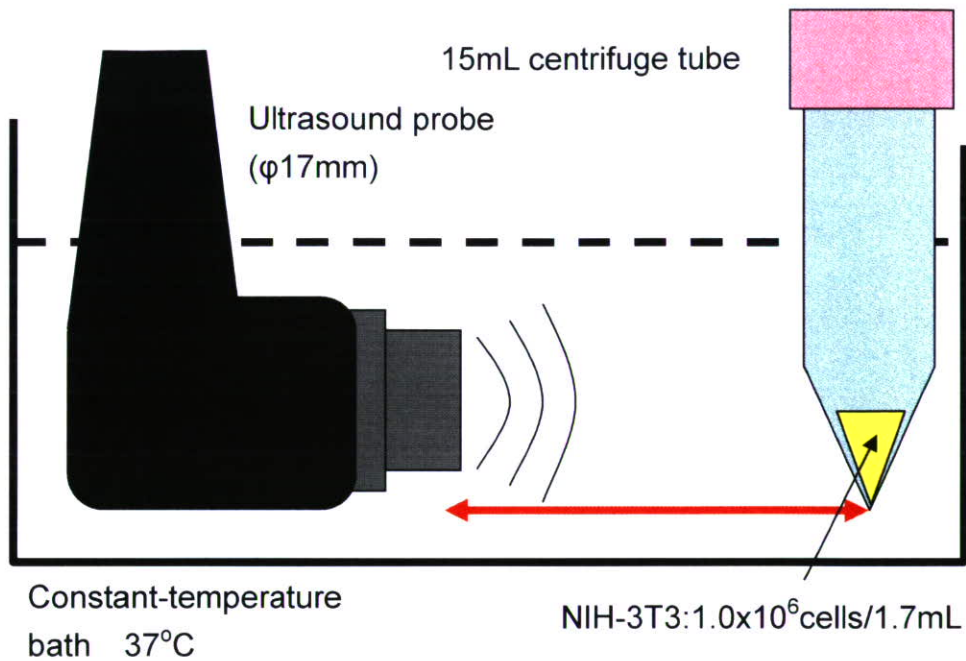


図 1. 間接系ソノポレーションの実験系

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。

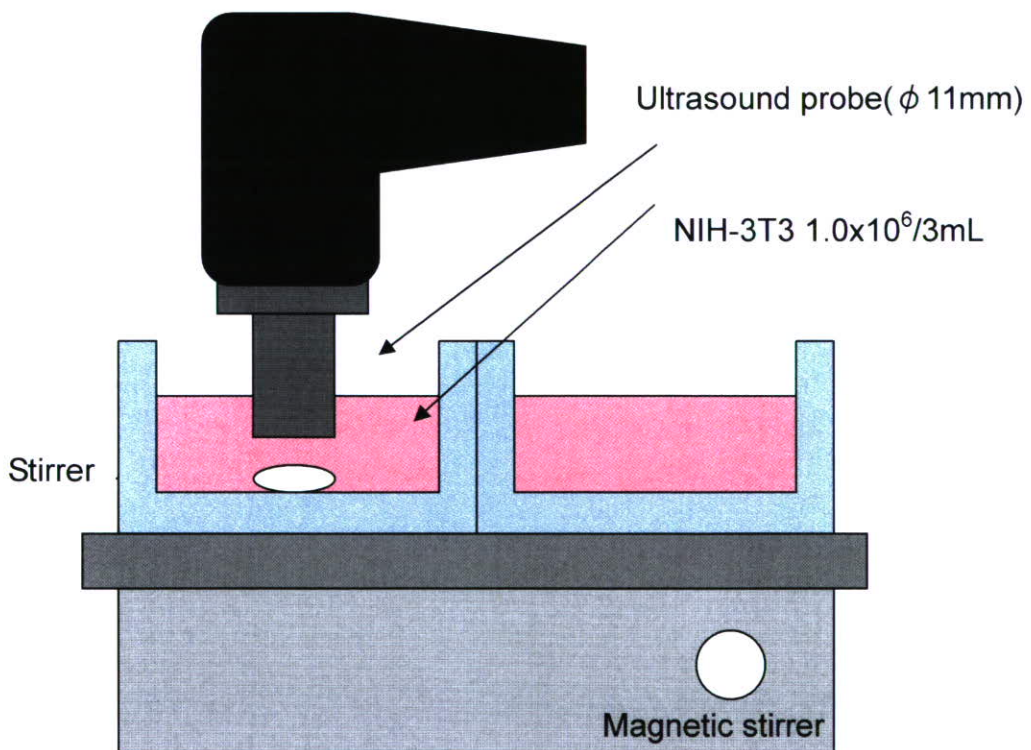


図 2. 直接系ソノポレーションの実験系

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。

