

[<sup>11</sup>C] THK-1062



Aβ (6F/3D)

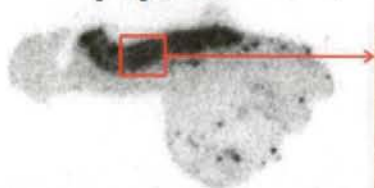
Tau (AT8)



[<sup>18</sup>F] THK-2153



[<sup>11</sup>C]BF-227



Aβ (6F/3D)

Tau (AT8)

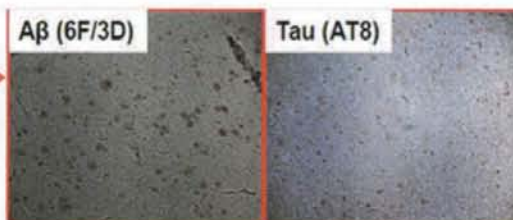


図 6. AD 患者様脳切片 (海馬) におけるオートラジオグラフィ

[<sup>11</sup>C]BF-227 は申請者らによって開発された Aβイメージング用 PETプローブ。 [<sup>11</sup>C]BF-227 は Aβに親和性および選択性の高いプローブであることが確かめられた。

[<sup>11</sup>C]THK-1062 はタウに選択性は高いが、親和性は低かった。

[<sup>11</sup>C]THK-1062 画像の左側に高集積が見られるが、これは切片の左側がより厚いために生じたアーティファクトである。

一方、 [<sup>18</sup>F]THK-2153はタウに比較的親和性が高く、またAβよりもタウに対する高い選択性を有していた。

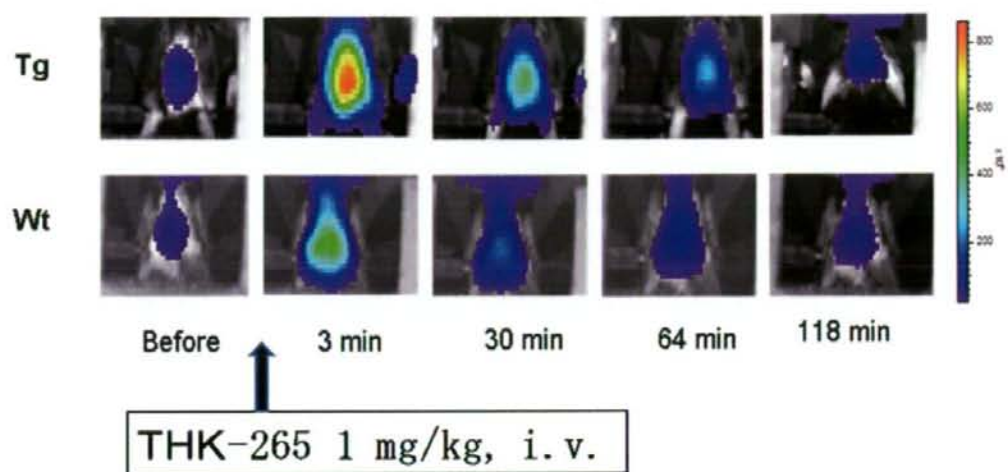


図 7. 32 ヶ月齢 Tg2576 (脳内に  $A\beta$  が蓄積するトランスジェニック) マウスおよび同月齢 Wt (ワイルドタイプ) マウスにおける THK-265 1 mg/kg 静脈内投与後のイン ビボ アミロイドイメージング画像

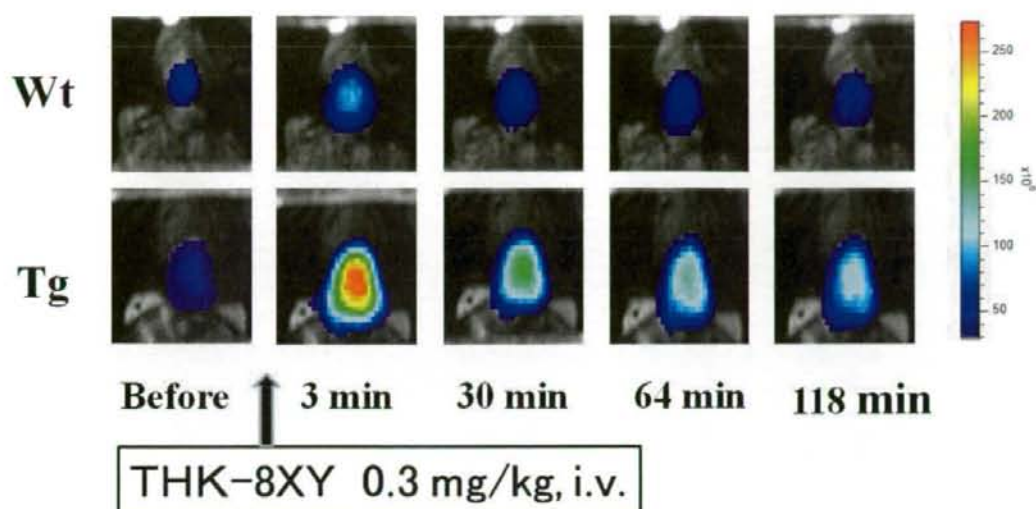


図 8. 22 ヶ月齢 Tg2576 (脳内に  $A\beta$  が蓄積するトランスジェニック) マウスおよび同月齢 Wt (ワイルドタイプ) マウスにおける THK-8XY 0.3 mg/kg 静脈内投与後のイン ビボ アミロイドイメージング画像

添付資料 1

若手研究者の教育について

医学部5年生に対する第3次修練において「ADの発症前診断」として「AD研究および最新の同病診断法の現状」につき隔週で2時間の講義を行っている。その際使用しているスライド(全約250枚)の一部を以下に示した。

また、平成21年1月14日の第3次修練スケジュールを添付表1に示した。


### アルツハイマー病の発症前診断 Ver.77

未来医学治療開発センター  
工藤 幸司  
Yukitsuka Kudo

### AD患者人口の推移


(65歳以上の5%として算出) (単位:万人)

	2005年	2010年	2015年	2020年
日本				
65歳以上人口	2,560	2,875	3,312	3,532
Alzheimer病患者人口	128	144	166	177
先進国				
65歳以上人口	18,564	19,532	21,563	23,778
Alzheimer病患者人口	928	977	1,078	1,189



Famile Alzheimer      Peterlin "Frau Augusta D"


[http://www.martinet.de/kultur\\_31/Alzheimer\\_gic.htm](http://www.martinet.de/kultur_31/Alzheimer_gic.htm)



