

図 2. 全症例の $[^{18}\text{F}]\text{FACT}$  PET 画像 (投与後 10-30 分の SUVR 画像)



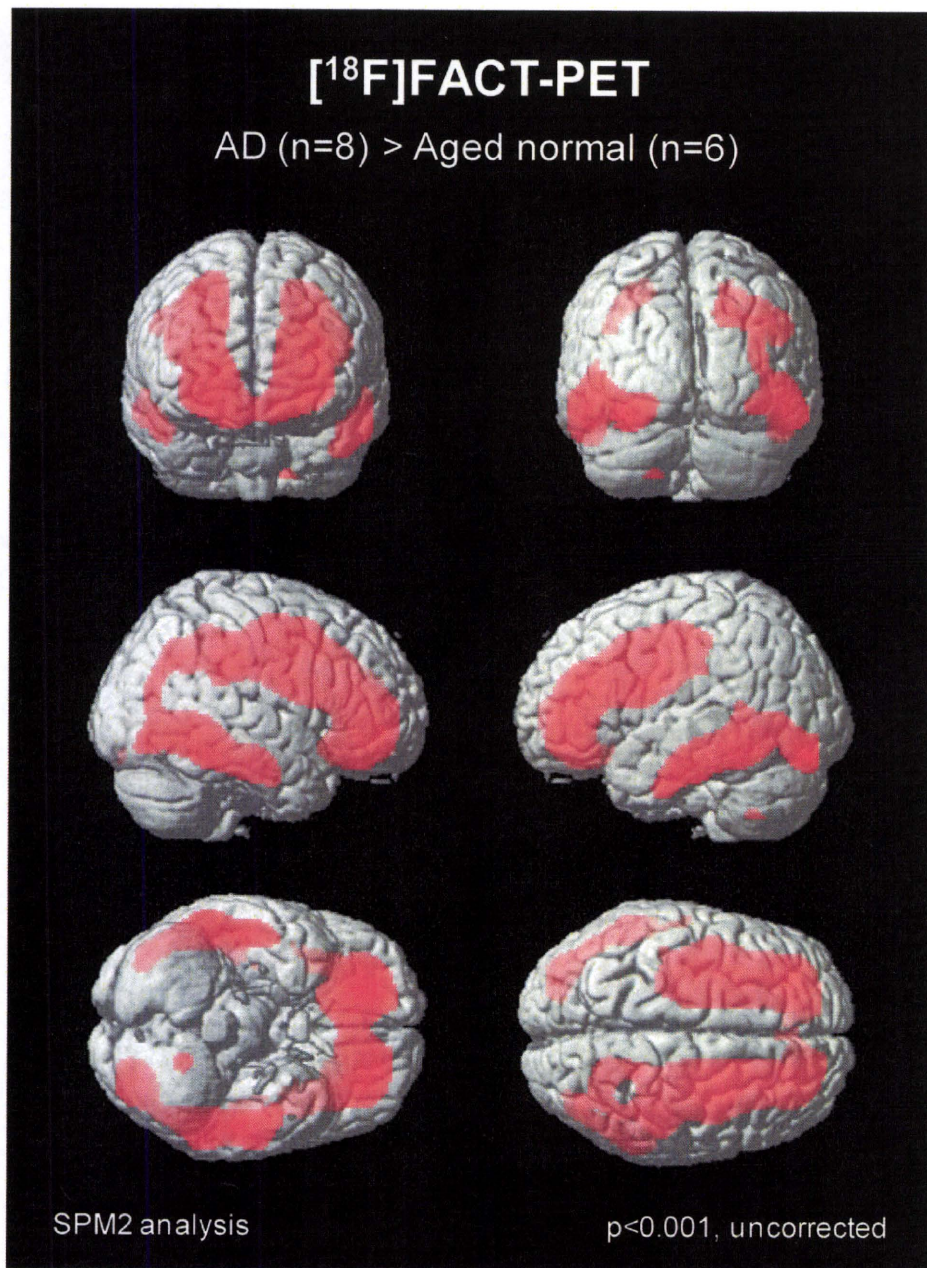


図 3. [<sup>18</sup>F]FACT PET 画像の SPM 解析  
AD 患者で有意な集積上昇を示した領域を赤色で示した (p<0.001, uncorrected)

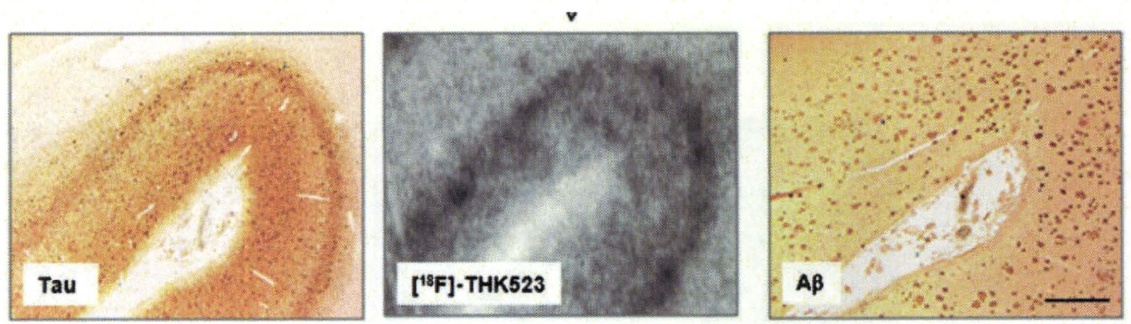


図 4.アルツハイマー病患者脳切片における $[^{18}\text{F}]\text{THK-523}$  のオートラジオグラフ像 (中央)、近接切片における抗タウ抗体染色像 (左)、および抗  $\text{A}\beta$  抗体免疫染色像 (右)



