

- 1,4-dioxane in male rats Inhalation Toxicology 2009; 21: 889-897.
- 4) Miyagawa S, Yamamoto A, Matsunami K, Wang D, Takama Y, Ueno T, Okabe M, Nagashima H, Fukuzawa M. Complement regulation in the GalT KO era. Xenotransplantation 2009; 17: 11-25.
- 5) Miyagawa S, Takeishi S, Yamamoto A, Ikeda K, Matsunari H, Yamada M, Okabe M, Miyoshi E, Fukuzawa M, Nagashima H. Survey of glycoantigens in cells from alpha1-3galactosyltransferase knockout pig using a lectin microarray. Xenotransplantation 2010; 17: 61-70.
- 6) Ogawa B, Ueno S, Nakayama N, Matsunari H, Nakano K, Fujiwara T, Ikezawa Y, Nagashima H. Developmental ability of porcine in vitro matured oocytes at the meiosis II stage after vitrification. J. Reprod. Dev. 2010; 56: 356-361.
- 7) 落合恵子、池田有希、香川則子、桑山正成、長嶋比呂志. 老化促進モデルマウス SAMP1 亜系統の生理・病理学的特徴の解析. 明治大学農学部研究報告 2010 ; 59 : 103-107
- 8) Watanabe M, Kurome M, Matsunari H, Nakano K, Umeyama K, Shiota A, Nakauchi H, Nagashima H: The creation of transgenic pigs expressing human proteins using BAC-derived, full-length genes and intracytoplasmic sperm injection-mediated gene transfer. Transgenic Research 2011, DOI 10.1007/s11248-011-9561-3.
- 9) Umeyama K, Saito H, Kurome M, Matsunari H, Watanabe M, Nakauchi H, Nagashima H: Characterization of the ICSI-mediated gene transfer method in the production of transgenic pigs. Molecular Reproduction and Development 2011, 79:218-228.
- 10) Klymiuk N, Mundhenk L, Kraehe K, Wuensch A, Plog S, Emrich D, Langenmayer MC, Stehr M, Holzinger A, Kroner C, Richter A, Kessler B, Kurome M, Eddicks M, Nagashima H, Heinritz K, Gruber AD, Wolf E: Sequential targeting of CFTR by BAC vectors generates a novel pig model of cystic fibrosis. Journal of Molecular Medicine 2011. DOI10.1007/s00109-011-0839-y.
- 11) Klymiuk N, Böcker W, Schönitzer V, Bähr A, Radic T, Fröhlich T, Wunsch A, Keßler B, Kurome M, Schilling E, Herbach N, Wanke R, Nagashima H, Mutschler W, Arnold GJ, Schwinzer R, Schieker M, Wolf E: First inducible transgene expression in porcine large animal models. The FASEB Journal 2011, 26:1086-1099.
- 12) Kemter E, Lieke T, Kessler B, Kurome M, Wuensch A, Summerfield A, Ayares D, Nagashima H, Baars W, Schwinzer R, Wolf E: Human TNF-related apoptosis-inducing

ligand-expressing dendritic cells from transgenic pigs attenuate human xenogeneic T cell responses. *Xenotransplantation* 2011, 19:40-51.

2. 学会発表  
国際学会

- 1) Nagashima H. Recent advances in production of genetically modified pigs for xenotransplantation. International Symposium Xenotransplantation, Berlin, 4-5 Jun, 2009
- 2) Kagawa N, Kuwayama M, Ikeda Y, Nagashima H, Leibo S, Kato O. Recovery of reproductive function and extension of life expectancy in old infertile mice by ovarian transplantation. 25th Annual Meeting of the European Society of Human Reproduction and Embryology, Amsterdam, The Netherlands. 28 Jun-1 Jul, 2009.
- 3) Miyagawa S, Yamamoto A, Ikeda K, Matsunari H, Nagashima H, Takeishi S, Yamada M, Fukuzawa M. Lectin microarray analyses of endothelial cells and fibroblasts from the  $\alpha 1,3$  galactosyltransferase knockout pig. The Transplantation Society, IPITA-IXA 2009, Venice, 12-16 Oct, 2009.
- 4) Yokoo T, Nagashima H, Matsunari H, Iwai S, Hosoya T, Kobayashi E. Xeno-metanephros as a biocompetent scaffold for kidney regeneration. The

Transplantation Society, IPITA-IXA 2009, Venice, 12-16 Oct, 2009.