Normal      Alzheimer

### ADの神経病理変化


老人斑 (Senile Plaques)      神経原線維変化 (Neurofibrillary Tangles)



「The presence and distribution of amyloid plaques in the cerebral cortex...」  
「The presence of an abnormal phosphorylated tau protein...」


アミロイドβ蛋白      主要構成成分      タウ蛋白

### 老人斑(Aβ)のβシート構造に結合する化合物を探す

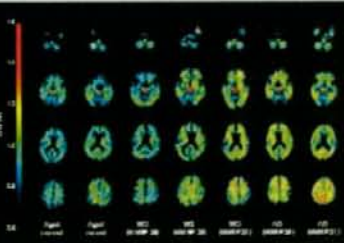


プローブ (化合物)      老人斑 (Aβ)


鍵穴:βシート構造



「[18F]BF-227」のPET画像

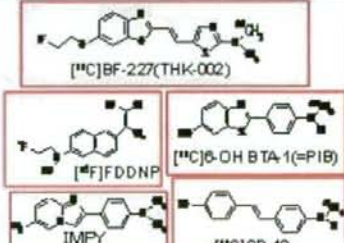


Brain regions showing high  $DVR$  values in AD patients, than in norm of subjects



### お薦めの「アルツハイマー病に関する検索データベース」

23117 論文も検索



$[^{14}C]$ BF-227 (THK-002)

$[^{14}C]$ G-OH BTA-1 (=PIB)

IMPY       $[^{14}C]$ SB-13

### $[^{18}F]$ 標識プローブ

$[^{18}F]$ BAV94-012 (AV-128)       $[^{18}F]$ JAV-01

ペンシルベニア大. Kong 夫妻. Bayer Schering

$[^{18}F]$ F3-013       $[^{18}F]$ F3-013

ピンツバーク大 Khank. General Electric

東北大 工藤研  
 $[^{18}F]$ F3-013  
平成20年3月13日  
探索的臨床研究  
スタート

神経原線維変化を認識する化合物

現在開発中

Development of a novel fluorescent probe for recognizing neurofibrillary changes in Alzheimer's disease

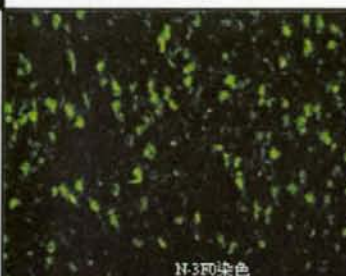
Dr. [Name] is a Professor of [Department] at [University]. He has been working on the development of a novel fluorescent probe for recognizing neurofibrillary changes in Alzheimer's disease. The probe is designed to specifically bind to the tau protein, which is a major component of neurofibrillary tangles. The probe is highly sensitive and specific, and can be used to detect neurofibrillary changes in both cultured cells and animal models. This probe is expected to be a valuable tool for the diagnosis and treatment of Alzheimer's disease.

アルツハイマー病における病理変化



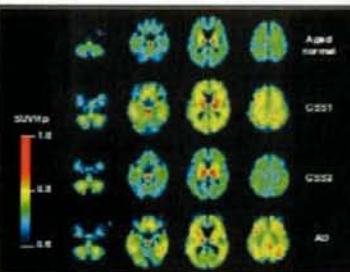
タウには閾値がある

A $\beta$  アミロイドには閾値がない



タウイメージング用プローブ

- AD型 A $\beta$ 型 過剰リン酸化型タウを認識
- タウ選択的プローブが求められている
- アミロイドをイメージングする
- 早期、発症前診断
- タウをイメージングする
- 進行度(重症度)診断



新しいアルツハイマー病治療法

(病理学による治療法-但し科学的な治療法ではない)

1. 免疫療法(ワクチン療法)
2. シンク学説に基づく薬剤
3.  $\beta$ -セクレターゼ阻害剤
4.  $\gamma$ -セクレターゼ阻害剤
5. A $\beta$ 凝集阻害・分解促進剤
6. ネプリライシン

Myriad Genetics Reports Results of U.S. Phase 3 Trial of Flurizan™ in Alzheimer's Disease

Dr. [Name] is a Professor of [Department] at [University]. He has been working on the development of a novel fluorescent probe for recognizing neurofibrillary changes in Alzheimer's disease. The probe is designed to specifically bind to the tau protein, which is a major component of neurofibrillary tangles. The probe is highly sensitive and specific, and can be used to detect neurofibrillary changes in both cultured cells and animal models. This probe is expected to be a valuable tool for the diagnosis and treatment of Alzheimer's disease.

Baptist と Tauist

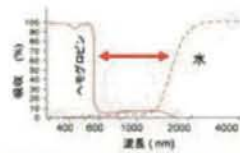
Baptist: アルツハイマー病の主たる病因はA $\beta$

Tauist: アルツハイマー病の主たる病因はタウ

新しいアミロイドand/orタウイメージング法

- ・光技術
- 近赤外蛍光プローブ
- + 近赤外蛍光診断装置

生体の光吸収と分光学的窓



最新研究

- A $\beta$  凝集阻害剤の開発
- シンク学説に基づく薬剤
- $\beta$ -セクレターゼ阻害剤
- $\gamma$ -セクレターゼ阻害剤
- A $\beta$  凝集阻害・分解促進剤
- ネプリライシン

共同発表(共同)

- Dr. [Name] is a Professor of [Department] at [University]. He has been working on the development of a novel fluorescent probe for recognizing neurofibrillary changes in Alzheimer's disease. The probe is designed to specifically bind to the tau protein, which is a major component of neurofibrillary tangles. The probe is highly sensitive and specific, and can be used to detect neurofibrillary changes in both cultured cells and animal models. This probe is expected to be a valuable tool for the diagnosis and treatment of Alzheimer's disease.