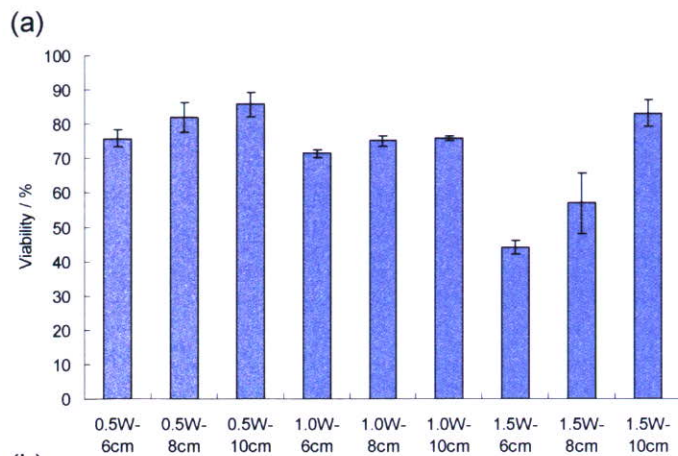
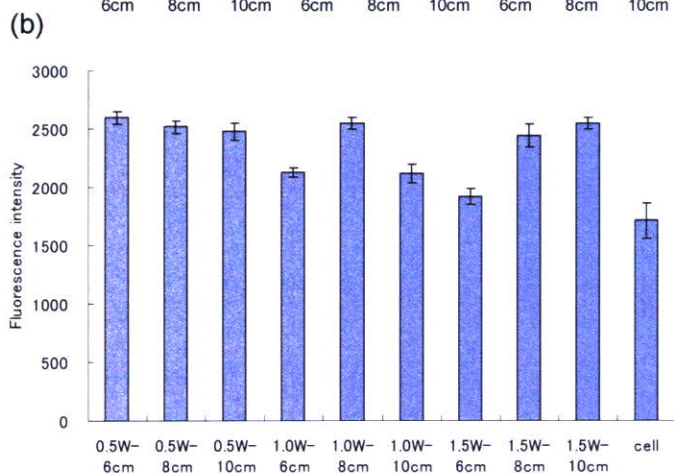


図 3. 直接系ソノポレーションの距離 (cm)と出力( $W/cm^2$ )における(a)細胞毒性と(b)蛍光強度の関係



距離を近づけ、出力を上げることで細胞の生存率は大きく低下していた。超音波のエネルギーが細胞のダメージになったと考えられる。蛍光強度は cell のみとほとんど変わらなかった。