- 5) Kagawa N, Kuwayama M, Ikeda Y, Silber S, Nagashima H, Kato O. Function of vitrified human ovarian grafts after xeno-transplantation. 65th Annual Meeting of the American Society for Reproductive Medicine, Atlanta, USA, 17-21 Oct, 2009.
- 6) Ikeda Y, Kagawa N, Kuwayama M, Nagashima H, Silber S, Kato K, Kato O: Increased longevity of old mice after allo-transplantation of young mice ovaries. In: 26th Annual Meeting of European Society of Human Reproduction and Embryology: 27-30 Jun 2010; Rome, Italy.
- 7) Amo A, Hashimoto S, Nagashima H, Takahashi M, Sasayama N, Morimoto Y: A novel vitrification method using a microfiltration membrane(MFM) enables a simple manipulation of human embryos. In: American Society for Reproductive Medicine 66th Annual Meeting: 17-23 Oct 2010; USA.
- 8) Nagashima H, Matsunari H, Ikezawa Y, Nakano K, Kurome M, Watanabe M, Umeyama K, Miyagawa S: Necessity and possibility of serial cloning in development of advanced genetically engineered pigs for xenotransplantation. In: 2010 Seoul Forum on Xenotransplantation: 20 Nov 2010; Seoul,

Korea.

9) Honda M, Konishi T, Mizumoto M, Matsunari H, Nagashima H, Aizawa M: Cell proliferation, morphology and differentiation of transgenic-cloned pig calvarial osteoblasts on the silicon-substituted hydroxyapatite ceramics fabricated via ultrasonic spray-pyrolysis technique. In: 5th International Symposium on Apatites and Correlative Biomaterials: 10-13 Dec 2010; Cairns, Australia.

10) Kurome M, Kessler B, Klymiuk N, Wiensch A, Zackhartchenko V, Nagashima H, Wolf E: Large-scale production of cloned transgenic pigs: efficiency and side effects. In: 2011 Annual Conference of the International Embryo Transfer Society: 8-12 Jan 2011; Florida, USA.

11) Fujishiro S, Mizukami Y, Ishino R, Nishimura T, Matsunari H, Nakano K, Nagashima H, Hanazono Y: The generation of “mouse-type” porcine induced pluripotent stem cells. Keystone Symposia: Stem Cells in Development, Tissue Homeostasis and Disease (B3): 30 Jan-4 Feb 2011; Santa Fe, New Mexico.

12) Bahr A, Burck L, Wunsch A, Kurome M, Kessler B, Nagashima H, Seissler J, Klymiuk N, Wolf E: Establishment of LEA29Y transgenic donor pigs for xenotransplantation. In: Swine in

Biomedical Research 2011: 17-19 Jul 2011; Chicago, USA.

13) Bahr A, Klymiuk N, Kurome M, Kessler B, Nagashima H, Ayares D, Wolf E: Determination of transgene integration loci by inverse PCR for multi-transgenic pig breeding. In: Swine in Biomedical Research 2011: 17-19 Jul 2011; Chicago, USA.

14) Klymiuk N, Wunsch A, Wallner K, Burkhardt K, Kessler B, Kurome M, Nagashima H, Wolf E: Efficient targeting of genomic loci in the pig and production of knockout pigs by somatic cell nuclear transfer. In: Swine in Biomedical Research 2011: 17-19 Jul 2011; Chicago, USA.