添付表1. 第3次修練スケジュール

老年科・漢方内科合同第3次臨床修練週間スケジュール 平成21年1月					
担当教員：岩崎（内線 7185、PHS 5801）					
	12月 月	13日 火	14日 水	15日 木	16日 金
8:30	祝日				新患プレゼン(外)
9:00		オリエンテーション	新患診察 古川勝敏(外)	生薬研究	呼吸器病学 (気管支鏡実習)
		および患者様紹介 岩崎(西)	薄老原孝枝(外)	藤原(漢方)	大塚(西)
10:00		担当患者の回診			
		レポート作成(西)		担当患者の回診	
11:00		「加齢と老年医学」 荒井(西)		レポート作成 (西)	
12:00		昼食会 (加齢-カン)			
13:00		病棟カンファランス	アルツハイマー病 の病理診断 東京医工学 工業 (西)	高齢者総合評価 薄幸原寛(外)	「老年神経学実践」 藤谷(外)
14:00		(西)		レポート作成 (西)	老年期終末医療 小坂(西)
15:00			漢方医学 岩崎 (漢方)	鍼灸・中風伝統医 学 関(外)	病棟症例報告会 大塚(西)
16:00		診察指導 浅田 (西)			

SGT学生	配属	レポート産例 (主治医氏名)
三井 英徳 阿部 秋代	Aグループ配属	村田 元夫 榎 (浅田先生)
藤澤 亮 加賀谷 裕太 佐藤 新	Bグループ配属	阿部 由雄様 (浅村先生)

Aグループ医師  浅田、高橋、吉田、矢澤田  
 Bグループ医師  小坂、宇根、山崎、浅村  
 : ベッドライター

集合場所：西 西病棟16階SGT室  
 医 医局(加齢研プロジェクト棟3階老年医学研究分野ミーティングルーム)  
 外 外来(診療棟2階、老年科・漢方内科外来)  
 教 教授室(加齢研プロジェクト棟3階老年医学研究教授室)  
 加齢-カン 加齢研プロジェクト棟3階老年医学研究分野カンファランスルーム

## 厚生労働科学研究費補助金（医療機器開発推進研究事業）

### 平成20年度 分担研究報告書

#### 細胞工学研究の基盤及び若手研究者の教育に関する研究

分担研究者 後藤昌史 東北大学・国際高等研究教育機構・准教授

研究要旨：本研究においては、重症糖尿病患者を対象とした膵島細胞移植をモデルケースとし、社会に還元できる成果を生み出す実学的細胞工学研究の基盤を構築することを目的としている。本年度は、企業および細胞工学を志す若手研究者と共に、まず細胞の質の向上をもたらす革新的培養・移植デバイスの構築に取り組んだ。酸素透過性に優れ、膵島の凝集を起こしにくい至適材質を導入した新規開発デバイスは、良好な膵島機能を保持し、またアポトーシスに陥る膵島の割合を減弱させる事が判明した。さらに本研究においては、精度の高い膵島機能評価法の構築にも着手し、医工連携を積極的に導入し、膵島自身の呼吸によって生じる還元電位を波形として具現化する呼吸活性測定システムの確立に成功した。このシステムはこれまでのパイアピリティー評価法とは根本的に異なり、非侵襲的であるため、膵島そのもののパイアピリティーを経時的に観察することが初めて可能となった。今後、臨床現場における移植前評価法としてのみではなく、新規膵島分離溶液や新規膵島分離プロトコールの評価システムとして、その重要性が増していくものと推察される。本研究においては、当初のねらい通り、細胞工学を専攻する大学の若手研究者と、異なるバックグラウンドを有する企業の若手研究者が、主体的かつ有機的に、社会ニーズという出口を意識した上での共同開発を行っていくアプローチそのものに最大の意義があると考えている。

#### A. 研究目的

実学的医工学教育・研究拠点育成における我々の担当は「細胞工学研究の基盤及び若手研究者の教育」で

ある。本研究においては、2003-2007年度に実施された科学技術振興調整費科学技術拠点育成（先進医工学研究機構：TUBERO）における研究テ

一マの一つである「工学的アプローチ導入によるTUBERO式膵島分離・移植法及び移植前膵島評価法の確立」を継承し、重症糖尿病患者を対象とした膵島細胞移植をモデルケースとし、社会に還元できる成果を生み出す実学的細胞工学的研究の基盤を構築することを目的としている。

本年度は、企業および細胞工学を志す若手研究者と共に、まず細胞の質の向上をもたらす革新的培養・移植デバイスの構築に取り組んだ。膵島細胞移植領域において、これまで専用の培養・移植デバイスが存在せず、安全・衛生・医学的観点からその確立が求められてきた経緯がある。我々はこれまでに、世界に先がけ膵島培養において培養バッグが有用であることを報告してきた（*Transplantation* 78:1367:2004 Goto M.）。本開発研究においては、それをさらに推進し、企業と有機的連携を構築することにより、酸素透過性に優れ膵島の凝集を起こしにくい新規至適材質をスクリーニングし、デバイスの要とした。また、開発デバイスは汎用性をもたせることにより広く細胞療法全般に使用することが可能であり、実学的医工学を推進していく上で相応しい研究テーマであると考えた。

こういった新規開発デバイスの有用性を検証するためには、精度の高い

膵島機能評価法を構築することが必須である。これまで信頼に足る膵島機能評価法はどこにも存在せず、このこと自体、膵島細胞移植領域における大きな世界的課題となっている。そのため分担者等は、本研究において我々がこれまでに独自に考案した新規膵島評価システムの探索的臨床研究へ向けた前臨床研究にも着手した。

## B. 研究方法

### (I) 細胞の質の向上をもたらす革新的培養・移植デバイスの構築に関する研究

臨床に準じ、温阻血を30分被ったブタより膵島分離実験（n=20）を行い、(I)従来法である培養フラスコ (II)市販血小板用培養バッグ (III)ニプロ（株）と共同開発した新規開発デバイスの三群に分け膵島を約24時間、37度5% CO2下に培養した。培養後膵島の残存率、機能テスト（*in vitro*糖負荷試験）、パイアピリティーテスト（ADP/ATP assay）を評価し、各デバイスの比較検討を行った。本研究を通し、企業および大学にて細胞工学を志す若手研究員が立案から評価に至るまで主体的に取り組む体制の構築にも取り組んだ。



(II) 非侵襲性呼吸計測技術を基盤とした東北大式膵島評価システムの  
前臨床研究

分離されたラット膵島に heat shock を 0、40、50、60、80 秒加えた (各群  $n=6$ )。膵島呼吸測定法、膵島呼吸活性の糖負荷による変動を計測する糖負荷膵島呼吸活性法、糖負荷膵島機能試験、ADP/ATP ratio、Insulin/DNA、Tripan Blue test と分離膵島による同種同系糖尿病ラットの移植効果の相関について検討を行った。

C. 研究結果

(I) 細胞の質の向上をもたらす革  
新的培養・移植デバイスの構築に関  
する研究

膵島残存率は (I)  $21.9 \pm 4.7$ 、(II)  $19.8 \pm 7.8$ 、(III)  $37.4 \pm 6.4\%$  であり、新規開発デバイスにてより多くの膵島が保たれる事が判明した。*In vitro* 糖負荷試験においては、新規開発デバイスにて培養された膵島の stimulation index が有意に高値を示した ( $p=0.04$ )。パイアピリティーテストにおいても、新規開発デバイスにて培養された膵島の ADP/ATP ratio はフラスコに比べ有意に低値