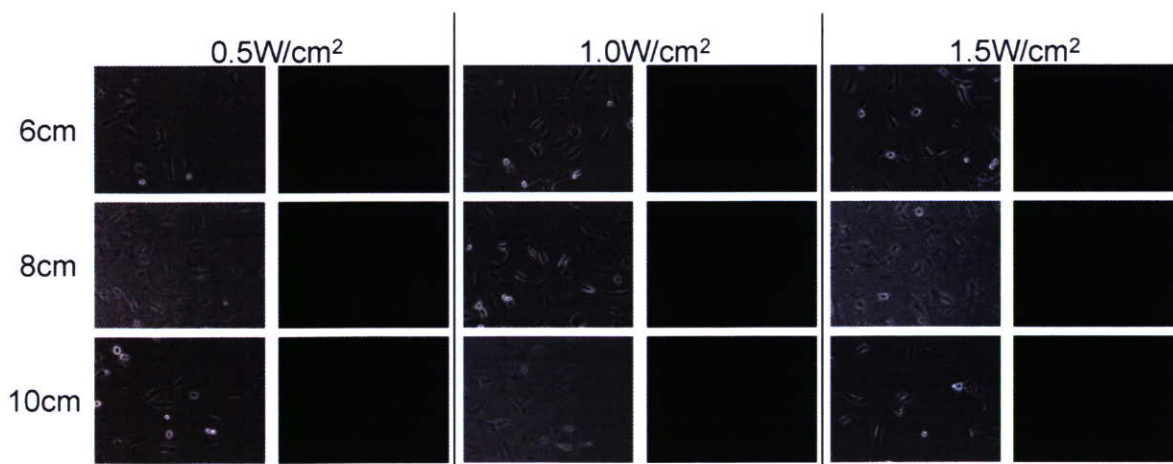


図 4. 様々な条件におけるソノポレーション後の細胞観察 (左側:明視野 右側:蛍光)

蛍光顕微鏡による観察より、細胞内には造影剤はほとんど導入されていなかった。つまり、超音波が間接的に接触する系は造影剤の導入に適していないことが分かった。

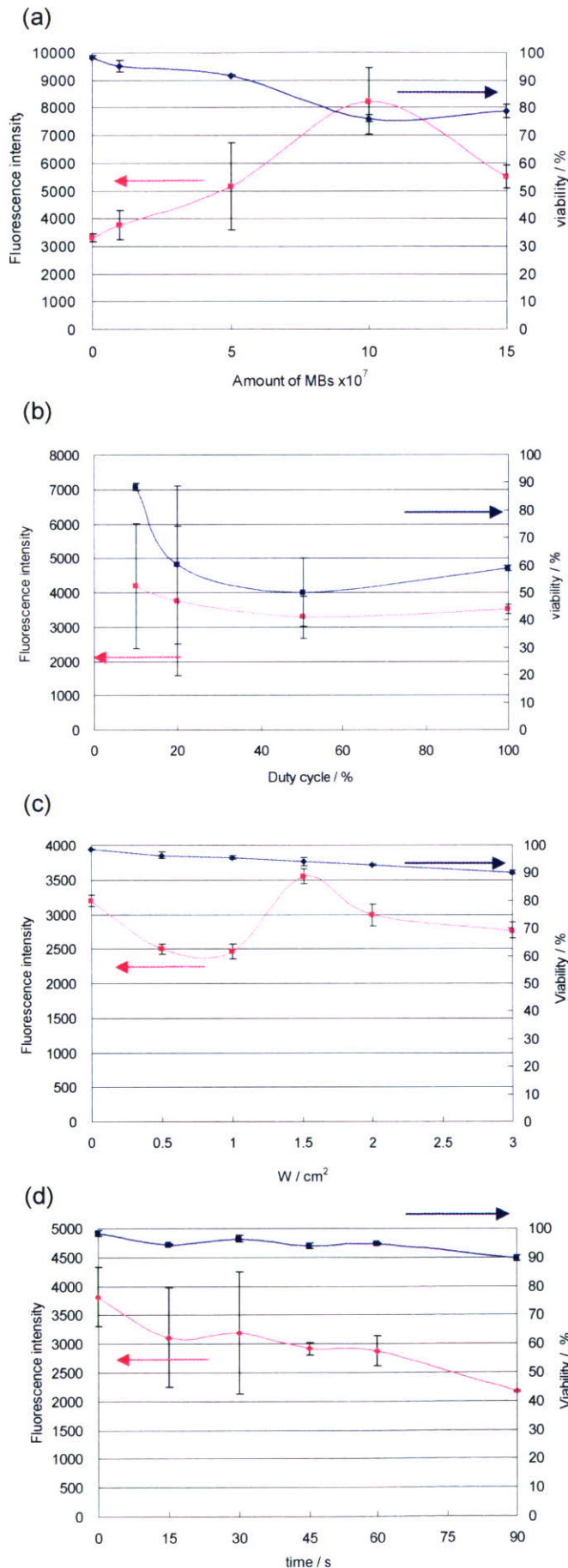


図 5. 直接系ソノポレーションにおける細胞毒性(-)と蛍光強度(-)の関係 (a) マイクロバブル (MBs) の量、(b) duty cycle、(c) 出力、(d) 時間

duty cycle の造影剤導入にもたらす影響が大きいことがわかった。最も良い条件は、 $W/cm^2=1.5$ 、duty cycle=10 %、time=30 s、マイクロバブル(MBs)の量 =  $1 \times 10^8$  個であることがわかった。