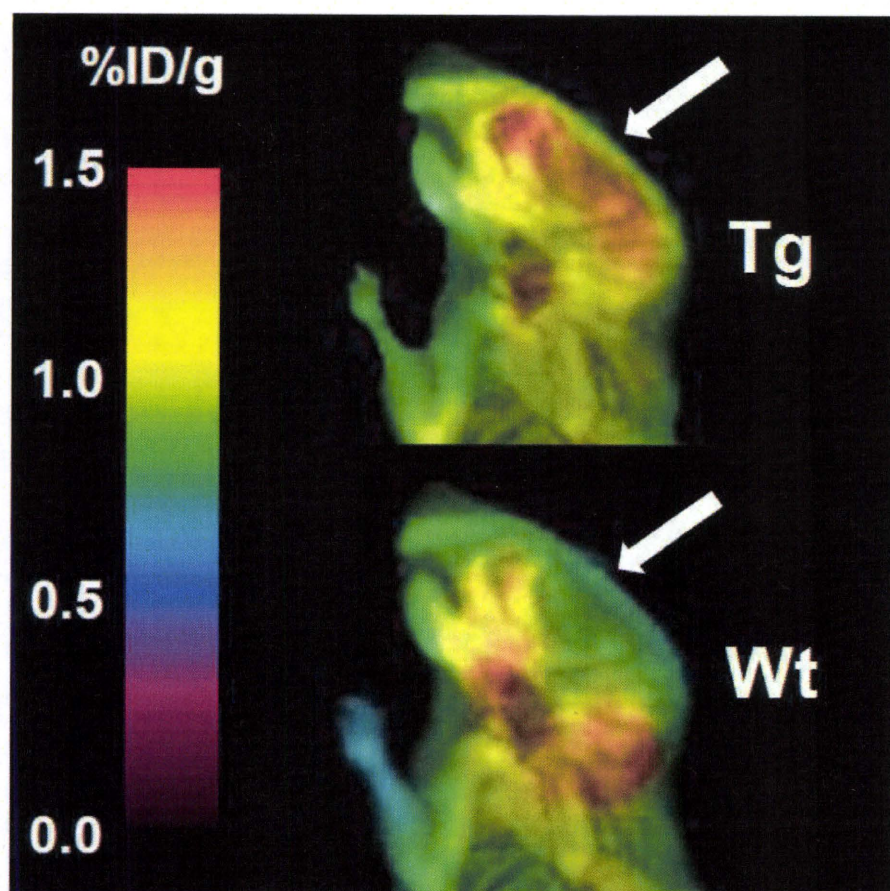


図 5. 脳内にタウが蓄積するタウ Tg マウス (上段) およびワイルドタイプマウス (下段) に $[^{18}\text{F}]\text{THK-523}$  を静脈内投与した際の小動物用 PET 画像  
矢印 : 脳

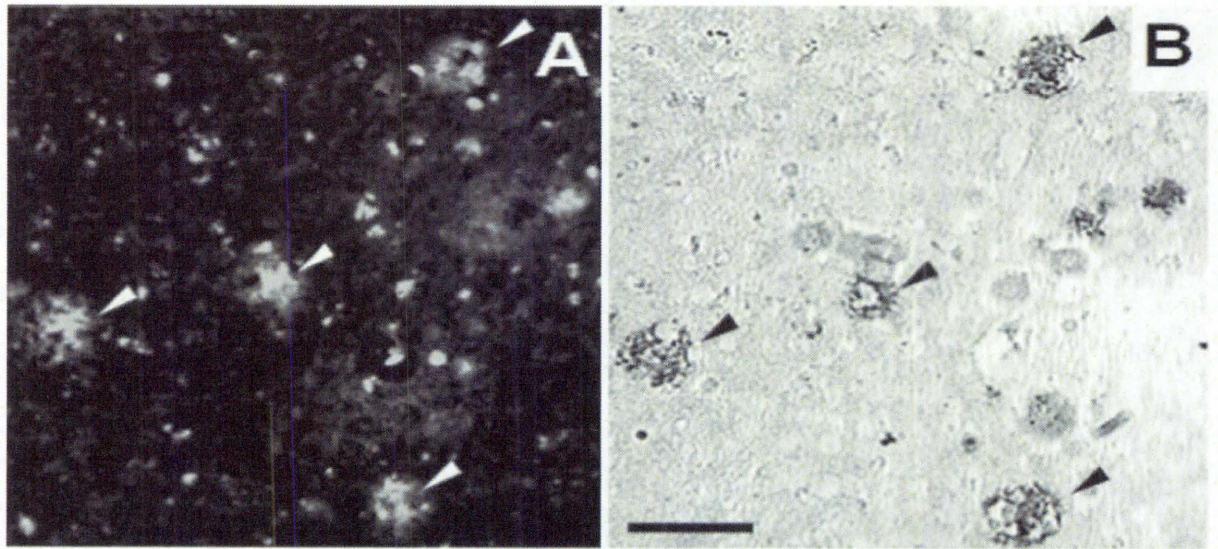


図6.アルツハイマー病患者脳切片におけるTHK-265の染色像 (A:左) と隣接切片における抗A $\beta$ 抗体免疫染色像 (B:右)  
アローヘッドはA $\beta$ を示す



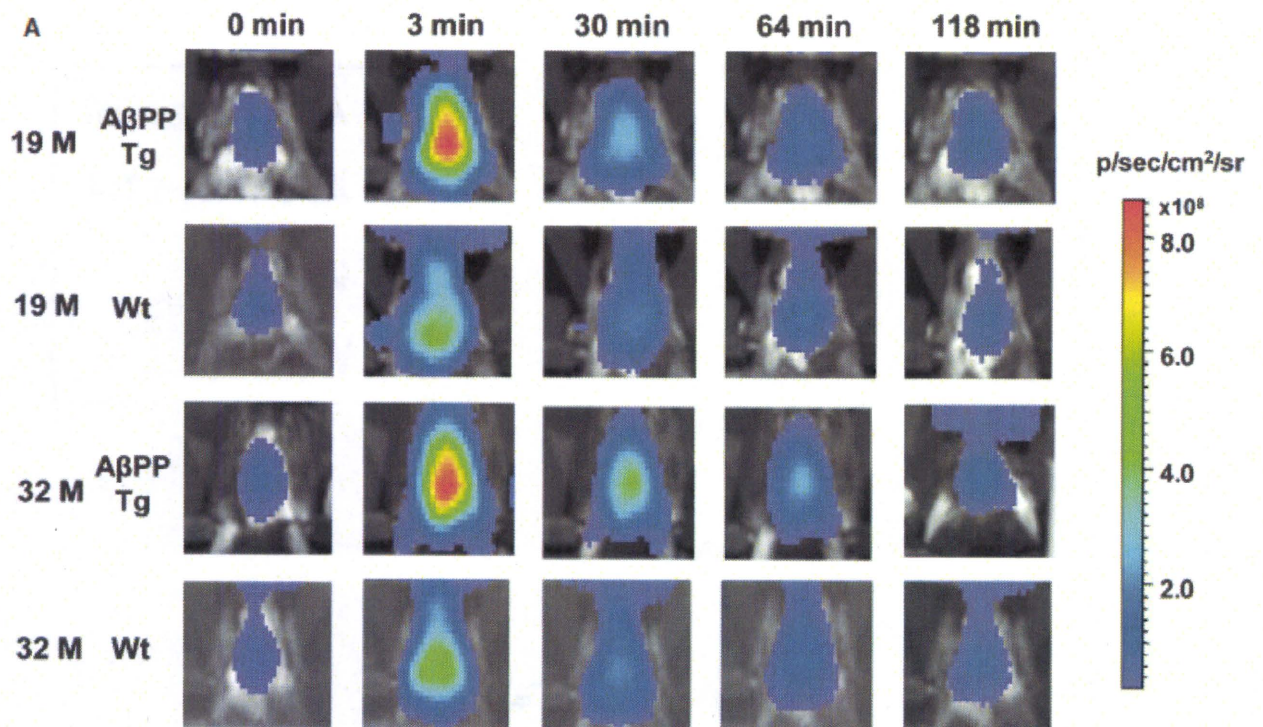


図7.脳内にA $\beta$ が蓄積するTgマウスにTHK-265を静脈内投与し、少動物用蛍光イメージング装置 (IVIS-100) でマウス頭部皮膚表面を撮影した画像。