を示し、アポトーシスに陥る膵島の割合を減弱させる事が判明した (新規開発デバイス:  $0.06 \pm 0.02$  vs フラスコ:  $0.14 \pm 0.03$ ,  $p=0.04$ )。

(II) 非侵襲性呼吸計測技術を基盤  
とした東北大式膵島評価システムの  
前臨床研究

糖負荷膵島呼吸活性、呼吸活性基礎値、ADP/ATP assay、糖負荷試験と移植効果との間に有意な相関を認めた ( $\rho = 0.80, 0.71, -0.66, 0.53$ )。Insulin/DNA 及び Tripan Blue test は移植効果との間に相関を認めなかった ( $\rho = -0.47, 0.23$ )。糖負荷膵島呼吸活性法においては、呼吸測定法と糖負荷試験を組み合わせる手法と同等である 91% の的中率が得られた。

D. 考察

本研究においては、細胞工学を専攻する大学の若手研究者と材質に長けた企業の若手研究者が、主体的かつ有機的に、社会ニーズという出口を意識した上での共同開発を行ったアプローチそのものに最大の意義があると考えている。具体的な研究成果として、酸素透過性に富む新規素材を導入した世界初となる膵島専用の培養・移植用デバイスの構築に成功することが

できた。これは分離膵島のバイアピリティー向上をもたらすばかりではなく、分離操作の安全性・迅速性を飛躍的に促進させ、膵島移植を医療として普及していく上で大きく貢献するものと思われる。

一方、本研究においては、有用な膵島機能評価法が現存しないというニーズに着目し、医工連携を積極的に導入し、膵島自身の呼吸によって生じる還元電位を波形として具現化する呼吸活性測定システムの確立に成功した。このシステムはこれまでのバイアピリティー評価法とは根本的に異なり、非侵襲的であるため、膵島そのもののバイアピリティーを経時的に観察することが初めて可能となった。今後、臨床現場における移植前評価法としてのみではなく、新規膵島分離溶液や新規膵島分離プロトコールの評価システムとして、その重要性が増して

いくものと推察される。

細胞療法を今後より広く普及していくためには、問題点を多角的に捉え、異分野を融合し、積極的に臨床と隣り合わせのトランスレーショナルリサーチを展開していく必要があると思われる。

## E. 結論

(I) 新規開発細胞デバイスは、簡便性・清潔性・酸素透過性に優れており、培養から移植までの一連の操作時間を大幅に短縮し得るのみならず、細胞のクオリティーを良好に保ち得ることが判明した。

(II) 迅速、簡便、高精度である糖負荷膵島呼吸活性法は、移植効果を短時間で的確に予見し得る理想的な膵島評価法であることが判明した。

## F. 研究発表

### 1. 論文発表

(1) Takahashi H, **Goto M**, Ogawa N, Saito Y, Fujimori K, Kurokawa Y, Doi H, **Satomi S**  
Superiority of fresh islets compared with cultured islets. *Transplantation Proc.* 41(1):350-351, 2009

(2) **Goto M**, Abe H, Ito-Sasaki T, Goto M, Inagaki A, Ogawa N, Fujimori K, Kurokawa Y, Matsue T, **Satomi S**  
A novel predictive method for assessing the quality of isolated pancreatic islets using a scanning electrochemical microscopy. *Transplantation Proc.* 41(1):311-313, 2009

(3) Saito Y, **Goto M**, Maya K, Ogawa N, Fujimori K, Kurokawa Y, and **Satomi S**  
Brain death in combination with warm ischemic stress during isolation procedures induces the expression of crucial inflammatory mediators in the isolated islets *Cell. Transplantation*. in press 2009  
(4) Tokodai K, **Goto M**, Imura T, Ogawa N, Fujimori K, Kurokawa Y, Okada H, **Satomi S**.  
C5a inhibitory peptide combined with gabexate mesilate is a clinically available candidate for preventing the instant

blood-mediated inflammatory reaction.  
*Transplantation Proc.* 41(1)67-68,2009

(5)Saito Y, **Goto M**, Maya K, Ogawa N, Fujimori K, Kurokawa Y, **Satomi S**

The influence of brain death on tissue factor expression in the pancreatic tissues and isolated islets in rats. *Transplantation Proc.* 41(1)307-310,2009

(6)**Goto M**, Tjernberg J, Dufrane D, Elgue G, Brandhorst D, Ekdahl KN, Brandhorst H, Wennberg L, Kurokawa Y, **Satomi S**, Lambris JD, Gianello P, Korsgren O, Nilsson B Dissecting the instant blood-mediated inflammatory reaction in islet xenotransplantation

*Xenotransplantation*15(4)225-234,2009

(7)**Goto M**, Yoshikawa Y, Matsuo K, Shirasu A, Ogawa N, Takahashi H, Saitoh Y, Fujimori K, Kurokawa Y, Tamai M, **Satomi S**

Optimization of a Prominent Oxygen-Permeable Device for Pancreatic Islets  
*Transplantation Proc.*41(2)411-412, 2009

(8)Takahashi H, **Goto M**, Ogawa N, Saitoh Y, Fujimori K, Kurokawa Y, Doi H, **Satomi S**  
Influence of a current style of culture on the quality of isolated pancreatic islets

*Transplantation Proc.* 41(2)358-359, 2009

## 2. 学会発表

(1) C5a を標的とした補体阻害ペプチド AcPepA 導入による移植後早期膵島障害の制御

第43回補体シンポジウム・2008 7月10-12日 札幌

(2) A NOVEL PREDICTIVE METHOD FOR ASSESSING THE QUALITY OF ISOLATED PANCREATIC ISLETS USING A SCANNING ELECTROCHEMICAL MICROSCOPY

XXII International Congress Of The Transplantation Society, 2008 Aug 10-14 Sydney

(3)Predictive methods for assessing the

quality of isolated pancreatic islets

XXII International Congress Of The Transplantation Society, 2008 Aug 10-14 Sydney, *invited speaker*

(4) THE INFLUENCE OF BRAIN DEATH ON TISSUE FACTOR EXPRESSION IN THE PANCREATIC TISSUES AND ISOLATED ISLETS IN RATS

XXII International Congress Of The Transplantation Society, 2008 Aug 10-14 Sydney

(5) C5A INHIBITORY PEPTIDE COMBINED WITH GABEXATE MESILATE IS A CLINICALLY AVAILABLE CANDIDATE FOR PREVENTING THE INSTANT BLOOD-MEDIATED INFLAMMATORY REACTION