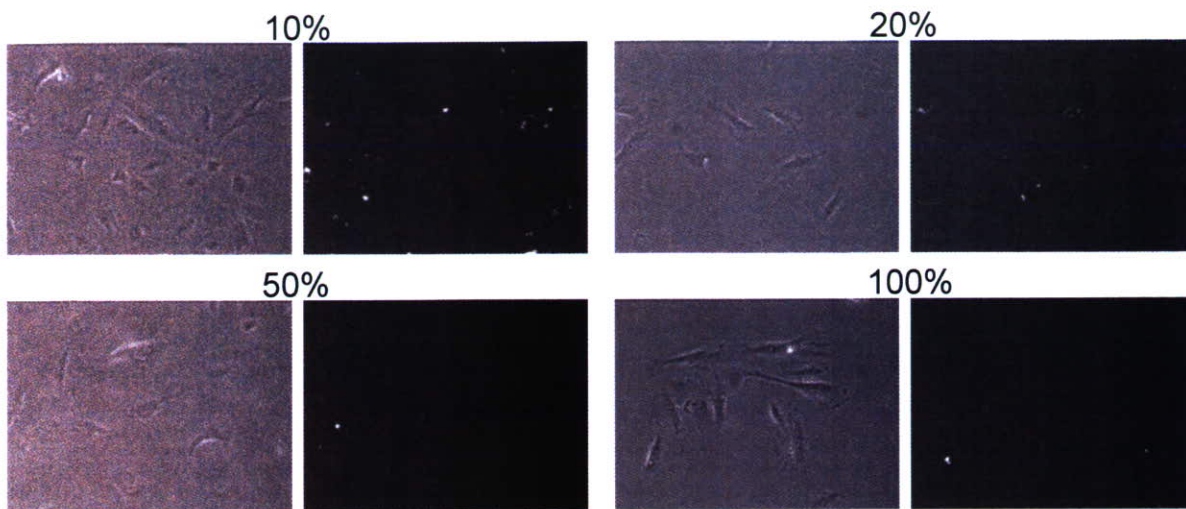


図 6. 直接系ソノポレーションにおける duty cycle を変化させた場合の蛍光顕微鏡写真 (左側: 明視野 右側: 蛍光)

蛍光顕微鏡観察により、造影剤による輝度の高い部分が見られ、Duty cycle が 10 % の条件において、細胞内に最も造影剤が導入されている様子が見られた。また間接的に超音波を照射するよりも、直接的に超音波が接触する方が細胞内によく導入されることがわかった。

## 別添 4

## 研究成果の刊行に関する一覧表レイアウト (参考)

## 書籍

	著者氏名	論文タイトル名	書籍全体の編集者名	書籍名	出版社名	出版地	出版年	ページ	添付資料ページ
1	山岡哲二 木村良晴 藤里俊哉	医療用バイオベースマテリアル	木村良晴・小原仁実 監修	バイオベースマテリアルの新展開	シーエムシー出版	東京	2007	187-197	89
2	山岡哲二 馬原 淳 橘 洋一	細胞移植療法に向けての工学的アプローチ	北村惣一郎監修	循環器病研究の進歩	協和企画	東京	2007	59-65	100
3	中谷武嗣	心臓移植		「新 目でみる循環器病シリーズ 15 心筋症」	メジカルレビュー社	東京	2007	89-94	107
4	藤里俊哉 北村惣一郎	心臓弁	筏 義人 監修	再生医療工学の技術	シーエムシー出版	東京	2007	142-7	115
5	銭谷 勉, 渡部浩司, 飯田秀博	SPECT イメージング	佐治英郎・田畑泰彦 編集	遺伝子医学MOOK9号「分子イメージング技術」	メディカルドゥ	東京	2008	75-81	119