15) Klymiuk N, W. B, T. R, Bahr A, Wunsch A, Kessler B, Kurome M, Herbach N, Nagashima H, Schwinzer R et al: Tet-controlled transgene expression in large animal models. In: Swine in Biomedical Research 2011: 17-19 Jul 2011; Chicago, USA.

16) Matsunari H, Yokoo T, Matsumoto K, Yokote S, Iwai S, Medin JA, Watanabe M, Umeyama K, Sato Y, Nakano K, Maehara M, Nagashima H, Kobayashi E: A challenge to developing humanized kidney using porcine renal anlagen as scaffold. In: Swine in Biomedical Research Conference 2011: 17-19 Jul 2011; Chicago, USA.

- 17) Umeyama K, Watanabe M, Matsunari H, Nakano K, Takeuchi Y, Honda K, Yokoo T, Nagashima H: Development of genetically modified pigs suitable for diabetes and its complications research. In: Swine in Biomedical Research Conference 2011: 17-19 Jul 2011; Chicago, USA.
- 18) Renner S, Braun C, Klymiuk N, Blutke A, Herbach N, Wunsch A, Kessler B, Kurome M, Puk O, Nagashima H et al: Phenotypic characterization of diabetic INSC94Y transgenic pigs. In: Swine in Biomedical Research 2011: 17-19 Jul 2011; Chicago, USA.
- 19) Renner S, Klymiuk N, Streckel E, Braun C, Landbrecht-Schessl C, Wunsch A, Kessler B, Kurome M, Nagashima H, Aigner B et al: Transgenic pigs expressing the mutant insulin C93S for the study of pancreatic beta cell dysfunction. In: Swine in Biomedical Research 2011: 17-19 Jul 2011; Chicago, USA.
- 20) Kawano H, Ezoe K, Kagawa N, Yabuuchi A, Ochiai K, Nagashima H, Osada H, Aono F, Takehara Y, Kato O: hHg is critical for the uterine decidual response in mice. In: 16th World Congress on In Vitro Fertilization: 10-13 Sep 2011; Tokyo.
- 21) Honda K, Takeuchi Y, Matsuda T, Kanai T, Maehara M, Matsunari H, Nakano K, Umeyama K, Watanabe M, Nakauchi H, Nagashima H: Establishment of in vitro fertilization protocol using cryopreserved epididymal sperm for proliferation of genetically modified pigs. In: World Congress on Reproductive Biology (Second Scientific Meeting): 9-12 Oct 2011; Cairns, Australia.
- 22) Maehara M, Honda K, Nakano K, Matsunari H, Takeuchi Y, Kanai T, Matsuda T, Hagiwara Y, Sasayama N, Shirasu A, Takahashi M, Watanabe M, Umeyama K, Hanazono Y, Nagashima H: In vitro-maturation/fertilization derived porcine morulae can give rise to efficient piglet production following vitrification by the hollow fiber vitrification(HFV)-method. In: World Congress on Reproductive Biology (Second Scientific Meeting): 9-12 Oct 2011; Cairns, Australia.
- 23) Matsunari H, Nakano K, Maehara M, Ikezawa Y, Hagiwara Y, Sasayama N, Shirasu A, Takahashi M, Nagashima H: Hollow fiber vitrification (HFV) method: a novel high performance embryo cryopreservation method. In: World Congress on Reproductive Biology (Second Scientific Meeting): 9-12 Oct 2011; Cairns, Australia.
- 24) Nakano K, Matsunari H, Maehara M, Takeuchi Y, Ogawa B, Matsuda T, Kanai

T, Honda K, Hagiwara Y, Sasayama N, Shirasu A, Ohta A, Takahashi M, Nagashima H: High performance cryopreservation of porcine embryos by the hollow fiber vitrification(HFV)-method. In: World Congress on Reproductive Biology (Second Scientific Meeting): 9-12 Oct 2011; Cairns, Australia.