XXII International Congress Of The Transplantation Society, 2008 Aug 10-14 Sydney

(6) C5a inhibitory peptide AcpepA is a clinically available candidate for preventing rapid loss of intraportally transplanted islets

XXII International Complement Workshop,2008 Sep 28-Oct 2 Basel (Switzerland)

(7) 有用な膵島評価法である呼吸活性計測法の実際

第44回日本移植学会 2008年9月19-21日 大阪

(8) 東北大学における膵島移植の取り組み  
第44回日本移植学会 2008年9月19-21日 大阪

(9) 補体障害ペプチド導入による移植後早期膵島障害の制御

第 44 回日本移植学会 2008 年 9 月 19-21 日  
大阪

(10) 脳死状態が膵島の Tissue Factor 発現へ及ぼす影響に関する検討

第 44 回日本移植学会 2008 年 9 月 19-21 日  
大阪

(11) Key issues in islet xenotransplantation 4<sup>th</sup>  
Xenotransplantation Seoul Forum, 2008 Nov. 8  
Seoul *invited speaker*

(12) Improvement of preservation and evaluation for pancreatic by introducing bioengineering approach 第 35 回日本低温医学会総会 2008 Nov22-23 Tokyo *invited speaker*

(13) 脳死状態が膵島の炎症性メディエーター発現へ及ぼす影響

第 35 回日本臓器保存生物医学会定期学術集会 2008 年 11 月 22-23 日 東京

(14) 膵島移植の現在と未来  
第 8 回東北小児糖尿病研究会・2008 11 月 29 日 仙台

#### 招待講演

(15) 今後の膵島移植発展への試み

第 36 回膵膵島移植研究会・2009 2 月 27-28 日 福岡

#### シンポジウム講演

(16) 長期保存を要する心停止ドナーからの膵島分離への対策

第 36 回膵膵島移植研究会・2009 2 月 27-28 日 福岡

(17) 凝固・補体系の制御による移植後早期膵島障害の抑制

第 36 回膵膵島移植研究会・2009 2 月 27-28 日 福岡

(18) 膵島移植の現状と今後の展望

第 8 回日本再生医療学会・2009 3 月 5-6 日 東京

#### シンポジウム依頼講演

(19) 異種膵島移植実現へ向けたブタ膵島の大量安定供給と品質評価システムの構築

第 12 回日本異種移植研究会・2009 3 月 7 日 鹿児島

#### ワークショップ講演

## G. 知的財産権の出願・登録状況

### 1. 特許取得

1 件出願済み

### 2. 実用新案登録

なし

### 3. その他

なし

平成 20 年度 分担研究者報告

胎児心電図の研究開発と若手研究者の教育に関する研究

分担研究者 木村芳孝 東北大学・国際高等研究教育機構・教授

A. 研究目的

1. 研究に至る経過

実学的医工学教育・研究拠点育成における研究分担者 木村芳孝の分担研究項目は「胎児心電図の研究開発と若手研究者の教育」である。当分担項目は 2003-2007 年度に実施された科学技術振興調整費科学技術拠点育成「先進医工学研究教育機構（TUBERO）」における研究テーマの一つである胎児循環系モニタリングの開発「2次元マップを用いた子宮内情報の可視化による胎児心血管疾患及び胎児仮死の早期診断法の確立」を継承している。

産科医療で胎児の状態評価に現在使われているのが、超音波プローベを用い胎児心臓の動きから一分間の心拍数を計算し、その心拍数変化から胎児の状態を調べる分娩監視装置である。

この分娩監視装置による胎児モニタリングの不備が 1990 年代に入り、次第に明らかに成ってきた。問題点は

- ① false positive が 60-70% と高いこと。従って、具合が悪いと診断し帝王切開した症例の実に 10 例に 6-7 例が元気だったのに帝王切開されたことになる。
- ② 胎児期の脳障害を原因とする脳性麻痺の頻度が分娩監視装置導入前後で 50 年以上、全く改善していなかったことである。

新しい胎児診断装置の開発は、産科医療にとって急務の課題と考えられる。

これに対して、超音波が進んだ現在でも、子宮内で診断できる疾患は、生後に診断できる疾患の 50% に止まっている。特に、機能診断は難しく循環系の基本的なモニタリング技術である心電図すら、胎児期での計測は不可能とされてきた。

胎児心電図が計測困難である最大の原因は、胎児心電図信号が 5-20  $\mu\text{V}$  と母体心電図(1000  $\mu\text{V}$ ) に比べ 50-200 分の 1 と大変小さく、母体筋電(約 100  $\mu\text{V}$  前後)などの雑音に埋もれてしまい計測が困難であることである。

研究分担者らは、2003 年にスタートした先進医工学研究機構（TUBERO）」において、胎児期のより詳しい循環系の情報を得るために、それまで不可能と根が得られてきた胎児心電図装置を開発してきた。

2. 本研究の目的

本分担研究の目的は、これらの研究を踏襲し臨床で使えるより実用的な装置の開発を通し研究拠点の構成、教育の問題点を明らかにし、また、この解決を通じて、新しい実学的医工学教育・研究拠点育成を行う。

以下に今期（20 年度）の開発目標を示す。

【開発目標】

- ① 生体体表から 5  $\mu\text{V}$  の生体活動電位をシールドルーム以外（外来、病棟）で計測出来る技術の開発。（高精度生体電位フィールド計測技術）
- ② だれでも計測可能なシート型ディスプレイ電極の開発。
- ③ 筋電図の位置情報時間経過を調べるため一電極から信号分離を行う方法の開発。（単信号独立成分分析法の開発）
- ④ 臨床治験データ収集に必要な組織作り。
- ⑤ 臨床データを裏付ける動物実験。

B. 研究方法

(1) 本研究の組織構成

総勢 8 名からなる領域横断型混合チームを編成した。

- ① 医学部大学院生（2 名）  
東北大学大学院医学系研究科博士課程（佐藤尚明、松田尚美）
- ② 工学部大学院生（1 名）  
東北大学大学院工学研究科生体情報科学修士課程（幡谷）
- ③ 企業技術者（3 名）  
アトムメディカル株式会社研究所（大和田一成、須藤昭彦、千田あかね）
- ④ 大学研究者（2 名）  
木村芳孝、伊藤拓哉

(2) 教育目標

教育目標は、全体目標、個別目標に分けて設定した。

全体目標：異分野の相互理解と製品開発における協力関係の樹立。

個別目標：①医学系研究科博士課程学生：臨床データ収集と動物実験の基礎技術の取得。博士論文作成。②工学研究科修士課程学生：臨床データ収集と病院における臨床研究の一般的な心得の取得、技術開発の基礎、修士論文作成。