このA $\beta$  PP Tgマウスでは月齢依存的にA $\beta$ の蓄積量が増加することが知られているが、THK-265の蛍光強度も月齢依存的であり、また投与3分後にはすでにワイルドタイプ (Wt) マウスとの間に明らかな蛍光強度に差がみられた。

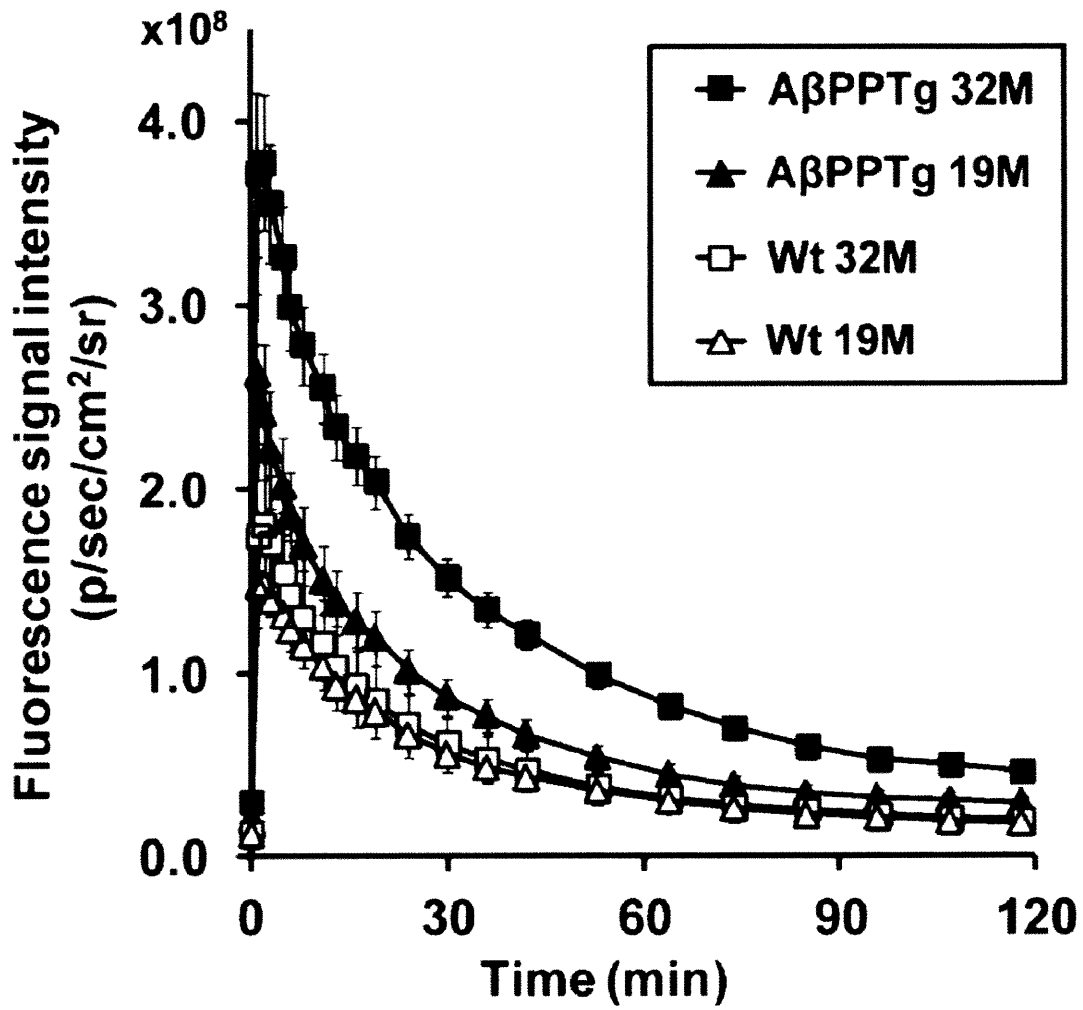


図8. 図7のタイムコース

説明文は図2参照 (脳内AβのTgマウスにおける月齢依存性、THK-265投与3分後にTgおよびWtマウス間ですでに明らかな差がみられることに注目)



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22年1月27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.86

未来医工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

© 2009年7月31日現在 平成22年度版国勢調査速報 人口動態調査(推定) Alzheimer Population Projection (2005-2020) 2019年

Familie Alzheimer  
Patientin "Frau Auguste D."

[http://www.markbreit.de/kultur\\_bildung/alzheimer\\_pic.htm](http://www.markbreit.de/kultur_bildung/alzheimer_pic.htm)

Normal Alzheimer

### ADの神経病理変化

老人斑 (Senile Plaque)      神経原線維変化 (Neurofibrillary Tangle)

アミロイドβ蛋白      主要構成成分      タウ蛋白

### 老人斑(AB)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 (AB)  
鍵穴: βシート構造

[<sup>11</sup>C]BF-227-PE (THK-002) 結合像 (アミロイドβイメージング)

Brain regions showing higher DVR values in AD patients than in normal subjects

お薦めの「アルツハイマー病に関する情報検索データベース」

<http://www.eldiglobe.jp/~cobalco21ue>

### [<sup>18</sup>F] 標識プローブ

[<sup>18</sup>F]BAY94-9172 (AV-1285)      [<sup>18</sup>F]AV-45

ペンシルベニア大      Kogyu 夫妻      Bayer Schering

[<sup>18</sup>F]PIB-218      ピッツバーグ大 Khank      General Electric

東北大 工藤研 [<sup>18</sup>F] FNCT  
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

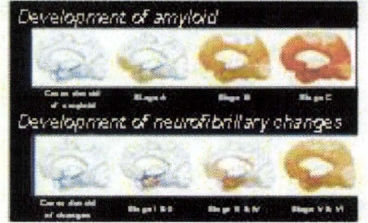
現在開発中

Alzheimer's disease - the most common form of dementia in older people. It is caused by the build-up of abnormal proteins in the brain, which leads to the death of brain cells and the loss of memory and other cognitive functions.



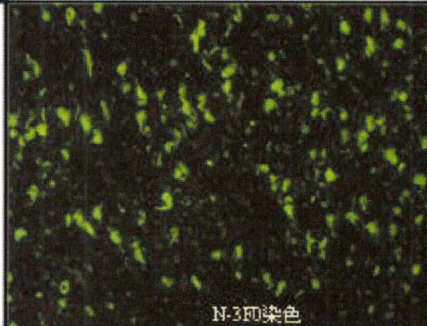
Dr. [Name] is a leading expert in the field of Alzheimer's disease. He has conducted extensive research on the underlying mechanisms of the disease and has developed innovative diagnostic and therapeutic approaches. His work has significantly advanced our understanding of this complex neurodegenerative disorder.