## 雑誌

	発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年	添付資料ページ
1	山岡哲二	ポリ乳酸をベースにした再生医療用バイオマテリアル	バイオプラジャーナル	26	20-25	2007	127
2	山岡哲二	再生医療への工学的アプローチ	高分子	56	625-630	2007	133
3	A. Miskon, N. Sasaki, T. Yamaoka, H. Uyama, M. Kodama	Radial Flow Type Bioreactor for Bioartificial Liver Assist System Using PTFE Non-Woven Fabric Coated with Poly-amino Acid Urethane Copolymer	Macromolecular Symposia	249	151-158	2007	139
4	Kudomi N, Watabe H, Hayashi T, Iida H.	Separation of input function for rapid measurement of quantitative CMRO <sub>2</sub> and CBF in a single PET scan with a dual tracer administration method.	Phys Med Biol	52(7)	1893-1908	2007	147

5	Sohlberg A, Watabe H, Shidahara M, Iida H.	Body-contour versus circular orbit acquisition in cardiac SPECT: Assessment of defect detectability with channelized Hotelling observer.	Nucl Med Commun	28(12)	937-942	2007	163
6	Zeniya T, Watabe H, Sohlberg A, Iida H.	Accelerated 3D-OSEM image reconstruction using a Beowulf PC cluster for pinhole SPECT.	Ann Nucl Med	21 (9)	537-543	2007	169
7	Shimamura M, Sato N, Sata M, Kurinami H, Takeuchi D, Wakayama K, Hayashi T, Iida H, Morishita R.	Delayed Postischemic Treatment With Fluvastatin Improved Cognitive Impairment After Stroke in Rats.	<i>Stroke</i>	38(12)	3251-32 58	2007	176
8	渡部 浩司	癌診断における PET/SPECT 技術 —過去・現在・未来.	実験医学増刊号	25(17)	188-193	2007	186
9	渡部 浩司, 寺本 昇, 合瀬 恭幸, 銭谷 勉	小動物イメージング最近の動向.	臨床放射線	52 (9)	1108-11 13	2007	192
10	飯田 秀博, 渡部 浩司, 赤松 哲哉, 中澤 真弓, 松原 圭亮, 竹内 朝子, 岩田 倫明, 林 拓也, 横田 千晶, 福島 和人, 福本 真司	SPECT を使った脳機能画像の定 量化と標準化.	脳神経外科ジャー ナル	16 (10)	742-752	2007	198
11	田中秀治、篠 崎尚史、浅水 健志、青木 大、中谷武嗣	組織移植の現状と今後の展望	移植	42(3)	242-252	2007	209
12	中谷武嗣、加 藤倫子、眞野 暁子、船津俊 宏	移植医療—機械的循環補助も含め て—	循環器科	62(1)	67-73	2007	220

13	高内裕司、今中秀光、竹内宗之、西田朋代、橘一也、中谷武嗣	心臓移植の術後急性期管理	日集中医誌	14	551-554	2007	227
14	今中秀光、中谷武嗣、北村惣一郎	心移植術後急性期の合併症と問題点	胸部外科	60	958-962	2007	231
15	Wada K, Takada M, Kotake T, Ochi H, Morishita H, Komamura K, Oda N, Mano A, Kato T, Hanatani A, Nakatani T.	: Limited sampling strategy for mycophenolic acid in Japanese heart transplant recipients. - Comparison of cyclosporin and tacrolimus treatment -	Circulation Journal	71	1022-1028,	2007	237
16	Wada K, Takada M, Ueda T, Ochi H, Kotake T, Morishita H, Hanatani A, Nakatani T.	: Relationship between acute rejection and cyclosporine or mycophenolic acid levels in Japanese heart transplantation.	Circ J	71	289-293	2007	244
17	Wada K, Takada M, Ueda T, Ochi H, Kotake T, Morishita H, Hanatani A and Nakatani T.	: Drug interactions between tacrolimus and phenytoin in Japanese heart transplant recipients.: 2 case reports.	International Journal of Clinical Pharmacology and Therapeutics.	45	524-528	2007	250
18	Fujisato T, Niwaya K, Minatoya K, Kishida A, Nakatani T, Kitamura S.	Reduction of Antigenicity and Risk of Infection in Regenerative Tissue Transplantation by Cold Isostatic Pressing.	High Press Biosci Biotech	1(1)	161-5	2007	256