③ 企業研究者：大学における研究開発と会社組織との融和、新規技術法と最新知識の学習、スタディーデザインからビジネスデザインへの橋渡しと世界戦略。新規技術開発。

### (3) 研究方法

研究開発で3年間の全体の長期目標、1年ごとの全体短期目標を設定、評価ミーティングを2週間に1度行い、各自が成果と問題点、次回までの課題をプレゼンテーションし、構成員によるディスカッションを行う問題解決型開発法を行った。

## C. 研究結果

### (1) 研究成果

①高精度生体電位フィールド計測技術の確立

②シート型ディスプレイ電極の開発

微細な電位信号を、通常の電極で、高感度計測するとき、他のノイズ信号も増幅されてしまい周囲ハム雑音の多いフィールドでは難しい。

これに対し、絶縁物電極を用いる場合、ハム雑音は低減されるが、 $40\mu\text{V}$ 以下の電位計測は理論的に不可能である。

我々は、これを克服するために、新しく広域接地型高感度電極法を提案した。これは従来の電極法と絶縁物電極法の中間の特性を持つ電極法である。今期では、この方法に最適なディスプレイ電極を開発した(特許出願中)。

③単信号独立成分分析法の研究

今期は、木村の発見した参照系独立成分分析法の単信号独立成分分析法への応用をめざして研究を進めた。

従来の単信号独立成分分析法では、信号復元の際、スペクトル構造のみの評価関数では、位相のずれが生じてしまい(サロングート効果) 旨く原信号が復元できないことが明らかになった。

次年度は、参照系の効果を調べる予定である。

④ 臨床データの収集

東北大学大学病院周産期センターの1室を使い、臨床データを収集した。マタニティーヨーガの前後で、胎児心電図の計測が変わることを

発見した。これは、看護部との共同研究であり、助産師3年目研究として日本母性衛生学会で発表された。

### ⑤動物実験

胎児不全モデルを作成するために、母体がジャンクフードや葉酸欠乏食を摂取した場合における胎児への影響をマウス胎仔モデルで研究した。

葉酸欠乏食群のマウス胎仔では、メス胎仔が性差をもって有意に小さくなり、また、胎仔脳のヒストンのメチル化(エピジェネティクス)に関与する遺伝子Hdac7aが著明な低下を示した。この低下は、メスで著しかった。エピジェネティクスの異常は、生後の生活習慣病の発症の要因になる可能性があり、今後も研究を進めたい。(第61回日本産科婦人科学会優秀演題獲得)

### (2) 教育成果

博士号取得：医学系研究科佐藤尚明先生

## D. 考察

研究開発に関しては、いくつかの課題を生みながら、順調に進めることが出来た。しかし、医学系研究科の大学院生の多忙や、工学研究科の就職難での頻回の就職活動による時間調節の難しさがあり、融合領域の研究教育の難しさを感じた。また、研究拠点が得られているもののミーティングの場所の確保の不安定さ、他学部との交通の便の問題や、常識の違いなど様々な問題があった。しかし、企業研究研究者が、看護師や医師の忙しい実態をみて、機械開発に奮起していただけたことや、逆に、看護師が企業研究者の苦勞を理解できたことなどが、実は大きな成果であると思う。次年度は、研究会を組織し、他病院との連携を通じて横の融合を計っていきたい。

## E. 結論

実学的医工学の研究・教育拠点育成には、工学部学生、医学部学生、企業研究者が集い、自由にディスカッションできる安定した空間が必要で、お互いが顔見知りになり自由にディスカッションできることにより新しい研究や産業シーズが生まれる可能性が広がる事が期待された。今後、研究課題を超えた研究サロンの構築などが望ましいと思われた。

## F. 健康危険情報

特になし。

## G. 論文・学会発表

1) AH Kandoker, Y Kimura, T Ito, N Sato, K Okamura, M Palaniswami. Non-invasive evaluation of opening and closing timings of the

cardiac valves in the fetal cardiac cycle. *Computers in Cardiology* 2008;35:1061-1064. (査読有)、胎児心ドブラ信号に対し SVM と wavelet 解析を用い、胎児心電図の R から心弁の開閉時の時間間隔を自動的に計測した。僧帽弁開閉時刻と大動脈弁開閉時刻の相関は心不全などの異常時に増大する。

2) Netabayashi T, Kimura Y, Ito T, Ohwada K, Katayama N, Okamura K., Nakao M. "Robustness of the blind source separation with reference against uncertainties of the reference signals." *Conf Proc IEEE Eng Med Biol Soc.* 2008;2008:1875-8. (査読有) 参照系独立成分分析法のロバストネスに関する論文。

学会発表 (国内)

1) 高間木静香、小川菜津、後藤あき子、佐藤多代、木村芳孝、岡村州博、「マタニティーヨガの前後における胎児心電図変化」、第 49 回日本母性衛生学会、千葉県浦安市、平成 20 年 11 月 6 日、80%、概要：マタニティーヨガの前後で、心理検査で安静スコア上昇、胎児心電図 R 波の増強、雑音の軽減が見られた。

2) 松田尚美、伊藤拓哉、Clarissa Velayo、千坂泰、木村芳孝、Jafar Sharif、岡村州博、「母体葉酸欠乏が及ぼす胎盤発育および Igf-axis の発現制御のエピジェネティクス基盤解析」、第 16 回日本胎盤学会、浜松市、平成 20 年 11 月 14 日、20%、概要：妊娠中期からの母体葉酸欠乏では D17 日の胎盤のインプリンティング遺伝子 Igf 発現が低下していた。

学会発表 (国外)

1) Netabayashi, Tomoyuki, Kimura, Yoshitaka, Chida, Shinichi, Ito, Takuya, Ohwada, Kazunari, Katayama, Norihiro, Okamura, Kunihiro, Nakao, Mitsuyuki  
"Robustness of the blind source separation with reference against uncertainty of the reference signals", *IEEE EMBS'08 Canada Vancouver*, August 20-24. 概要：参照系独立成分分析法の信号認識において教師信号としての参照信号の曖昧さの許容範囲を検証した。80%

## H. 知的財産権の出願・登録状況

### 1. 特許出願

- ① 木村芳孝、伊藤拓哉、船本健一、早瀬敏幸「胎児心電図を用いたマウス胎仔脳性麻痺発症モデル」P20080449(申請中)
- ② 国際出願 PCT/JP2008/050756 S2008-0788-N0 「胎児心電図信号計測方法およびその装置」発明者：木村芳孝、中尾光之、伊藤拓哉、大和田一成、出願人：東北テ