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

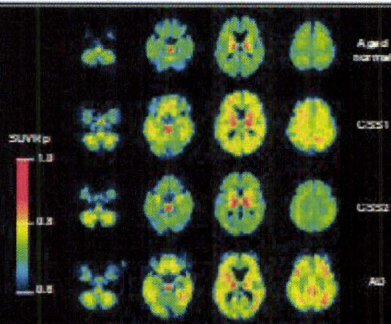
Aβ, アミロイドには閾値がない



N-3染色

タウイメージング用プローブ

- AD型、成熟型、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



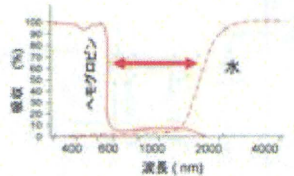
Baptist と Tauist

Baptist: アルツハイマー病の主たる病因はAβ  
 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



生体中の光吸収と分光学的窓の特性 - 177頁: 2009年10月15日発行, 株式会社: pp19-20, 株式会社: 2009年10月15日発行, 株式会社



東北大学 脳神経科学 近赤外蛍光診断装置





添付表1. 第3次修練スケジュール

### 老年科・薬剤部合同第3次臨床修練週間スケジュール

平成22年1月

担当教員： 老年科・浅田（内線 7182, PHS 5802）、薬剤部・島田（内線 7527）

	25日 月	26日 火	27日 水	28日 木	29日 金
8:30					新患プレゼ（外）
9:00	オリエンテーション および患者様紹介 浅田（西）	「加齢と老年医学」 荒井（加齢-カン）	新患診察 古川（外）	オリエンテーション 「チーム医療における 薬剤師の役割」 島田（薬）	療養病棟実習 アドバンスコース （ス） アドバイザー 小坂陽一
10:00	受け持ち患者回診 （西）				
		担当患者の回診 （西）		医薬品情報と処方設計 鈴木（薬）	
11:00					
12:00		昼食会 （加齢-カン）			
13:00	呼吸器病学 「気管支鏡実習」 大類（西）	病棟カンファランス （西）	アルツハイマー病の 発症前診断 工藤 （加齢-カン）	担当患者への処方、 処方箋設計、疑義照会 村井（西）	誤嚥性肺炎の診断実習 海老原孝枝（加齢-カン）
14:00					病棟症例報告会 大類（加齢-カン）
15:00			受け持ち患者回診 （西）	抗MRSA薬のTDMIに 基づく処方設計 松本（薬）	
16:00	症例レポート作成 （西）	医学文献検索実習 富田（医）	高齢者の政策医療 小坂（加齢-カン）		



# 厚生労働科学研究補助金（医療機器開発推進研究事業）

## 総合（分担）研究報告書

### 胎児心電図の研究開発と若手研究者の教育

研究分担者 木村芳孝 東北大学国際高等融合領域研究所・教授

研究要旨：平成 20 年度は医工学研究に必要な研究環境の整備と組織立ち上げを行い、開発プログラムを作成した。また、それぞれの開発目標をシーズごとの 5 テーマに分け、各シーズの年次目標を作成、開発に着手した（ハコ作り）。平成 21 年度では胎児心電図機器開発を通し得られたシーズ 5 つのシーズの開発を進め、橋渡し研究に移行可能なシーズのブラッシュアップを行った。また、この開発の中で、若手研究者に臨床研究に必要なマナーや協調的精神、特許事項、具体的な研究手法など研究のノウハウを教えヒト作りをおこなった。

平成 22 年度では胎児心電図機器開発を通し得られたシーズ 5 つのシーズの内、胎児心電図専用シート型ディスプレイ電極の開発および臨床データを裏付ける動物実験を進め創薬に結びつくシーズの開発に重点を置き行った。専用電極の最適化特性を決定し実用化の前段階まで開発を進めた。これにより、 $5\mu\text{V}$  の体表電位のフィールド計測が可能になった。これらのシーズ開発を通し若手育成の拠点として大学院医学研究科融合医工学分野を設立した。歴史に基づく魅力ある大学の中での近代的な社会構造を先導する新しい会社や企業のあり方を示せるような、仕組み作りを是非進めていきたい。

#### A. 研究目的

##### 1. 研究の背景

現在日本では、年間約 100 万人の分娩がある。日本の医療水準が上がりお産は安全なものと考えが一般的である。しかし、このうち 30 万人の胎児が何らかの異常を起こし、母体子宮内で具合が悪くなる状態（胎児機能不全）になり、そのうち 3000 人の赤ちゃんが重症化している。この重症化した赤ちゃんは、不幸にして亡くなったり、後に脳性まひや新生児腸管壊死などの大変重い障害を残したりすることになる。10 人の内 3 人に何らかのトラブルが起きていることになる。後遺症の内もっとも重い脳性まひの発症頻度は、50 年前と比べ改善しておらず、むしろ未熟児出産の増加にともない増加傾向にある。超音波の発達は産科の医療を大きく変えました。しかし、それにもかかわらず、お産の安全性は砂上の楼閣のように危うい。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。

しかし、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。

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。

##### 2. 本研究の目的

本分担研究の目的は臨床で使えるより実用的な胎児心電図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ことである。

初年度（20 年度）は、世界で初めて実時間計測の可能な胎児心電図装置を完成させ、また、本開発に必要な研究組織を作り上げた（ハコ作り）。具体的な研究組織は、①機械のアルゴリズムを担当する生体情報工学部門、②機械の製作にかかわる企業の研究部門、③ベッドサイドからの機械開発を支える臨床医学部門、④動物実験で安全性、有効性を調べる基礎研究部門から構成し、①は東北大学工学部生体情報工学中尾研究室の協力を、また、企業からは日本の周産期分野の最大の企業であるアトムメディカルの開発チームの協力を、③の臨床医学では東北大学周母子センターの全面協力を得て、基礎実験を併用し開発を進める体制を作った。

21 年度では、これらの組織に基づき、月 2 回の問題発見型開発ミーティングをすべての構成員で行い、ベッドサイド開発を通して開発に必要なヒト作りとその体制の充実を押し進めた。

22 年度では、昨年度に引き続き、これらの組

織に基づき、月2回の問題発見型開発ミーティングをすべての構成員で行い、①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（1信号独立成分分析法の開発）。②生体体表から5 $\mu$ 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）。③だれでも計測可能なシート型ディスプレイ電極の開発、および、臨床治験データ収集に必要な組織作り。④臨床データを裏付ける動物実験。という4シーズの開発を通じてベットサイド開発を通し開発に必要なヒト作りとその体制の充実を押し進めた。

## B. 研究方法

### （1）具体的な本研究の人員構成

平成20年度

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

平成21年度

- ① 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）
- ② 企業技術者（4名）アトムメディカル株式会社開発センター（大和田、須藤、千田、小田桐）
- ③ 医学部大学院生（1名）  
東北大学大学院医学系研究科博士課程（松田尚美）
- ④ 大学研究者（2名）  
国際高等融合領域研究所（木村、伊藤）

平成22年度

- ① 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（鍋島）
- ② 企業技術者（4名）アトムメディカル株式会社開発センター（大和田、須藤、千田、小田桐）
- ③ 大学研究者（2名）  
国際高等融合領域研究所（木村、伊藤）

### （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、発展。

個別目標：①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。

②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基礎研究。動物実験モデルの作成、病態解明法の開発、有効性、安全性の検証。

### （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度行う。ミーティングでは、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。開発で得られたアルゴリズムや電極をベットサイドで実際に計測に使用し機能を確認し問題を抽出。この成果と問題点を次回のミーティングに提出する問題解決型開発法を行った。

（倫理面への配慮）

本研究は臨床研究に関する倫理指針および動物実験に関する倫理指針に基づき、東北大学医学部倫理委員会の承諾を受け、研究対象者に対し人権保護、個人情報保護を配慮し、不利益・危険性を排除し十分な説明とインフォームド・コンセントを行い厳正に行われた。

具体的には計測に協力して頂く研究対象者の個人情報には全て匿名化したのちに取り扱う。さらに計測された情報をサーバーへ転送する際のサーバー間での情報流出を防止するために専用回線を用意し、多重機構で情報の流出を防止するようなシステムを設計する。

胎児心電図計測時に用いる電極は母体腹壁に貼り付けるだけの非侵襲的な電極である。そのため、元々母体への危険性は限りなくゼロであるが、さらに危険性を排除するように配慮した上で十分なインフォームド・コンセントを実施して行う。

本研究は組み替えDNA実験、遺伝子治療臨床研究、特定胚やヒトES細胞、ヒトゲノム・遺伝子解析研究、疫学研究を実施する企画ではなく、これらに該当する問題は生じない。

## C. 研究結果

### （1）研究成果

- ① 1信号独立成分分析法の開発



20年度: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 $\mu$ V以下の電位計測は理論的に不可能である。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)

21年度:1信号独立成分分析法の論理的意味を明らかにし、参照信号の関係を解明した。

22年度は、アクティブノイズキャンセリングやアクティブシグナルエンハンスメントの論理構造が1信号独立成分分析法の論理的構造で書く表されることを突き止めた。これにより、自己回帰法や能動制御解析が独立成分分析法の枠組みに組み込まれることが分かった。これは、1信号独立成分分析法が独立なスペクトルサポートをもつ成分を分離する事を論理的に明らかにすると同時に、スペクトル解析などの周波数解析が独立成分分析法の枠内で論じられる事を意味する。この内容は第24回生体・生理工学シンポジウムに発表した。

今後、論理をさらに進め信号解析技術の拡張と基底つき無限次元幾何学としての参照系独立成分分析法の意味を明らかにしていきたい。

## ② シート型ディスプレイ電極の開発

21年度は、昨年開発したゲル電極の形による違いを検討した。広い電極では、フィルタリング効果がみられ、2から3Hzの信号が小さくなることが分かった。

22年度:昨年度に引き続き電極の開発を進めた。電極の形や大きさを変えることにより電極がフィルタリング効果を示すことが分かった。胎児心電図での最適なゲル電極の大きさを決定した。

## ③ 動物実験

平成21年度では、昨年に引き続き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。新たに胎盤でも同様の変化を確認した。また、インプリンティング関連遺伝子のIGF2の低下が確認された。この成果は、昨年に引き続き2年連続して日本産科婦人科学会での優秀演題に選ばれた。(第62回日本産科婦人科学会優秀演題獲得)

平成22年度、引き続き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。

母獣低タンパク食飼育の胎仔は、低酸素下で脳出血しやすい事が判明した。低栄養では脳や心筋細胞に低酸素センサー遺伝子HIF1aの活性がみられ、低酸素被曝で酸化ストレスに陥りやすくなるためと考えられた。

(第63回日本産科婦人科学会にて発表)

## D. 考察

研究開発に関しては、いくつかの課題を解決し順調に進めることが出来た。しかし、病院内での安定した計測場所の確保の問題や、協力して頂ける医師や看護師の配置換えによる研究の中断など忙しい医療現場でのベットの開発のむずかしさを痛感した。また、開発が学生の卒業などにより断続的になりシーズを橋渡し研究につなげる困難さや、日本における橋渡し研究の限界など痛烈に認識させられた。橋渡し研究までに各シーズを持って行くには最低5年以上の長い期間の継続的な経済的サポートが必要であり、現実的に今の競争的資金による研究費の調達だけでは難しいことを痛感した。また、理論面に重心がある工学的な研究と実務的な医学研究の重点の違いで研究の進め方を合わせることが難しいこと、橋渡し研究が論文になりやすく、研究評価が低いことなど橋渡し研究に関する課題が明らかになった。現行の枠内でも継続的に開発を進めるためには、

①永続する研究機関の設立、②異分野の有機的情報交換の場の提供、③橋渡し研究の社会的認知を高めるためのさらなる広報社宣伝活動、④シーズを医療現場から抽出するために、基礎と臨床をつなぐベットのミーティングの実施、⑤行政による橋渡し研究の出口の魅力的なデザイン、⑥橋渡し支援機関の充実などが必要と考えられた。特に、研究に参加した学生からは、大学で治験を出すことの重要性や橋渡し研究そのものの意味に疑問が持たれた。企業とは違う大学の開発の利点が、企業側のリスクを減らす点と企業からの大学への献金を増やすこと、産学融合による人材の流動化、各学部の人材や知識の流動化、これを通じた革新的な新規産業の創出にあると言われてきた。しか

し、現状は、大学の企業化を押し進め、融合による新技術の創出だけでは、社会的な関心を引くものの、アカデミズムに代表される大学教育の国民による尊敬やそれに基づく誇りなどの大学が大学としてあるべき基本的な要素が欠落しやすく、学生の目標として企業へ就職するための大学の色彩をいっそう強めている気がした。本当の橋渡し研究の成果が見えにくい現

#### E. 結論

実学的医工学の研究・教育拠点育成には、橋渡し研究が正当に評価される基盤とベクトル研究を継続的に運営できるさらなる安定した仕組み作りが必要である。

#### F. 健康危険情報

特になし。

#### G. 論文・学会発表

##### (1) 論文

①Khandoker, A.H., Kimura, Y., Ito, T., Sato, N., Okamura, K., Palaniswami, M. "Non-invasive evaluation of opening and closing timings of the cardiac valves

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。

③Ahsan H. Khandoker, Yoshitaka Kimura, Takuya Ito, Naoaki Sato, Kunihiro Okamura and Marimuthu Palaniswami.