クノアーチ、出願国；アメリカ、イギリス、ドイツ、中国（申請中）

2. 実用新案登録  
なし。
3. その他  
なし。

## 厚生労働科学研究費補助金（医療機器開発推進研究事業）

### 平成 20 年度 分担研究報告書

#### 分子生物学を基盤とした人工感覚器の研究開発と教育に関する研究

分担研究者 富田浩史 東北大学・国際高等研究教育機構・准教授

研究要旨： 現在、失明者の視覚を取り戻す方法は皆無である。中途失明者の数は年間 16000 人にも達し、失明に対する有効な治療法の開発は社会的急務である。我々は、緑藻類のチャネルロドプシン-2 (ChR2) 遺伝子を網膜へ導入することにより、光反応性を回復させることができることを既に報告している。しかし、ChR2 を利用した視覚再生法には正常な視覚に比べ光感受性が低いことや遺伝子導入に用いるウイルスベクターの安全性など解決すべき問題が残されている。本年度は、分子生物学的手法を用いてチャネルロドプシンの光感受性を増大させることを試みた。また、遺伝子導入後のリンパ球サブセットの変動を調べ、ChR2 導入後の免疫学的反応を調べた。その結果、光感受性を増大させることに成功し、また、免疫学的にも重篤な変化が認められないことを確認した。

#### A. 研究目的

網膜色素変性症は近年、遺伝子解析技術の進歩により、多くの原因遺伝子が同定されているにもかかわらず、その治療法はなく、経過観察が行われているのみである。加齢性黄斑変性症もまた高齢化社会の進行とともに急増傾向にあるが、有効な治療法は確立されていない。これらの疾患は失明原因の上位に位置し、厚生省特定疾患に指定されている。更に重篤な網膜はく離や増加の一途をたどる増殖糖尿病網膜症を加えると今後失明者が増加することは明らかである。これらの失明者のほとんど（緑内障を除く）は視

細胞の変性にその原因があり、神経節細胞をはじめ多くのニューロンは残存し、視神経が充分機能することは最近の研究で明らかにされている。そこで、失明に対する唯一の視機能再建方法として、光受容を工学的技術によって代用し、残存する網膜神経細胞を電氣的に刺激する「人工網膜」が世界的に研究されている。この方法は映像情報を人工網膜チップで捉え、電氣的な信号に変換し、残存する網膜神経細胞を刺激し、擬似的な光覚を得ようというものである。アメリカ、ドイツで臨床試験が始められているものの、様々な問題点が明らかになってきている。



我々が研究を行っている視覚再建方法は、光受容を機械によって代用するのではなく、「残存する神経細胞に光受容能を賦与する」という全く新しい方法で、この方法では残存する神経細胞に光受容能が賦与されるため、既存の神経ネットワークをそのまま利用することができる。現在までに、遺伝盲ラットの光反応性を回復させることに成功し、行動学実験から実際に見えていることを確認している。しかし、ChR2は正常な視覚に比べ、光感受性が低いこと、波長感受性が青色に限定される、などの問題点が明らかになっている。さらに、臨床応用を考慮した場合、ChR2が緑藻類由来の遺伝子であることから、免疫学的な副作用が懸念される。本研究では、これらの問題点を解決し、新しい視覚再生法を確立することを目的とする。

## B. 研究方法

本年度は、ChR2の光感受性を増大させる方法およびラットにChR2を含むアデノ随伴ウイルスベクターと投与し、遺伝子導入による副作用について検討した。

### <1.ChR2の光感受性の増大>

夜行性動物は、網膜下にタペタムと呼ばれる反射板を有し、暗闇での光感受性を増大させていることが知られている。このシステムを参考にし、ChR2遺伝子のC末領域に蛍光遺伝子を付加したアデノ随伴ウイルスベクターを作製した。付加した蛍光タンパク質は蛍光標識に一般的に用いられるCyanタンパク質である。Cyanの励起波長はChR2の感受波長より10-20 nm小さく、発する蛍光波長は、ChR2の感受波長域とほぼ重なる。このウ

イルスベクター(AAV-ChR2Cyan)を遺伝的に視細胞変性を来たすRoyal College of Surgeons (RCS)ラットの硝子体内に投与した。また、対側眼にはコントロールとして、蛍光タンパク質Venusを付加したChR2(AAV-ChR2V)を含むベクターを投与した。投与前、投与後に様々な光強度で刺激を行い、視覚誘発電位を測定した。視覚誘発電位測定後、眼球を摘出し、遺伝子導入効率を算出した。

### <2. 遺伝子導入による副作用>

ChR2を含むアデノ随伴ウイルスベクターをRCSラットの硝子体内に投与し、遺伝子導入を行った。投与前、投与後経時的に採血し、リンパ球をCD3, CD4, CD8, CD25抗体を用いて、標識し、その変動をフローサイトメーターを用いて調べた。投与後6ヶ月を経過した動物の一部は蛍光標識したコンカナバリンを還流した後、眼球を摘出し、網膜伸展標本を作製した。蛍光顕微鏡下で観察し、網膜の炎症の程度を評価した。

## C. 研究結果

### <1.ChR2の光感受性の増大>

AAV-ChR2V投与眼、AAV-ChR2Cyan投与眼ともに遺伝子導入後2週間から視覚誘発電位の回復が観察された。その振幅は投与後8週間で最大となった。AAV-ChR2V投与眼では、200lux以下の刺激光では、顕著に振幅が現弱したのに対し、AAV-ChR2Cyan投与眼では、刺激光の強度に依存して、直線的に振幅の減少が観察された(図1)。また、導入効率を調べたところ、両者とも約30%の神経節細胞に発現が認められ、導入効率に

有意な差は認められなかった (図 2)。

## <2. 遺伝子導入による副作用>

遺伝子導入後、1週間で白血球数の増加が見られたが、1ヶ月後には投与前のレベルに収束した (図 3)。また、Tリンパ球サブセットの解析を行った結果、投与後2ヶ月に、レギュラリーT細胞として、Tリンパ球の働きを調節し炎症等の過剰な免疫反応を防ぐ働きを持つことで知られる CD4+25+細胞の増加が認められたが、その後正常値に戻った。網膜伸展標本により網膜の血管壁への白血球の停留について調べたところ、陽性コントロールとしてリポポリサッカライドを腹腔内に投与したラット (ぶどう膜炎モデル) では、多くの白血球が血管内に停留していたが、遺伝子導入を行ったラットでは、それらの所見は観察されなかった (図 4)。