"Antepartum non-invasive evolution of opening and closing timings of the cardiac valves in fetal cardiac cycle" Med. Biol. Engg. & Comput, DOI 10.1007/s11517-009-0528-y. (査読有) 昨年度の論文の続き。胎児心奇形症例で胎児心ドプラ信号に対し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もの。

④HATAYA Toshiaki, KIMURA Yoshitaka, ITO Takuya, KARASHIMA Akihiro, KATAYAMA Norihiro, YAEHASHI Nobuo, NAKAO Mitsuyuki, A Simulation Study of Single-BSS with References Single-ICA can be very useful method to extract independent components from signal observed by single channel. IEICE tech-

状があり、また、治験に関する審査機関への対応が1研究者では難しい現状では、若手の目標が立てづらく、魅力的なキャリアパスが作られる様な安定感のある教育制度の構築が望まれる。歴史に基づく魅力ある大学の中での近代的な社会構造を先導する新しい会社や企業のあり方を示せるような、仕組み作りを是非、進めていきたい。

in the fetal cardiac cycle". Computers in Cardiology 2008;35:1061-1064. (査読有)、胎児心ドプラ信号に対し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。

②AH Khandoker, Y Kimura, T Ito, N Sato, K Okamura, M Palaniswami, Nakao M. "Robustness of the blind source separation with reference against uncertainties of

nical report. ME and bio cybernetics 109(279), 37-40, 2009-11-05

(査読有)筋電図除去の原理に関する内容。

⑤Clarissa Velayo, Takuya Ito, Hiroshi Chisaka, Nobuo Yaegashi, Kunihiro Okamura, Yoshitaka Kimura. "Effects of antenatal steroid therapy on neurodevelopment in an IUGR mouse model", Fetal Diagn Ther. 2010;28(2):76-86. (査読有) 母獣低栄養飼育の胎仔の薬剤感受性の変化を調べた。

⑥松田尚美、医学博士論文「母体葉酸欠乏が胎仔胎盤発育に及ぼす影響とそのエピジェネティック制御機構解析」

⑦幡谷速昭、工学修士論文「1計測信号参照系独立成分分析法のシミュレーション研究」

##### 学会発表 (国内)

###### 1) 口頭発表

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ックス基盤解析」、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。

③木村芳孝、「胎児心電図の開発の現状と今後」、胎児心電図研究会プレミーティング、京都国際会議場、2009年4月2日  
(発表の概要)

胎児心電図開発の現状と今後の発展に関して報告した。

④松田尚美、伊藤拓哉、千坂泰、木村芳孝、八重樫伸生、岡村州博、「母体葉酸欠乏が及ぼす胎仔胎盤発育における影響とそのエピジェネティックス制御機構解析」、第61回日本産科婦人科学、京都国際会館、4月5日(高得点演題)

⑤木村芳孝、幡谷速昭、伊藤拓哉、千坂泰、八重樫伸生、中尾光之、「1信号からの独立成分抽出の問題点」、第24回生体・生理工学シンポジウム、仙台、東北大学工学部キャンパス、9月26日

## 2) 学会発表(国際学会)

①Netabayashi, 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.

②CLARISSA VELAYO, TAKUYA ITO, HIROSHI CHISAKA, NOBUO YAEGASHI, KUNIHIRO OKAMURA, YOSHITAKA KIMURA "Increased Susceptibility of Injury Prone Neuroglial Cells Due to Antenatal Steroid Treatment: A Case of Double Jeopardy" Society for Gynecologic Investigation (SGI) 3<sup>rd</sup> SGI International summit 2009, Japan, Sendai, 11月13日(12-Nov)

③A. Aoyagi, Y. Kimura, T. Ito, C. Chisaka, K. Tanabe, K. Funamoto, K. Okamura, N. Yaegashi. "Case reports of fetal bradycardia diagnosed by fetal electrocardiogram via maternal abdomen", The 15th World Congress on Heart

Disease 2010, Vancouver, Canada, July 26<sup>th</sup>,

## 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)

③木村芳孝、八重樫伸生、中尾光之、伊藤拓哉、「信号抽出装置」、P20090088、出願日 2009年9月18日、出願番号等 特願 2009-216716

### 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（医療器機開発推進研究事業）

## 総合（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

研究分担者 富田 浩史 国際高等研究教育機構 准教授

### 研究要旨

一旦失明に至ると、その視機能を再建する方法はない。我々は失明者の視機能を再建することを目的とし、機器により光受容を代用する人工網膜、遺伝子導入により網膜細胞に光受容能を賦与する遺伝子治療の2つの方法を検討してきた。人工網膜研究では、三次元積層化技術を用いた1チップ型の人工網膜を開発し、その機能評価を行った。三次元積層化技術を用いることによって、網膜刺激電極、処理回路、映像受光素子を層状に配置することが可能で、これによって、多くの刺激電極を配置可能となる。網膜上に電気刺激することで視視野から誘発電位が記録され、視覚情報を伝達できることが示された。遺伝子治療では、緑藻類クラミドモナス由来の遺伝子を導入する視覚再生法を検討した。網膜で恒常的に緑藻類由来タンパク質を発現させることによる副作用評価を行い、また、この方法によって回復される視覚の特性を行動学的に調べた。遺伝子導入後2年間の観察期間を通して、回復した視機能は維持され、重篤な副作用は認められなかった。

### A. 研究目的

網膜色素変性症の遺伝子異常保因者は日本人4000～8000人に一人、人口で4～5万人はいると推定されている。網膜色素変性症と同様に視細胞変性により失明を来す疾患である加齢黄斑変性症は、アメリカでは中途失明原因の1位に位置し、日本でも高齢化社会の進行に伴い、増加の一途を辿っている。これらの疾患に対して、薬剤や遺伝子治療によって、変性を遅延させる方法が研究されているが、現時点で、有効な治療法は確立されていない。一旦失明に至ると、その視機能を再建する方法はなく、治療法の開発が待ち望まれている。

視機能を再建する方法として、世界的に機器によって光受容を代用する人工網膜が研究されている。すでに、アメリカ、ドイツでは臨床研究が行われ、形やものの動きを判別できることが示され、人工網膜の有用性が示されている。一方、眼内に多数の電極を配置できないなどの理由により、高い解像度が期待できないことも明らかになりつつある。

東北大学工学部の独自の技術である三次元積層化技術を利用することによって、1000個以上の刺激電極を配置可能である。また、各回路層を垂直配線により配線し、1チップ化できるなどの利点がある。他のグループの人工網膜では、眼内に刺激電極、眼外に処理回路、メガネに受光部と別々に配置する必要があるが、三次元積層化技術の利用により、厚さ100 $\mu$ m以下に受光

素子層、処理回路層、刺激電極層を作ることができる。本研究では、視覚再建法の1つとして、この特徴的な人工網膜チップの機能評価を、ウサギを用いて行った。

また、これらの工学的技術を用いた視覚再生法に加えて、遺伝子導入による視覚再生法を検討した。緑藻類クラミドモナスより見出された、「チャネルロドプシン-2 (ChR2)」は、光受容に伴い、陽イオンを細胞内に取り入れる光受容陽イオンチャネルとして機能する。網膜色素変性症では、主に網膜の光受容細胞が障害され、他の神経細胞は残存していることが知られている。我々は残存する網膜細胞にChR2遺伝子を導入し、残存する細胞に光受容能を与えることによって、視機能を回復させることにすでに成功している。本研究では、ChR2を用いた遺伝子治療の安全性評価および回復される視機能の評価を行った。

### B. 研究方法

#### 人工網膜

白色家兎の耳静脈よりヨーン酸ナトリウム(10mg/kg)を静注し、視細胞を選択的に変性させ、網膜色素変性症と類似の網膜変性モデルを作製した。視細胞変性誘導後、網膜電図(ERG)、視覚誘発電位(VEP)を記録し、視細胞の変性を電気生理学的手法を用いて確認した。視細胞変性後、硝子体手術を行い、レチナルタックを用いて、網膜上に人工網膜チップを固定した。また、



インプラントによる網膜組織の変化を調べる目的で、ダミーチップ（電源ケーブルを持たないチップ）をインプラントし、インプラント後の網膜の変化を調べた。

### **ChR2 遺伝子治療**

緑藻類由来タンパク質が恒常的に眼内で発現することによって引き起こされる副作用を調べる目的で、遺伝盲ラットに ChR2 遺伝子を含むアデノ随伴ウイルスベクター(AAV-ChR2V)投与し、継時的に採血を行い、種々のリンパ球サブセットマーカータンパク質の抗体を用いて染色を行った。各リンパ球サブセットの変動を約 2 年間観察した。また、機能評価として、定期的に視覚誘発電位を記録し、遺伝子導入によって回復した視機能が維持されるかどうかを調べた。また、ChR2 の網膜での発現が正常な視機能に及ぼす影響および ChR2 によって得られる視覚特性を調べる目的で、生まれながらに、網膜神経節細胞に ChR2 を持つトランスジェニック (ChR2V-TG) ラットを作製した。ChR2V-TG ラットの視覚特性（空間周波数特性、コントラスト感度）をデジタルオプトモーターを用いて行動学的に調べた。さらに、ChR2V-TG ラットの視細胞のみを選択的に変性させ、視細胞変性後の視覚特性を調べた。

## **C. 研究結果**

### **人工網膜**

ヨートン酸ナトリウム静注後、ERG、VEP の振幅は顕著に減少し、視細胞の変性が引き起こされたものと予想された。人工網膜チップをインプラント後、光刺激により誘発電位が記録された。しかし、インプラント前の駆動試験で得られた、設定値（抵抗、電流値、パルス幅）とは異なる条件で、記録することが可能であった。ダミーチップをインプラントした直後の眼底写真で、人工網膜固定部位で網膜が圧迫されている像が観察された。また、2 ヶ月後では、固定部位に加えて、人工網膜チップ電極のエッジ部に同様に圧迫像が観察された。6 ヶ月後、眼球を摘出し、組織標本を作製し、接地部位を観察したところ、人工網膜チップ電極が接地していた部位でわずかに網膜層の非薄化が見られた。また、エッジ部位と思われる箇所でも網膜の障害が観察された。

### **ChR2 遺伝子治療**

遺伝子導入 2 週間後に視覚誘発電位の回復が

わずかに観察され、導入から 2 ヶ月後に最大となった。回復した視覚誘発電位は、2 年間減弱することなく維持された。また、遺伝子導入後の各リンパ球サブセットの変動を調べたところ、遺伝子導入 7 日後、一過性に CD4/CD25 および CD4/CD8 陽性細胞の増加が観察されたが、2 週間後に正常レベルに回復した。この一過性の上昇は、Venus 遺伝子を含む AAV ベクター投与群でも観察された。

正常な視細胞を持つ ChR2V-TG ラットの視覚特性は ChR2 を持たない野生型ラットと同等の空間周波数特性、コントラスト感度を示した。一方、視細胞を変性させた ChR2-TG ラットでは、空間周波数特性は野生型と同等であったのに対し、コントラスト感度は顕著に上昇した。

## **D. 考察**

### **人工網膜**

インプラント前の駆動試験で得られた、設定値（抵抗、電流値、パルス幅）とは異なる条件で、記録することが可能であったことから、インプラント後にその固体に応じた設定値を改めて設定する必要があることが明らかとなった。この差は、網膜との接地間隔、場所などの違いから起こると考えられる。インプラントにより、網膜組織に軽微な障害が引き起こされることが明らかとなった。人工網膜チップ電極接地面のエッジ部位が網膜に障害を引き起こさないように、何らかの工夫が必要と思われた。

### **ChR2 遺伝子治療**

ラットを用いた安全性評価で、ChR2 遺伝子発現の長期的な安全性が確認された。遺伝子導入後の CD4/CD25 および CD4/CD8 陽性細胞の増加は、コントロールベクター (AAV-Venus) 投与群でも観察され、Venus タンパク質あるいは AAV ベクターそのものによって引き起こされたと考えられた。

神経節細胞には種々の役割の異なる神経節細胞が存在し、それらの神経節細胞に一樣に ChR2 が導入された時にどのような視覚が得られるか不明であった。今回のトランスジェニックラットを用いた研究から、神経節細胞の種類に関係なく、ChR2 が導入されたとしても高度な視覚が得られる可能性が示された。

## E. 結論

### 人工網膜

今回、三次元積層化人工網膜が、生体内で実際に駆動することが確認された。今後は長期的なインプラントを想定し、人工網膜の形状が引き起こす、物理的障害について検討する必要がある。

### 遺伝子治療

ChR2を網膜神経節細胞に導入することによって、青色に限定すると、正常と同等の視覚特性が得られることが明らかになり、また、ラットを用いた安全性研究で、何ら重篤な副作用は観察されず、「ChR2を用いた視覚再生のための遺伝子治療」は高度な視機能を作ることができる「視機能再建法」の1つになりえると考えられた。

## F. 健康危険情報

なし。

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

1. Wang Z, Sugano E, Isago H, Hiroi T, Tamai M, Tomita H. Differentiation of neuronal cells from NIH/3T3 fibroblasts under defined conditions. *Development Growth and Differentiation*, 53(3), 357-365, 2011.
2. Sugano E, Isago H, Wang Z, Murayama N, Tamai M, Tomita H. Immune responses to adenovirus-associated virus type 2 encoding channelrhodopsin-2 in a genetically blind rat model for gene therapy. *Gene Therapy*, 18(3), 266-74, 2010.
3. Semo M, Gias C, Ahmado A, Sugano E, Allen A, Lawrence JM, Tomita H, Coffey PJ, Vugler A. Dissecting a Role for Melanopsin in Behavioural Light Aversion Reveals a Response Independent. *PLoS ONE*, 5(11), E15009, 2010.
4. Tomita H, Sugano E, Isago H, Hiroi T, Wang Z, Ohta E, Tamai M. Channelrhodopsin-2 Gene Transduced into Retinal Ganglion Cells Restores Functional Vision in Genetically Blind Rats. *Exp Eye Res*, 90, 426-436, 2010.
5. Tomita H, Sugano E, Isago H, Tamai M. Channelrhodopsins provide a breakthrough insight into strategies for curing blindness. *J Genetics*, 88, 409-415. 2009.

7. Wang H., Sugiyama Y., Hikima T., Sugano E., Tomita H., Takahashi T., Ishizuka T., Yawo H. Molecular determinants differentiating photo-current properties of two channelrhodopsins from *Chlamydomonas*. *J Biol Chem*. 284(9), p. 5685-5696, 2009.