## D. 考察

### <1. ChR2 の光感受性の増大>

ChR2 を網膜神経節細胞に発現させた場合、200lux 以下の光刺激では明瞭な視覚誘発電位は記録されなかった。職場などでは、色温度によっても異なるが、600lux 以上の照度を確保することが望ましいと考えられている。しかし、通常の生活の場で 600lux 以上の照度が確保されていることは稀である。そのような観点から、ChR2 の光感受性を増大させることは、ヒトへの応用を考慮した場合、重要な課題である。今回、ChR2 と Cyan との融合タンパク質を用いることで、光感受性を増大させることができ、ChR2Cyan は生活の場の光強度でも応答するものと思われる。生来の ChR2 は青色のみに限

定されているが、他の色に感受性を持つ ChR2 が現在開発されてきている。今回示した光感受性増大の方法は、他の色に感受性を持つ ChR2 の光感受性を増大させるのにも有効であると考えられる。

## <2. 遺伝子導入による副作用>

- ①遺伝子導入後一過性に白血球数の増加、CD4+25+細胞の比率の上昇が認められたが、時間経過とともに、正常値まで回復した。
- ②1年6ヶ月間、安定して遺伝子の発現が観察されている。
- ③回復した視覚誘発電位の減弱は認められない。
- ④組織学的に副作用と考えられる所見はみとめられない。

以上のように、アデノ随伴ウイルスベクターを用いた ChR2 の遺伝子導入で重篤な副作用は観察されておらず、現在までのところ、安全な治療法であると考えられる。

## E. 結論

本年度の研究により、機能的問題点の1つが克服され、副作用面についても安全性が実証されつつある。今後は波長感受性の改善、そして、遺伝子治療で最も重篤な副作用と考えられる、遺伝子導入による挿入変異について調べていく必要がある。

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

- 1) Wang H., Sugiyama Y., Hikima T., Sugano E., Tomita H., Takahashi T., Ishizuka T., Yawo H. Molecular determinants differentiating photocurrent properties of two channelrhodopsins from *Chlamydomonas*.

J Biol Chem. 284(9), p. 5685–5696, 2009.

2) 富田浩史、菅野江里子、玉井信「チャンネルロドプシン」臨床眼科・増刊号、62 (11)、2008

3) 富田浩史、菅野江里子、砂金ひとみ、廣井照、太田絵美、玉井信、チャンネルロドプシン2遺伝子を用いた視機能再建の可能性、Proceedings of the 34th Sensory Substitution Symposium、p 21-24

## 2. 学会発表

1) Tomita H., Sugano E., Isago H., Hiroi T., Tamai M., Restore Vision Using Channelrhodopsin-2: Character of Recovered Visual Responses in Channelrhodopsin-2 Transferred Royal College of Surgeons rats. Asia-ARVO, Hyderabad, India. 1/18/2009

2) Sugano E., Tomita H., Isago H., Hiroi T., Tamai M., Restore Vision Using Channelrhodopsin-2: Dissemination of AAV Vector in Channelrhodopsin-2 transferred rat. Asia-ARVO, Hyderabad, India. 1/18/2009

3) Tomita H., Sugano E., Isago H., Narikawa S., Tamai M. Improvement of Light Sensitivity in the ChR2-Expressing Rat Retinas By Co-Expression of Fluorescent Protein. ARVO 5202/A228, Florida, USA, 5/1/2008

4) Sugano E., Tomita H., Isago H., Narikawa S., Tamai M. Immune Responses to Adeno Associated Virus Type2 Encoding Channelrhodopsin-2 in Genetically Blind Rat Model for Gene Therapy. ARVO 3008/A349, Florida, USA, 4/29/2008

5) Holmes TM., Kennelley K., Tomita H.,

Keegan DJ., A Comparison of the Murine RPET Cell Line With Human ARPE19 Cells for Use in Retinal Transplant Studies. ARVO 4276/A424, Florida, USA, 5/1/2008

6) 富田 浩史、菅野 江里子、砂金 ひとみ、宮崎 憲一、八尾 寛、玉井 信、蛍光タンパク質の付加による Channelrodopsin-2 光感受性の改善、第79回日本動物学会 1P134、2008年9月5日

7) 砂金 ひとみ、富田 浩史、菅野 江里子、玉井 信、チャンネルロドプシン-2 遺伝子を導入した老齢と若齢 RCS ラットの視覚誘発電位の違い、第79回日本動物学会 3D1415、2008年9月7日

8) 菅野 江里子、富田 浩史、砂金 ひとみ、玉井 信、Channelrodopsin-2 による遺伝盲ラットの視機能再建—免疫学的検討—、第79回日本動物学会 3D1430、2008年9月7日

9) 菅野 江里子、富田 浩史、砂金 ひとみ、廣井 照、玉井 信、Channelrodopsin-2による遺伝盲ラットの視機能再建—免疫学的検討—、日本臨床眼科学会「再生医学・生体材料研究会」2008年10月23日

## 招待講演

1) 網膜色素変性症・医療シンポジウム～治療法の確立を目指して 未来へ～、主催：網膜色素変性症協会、近畿6県、講演「緑藻類由来遺伝子を利用した視覚再生の可能性」2009年2月15日、大阪、中央公会堂 大ホール

2) 第34回感覚代行シンポジウム、主催：

産総研、特別講演「チャンネルロドプシン2  
遺伝子を用いた視機能再建の可能性」  
2008年12月1日、産業技術総合研究所  
臨海副都心センター

3) 学術講演会「神経バイオメディカル  
研究の最前線」、主催：サノフィ・アベン  
ティス(株)、講演「遺伝子導入による視覚  
再生研究 -緑藻類由来遺伝子を用いた  
神経細胞の活性化-」、2008年10月24日

4) 医療講演会、主催：日本網膜色素変  
性症協会(JRPS) 神奈川支部、講演  
「緑藻遺伝子を使った治療法への展望」  
2008年6月29日、かながわ県民センタ  
ー

5) 医療講演会、主催：日本網膜色素変  
性症協会(JRPS) 静岡支部、講演「緑  
藻遺伝子を使った治療法への展望」2008  
年6月8日、静岡県総合社会福祉会館

6) 日本再生医療学会「シンポジウム」  
主催：日本再生医療学会、講演「チャネ  
ルロドプシン-2の遺伝子導入による失明治  
療」2008年3月13日、名古屋

H. 知的財産権の出願・登録状況  
(予定を含む。)

1. 特許取得

発明の名称:網膜外層の障害を治療するた  
めの新規融合タンパク質、発明者:富田浩  
史、菅野江里子、特願2008-62402、平成  
20年3月12日

2. 実用新案登録

なし。

3.その他

なし。