8. 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), 336-341, 2008

9. 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*, 21-24, 2008

2. 学会発表  
(海外)

1. Tomita H, Sugano E, Isago H, Hiroi T, Wang Z, Tamai M. Visual Responses of Royal College of Surgeons Rats Transferred Modified Volvox Channelrhodopsin-2 Gene. Annual meeting Association for Research in Vision and Ophthalmology, Ft. Lauderdale, FL. 2010.

2. Tomita H. Channelrhodopsins provide a breakthrough insight into strategies for curing blindness. Tohoku University-Hanyang University Joint Symposium on "Biomedical Engineering in Future Medicine. Souel, Korea, 2010

3. Sugano E, Tomita H, Isago H, Hiroi T, Wang Z, Tamai M. Systematic and Local Responses of Channelrhodopsin-2 Gene Therapy. Annual meeting Association for Research in Vision and Ophthalmology, Ft. Lauderdale, FL. 2010.

4. Tomita H, Sugano E, Isago H, Hiroi T, Wang Z, Tamai M. Retinal and systemic immune responses after the transfer of channelrhodopsin-2 into RCS rats. XIVth International Symposium on Retinal Degeneration. Quebec, Mont-Tremblant

5. Sugano E, Tomita H, Isago H, Hiroi T, Wang Z, Tamai M. Optimization of volvox-derived channelrhodopsin-1 to express expression in mammalian cells. XIVth International Symposium on Retinal Degeneration. Quebec, Mont-Tremblant

6. 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- Annual meeting Association for Research in Vision and Ophthalmology, Hyderabad, India. 1/18/2009

7. 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- Annual meeting Association for Research in Vision and Ophthalmology, Hyderabad, India. 1/18/2009

8. 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. Annual meeting Association for Research in Vision and Ophthalmology, Ft. Lauderdale, FL. 2008

9. 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. Annual meeting Association for Research in Vision and Ophthalmology, Ft. Lauderdale, FL. 2008

10. 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. Annual meeting Association for Research in Vision and Ophthalmology, Ft. Lauderdale, FL. 2008

(国内)

1. 砂金ひとみ、菅野江里子、廣井照、王卓、玉井信、富田浩史、ボルボックス由来チャンネルロドプシン 2 を導入した遺伝盲ラットの光反応性、日本動物学会、東京、2010.

2. 王卓、菅野江里子、砂金ひとみ、廣井照、玉井信、富田浩史、NIH 3T3 線維芽細胞からの神経細胞の誘導、日本動物学会、東京、2010.

3. 菅野江里子、富田浩史、姫志剛、松坂義哉、虫明元、砂金ひとみ、廣井照、玉井信：「カニクイサルを用いた視機能評価」第 63 回日本臨床眼科学会（福岡）2009

4. 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 7 9 回日本動物学会 1P134、2008 年 9 月 5 日

5. 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 7 9 回日本動物学会 3D1415、2008 年 9 月 7 日

6. 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 7 9 回日本動物学会 3D1430、2008 年 9 月 7 日

7. 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. 富田浩史：「視機能再建のための遺伝子治療、チャンネルロドプシンによって得られる視覚特性」日本網膜色素変性症協会（JRPS）群馬県支部総会・医療講演会（群馬）2010

2. 富田浩史：「緑藻由来遺伝子を利用した視覚再生研究」日本網膜色素変性症協会（JRPS）栃木県支部総会・医療講演会（栃木）2010

3. 富田浩史：「視機能再建のための遺伝子治療、チャンネルロドプシンによって得られる視覚特性」日本網膜色素変性症協会（JRPS）宮城県支部総会・医療講演会（仙台）2009

4. 富田浩史：「緑藻由来遺伝子を利用した視覚再生研究」日本網膜色素変性症協会（JRPS）新潟県支部総会・医療講演会（新潟）2009

5. 富田浩史：「緑藻遺伝子を使った治療法への展望」日本網膜色素変性症協会（JRPS）神奈川支部・医療講演会（神奈川）2008

6. 富田浩史：「緑藻類由来遺伝子を利用した視覚再生の可能性」日本網膜色素変性症協会・近畿 6 県網膜色素変性症・医療シンポジウム～治療法の確立を目指して 未来へ～（大阪）2008

7. 富田浩史：「緑藻遺伝子を使った治療法への展望」日本網膜色素変性症協会（JRPS）静岡支部・医療講演会（静岡）2008

(招待)

1. 富田浩史、菅野江里子、砂金ひとみ、王卓、村山なみえ、玉井信。「遺伝子導入による視覚再建」日本視覚学会、東京、2011.

2. 富田浩史、菅野江里子、砂金ひとみ、王卓、村山なみえ、玉井信。「緑藻類由来遺伝子を用いた視覚再生技術」日本人工臓器学会、仙台、2010

3. 富田浩史、菅野江里子、砂金ひとみ、王卓、村山なみえ、玉井信。「緑藻類由来遺伝子を

用いた視覚再生技術」集積光デバイスと応用技術(IPDA)第4回研究会 (IEEE 分科会),仙台, 2010

4. 富田浩史:「チャンネルロドプシンの遺伝子導入によって得られる視覚」第63回臨床眼科学会専門別研究会 特別講演(福岡) 2009

5. 富田浩史:「チャンネルロドプシン-2による視覚再建」視覚科学技術コンソーシアム (VSAT) 特別講演(仙台) 2009

6. 富田浩史:「緑藻類由来遺伝子の導入による視覚再生の現状と課題」日本眼科学会総会 シンポジウム 13 (東京) 2009

7. 富田浩史:「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」第34回感覚代行シンポジウム、特別講演(東京) 2008

8. 富田浩史:「神経バイオメディカル研究の最前線」「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-」学術講演会、主催:サノフィ・アベンティス(株)、講演(仙台) 2008

9. 富田浩史:「チャンネルロドプシン-2の遺伝子導入による失明治療」日本再生医療学会「シンポジウム」(名古屋) 2008

#### 4. その他

1. 朝日新聞(全国) 2010年11月23日 「脳を動かす光のスイッチ」記事内で紹介「視力回復に成功」

2. 雑誌 Medical Bio、2010年9月号、オーム社、pp.55-57、緑藻の光受容体遺伝子の導入による網膜色素変性ラットの視力回復

3. 一般向け科学雑誌「NEWTON」2010年2月号(12月26日発売)「藻のタンパク質が眼で働く!？」

4. NHK ラジオ第2放送 2010年2月8日【国内向け英語放送】番組名:「Japan & World Update」14:00~14:30(後半10分間)

【海外向け短波ラジオ放送】英、仏、中国、アラビアなど17言語で放送

5. 子供の科学 2010年3月号 「藻類の遺伝子で視力回復」

6. 河北新報朝刊(2009年11月6日一面)「緑藻遺伝子で視力再生」

#### H. 知的財産権の出願・登録状況(予定を含む。)(特許出願)

1. PCT/JP2010/063786、「発現効率が改善された光受容チャンネルロドプシン」、発明者:富田浩史、菅野江里子、出願日:H22年7月10日

2. 特願 2009-185455、「発現効率が改善された光受容チャンネルロドプシン」、発明者:富田浩史、菅野江里子、出願日:H21年8月10日

3. 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。