25) Klymiuk N, Wuensch A, Kurome M, Kessler B, Baehr A, Nagashima H, Ayares D, Wolf E: GalT-KO/CD46/hTM triple-transgenic donor animals for pig-to-baboon heart transplantation. In: Joint Congress CTS-IXA 2011: 23-26 Oct 2011; Miami, USA.

26) Sahara H, Nagashima H, Sekijima M, Tasaki M, Setoyama K, Matsunari H, Nakano K, Date H, Shimizu A, Yamada K: Prevention of hyper-acute pulmonary xenograft dysfunction using GalT-KO swine in an ex-vivo lung perfusion model. In: CTS-IXA 2011 Joint International Congress: 23-26 Oct 2011; Miami, USA.

27) Kurome M, Zakhartchenko V, Kessler B, Gungör T, Richter A, Klymiuk N, Nagashima H, Wolf E: Embryos produced by serial nuclear transfer can be improved by treatment with histone deacetylase inhibitors. In: 38th Annual Conference of International Embryo Transfer Society: 7-10 Jan 2012; Phoenix, USA.

28) Takeuchi H, Enomoto H, Nagashima H, Yoshikawa T, Okada Y, Toyama Y, Suda Y: Genetically engineered and systemically expressing Kusabira-Orange transgenic pigs as in vivo model to trace cell recruitment after anterior cruciate ligament reconstruction. In: 2012 Annual Meeting of Orthopaedic Research Society: 4-7 Feb 2012; San Francisco, California, USA.

#### 国内学会

- 1) 池田有希, 松成ひとみ, 落合恵子, 香川則子, 桑山正成, 加藤修, 長嶋比呂志. Cryotop 法を用いたマウス 4 細胞期胚および胚盤胞の再凍結保存後の生存性: 凍結・再凍結保存時期の検討. 第 50 回日本哺乳動物卵子学会, 東京都, 2009 年 5 月 8-9 日
- 2) 池田有希, 香川則子, 落合恵子, 桑山正成, 加藤修, 長嶋比呂志. 若齢時に凍結保存した卵巣の老齢マウスへの自家移植による繁殖能力の回復. 第 27 回日本受精着床学会, 京都市, 2009 年 8 月 6-7 日
- 3) 香川則子, 桑山正成, 池田有希, 落合恵子, 長嶋比呂志, 加藤修. 若齢時に凍結保存した卵巣の自家移植による老齢不妊マウスからの正常産子の作出. 第 27 回日本受精着床学会, 京都市, 2009 年 8 月 6-7 日
- 4) 梅山一大, 渡邊将人, 松成ひとみ, 黒目麻由子, 小川武甲, 中野和明, 藤原主, 長嶋比呂志. 糖尿病モデル遺伝子改変ブタの生産と病態の特徴について. 第 36 回豚の繁殖衛生セミナー, つくば市, 2009 年 8 月

27-28 日

5) 松成ひとみ, 渡邊將人, 梅山一大, 中野和明, 藤原主, 小川武甲, 池田有希, 春山エリカ, 塩田明, 長嶋比呂志. 肝臓特異的赤色蛍光(Kusabira-Orange)発現を示す遺伝子改変ブタの作出. 第102回日本繁殖生物学会, 奈良市, 2009年9月9-12日

6) 梅山一大, 渡邊將人, 松成ひとみ, 黒目麻由子, 小川武甲, 中野和明, 藤原主, 三木敬三郎, 長嶋比呂志. 糖尿病モデルトランスジェニッククローンブタの作出 III. 変異型ヒト HNF-1 $\alpha$  遺伝子を導入した Dominant-negative 変異体の病態の詳細解析. 第102回日本繁殖生物学会大会, 奈良市, 2009年9月10-12日

7) 香川則子, 桑山正成, 池田有希, 落合恵子, 長嶋比呂志, 加藤修. 若齢時凍結保存卵巣の自家移植による老齢不妊マウスの繁殖能力の回復および寿命の延長. 第102回日本繁殖生物学会, 奈良市, 2009年9月10-12日

8) 中野和明, 中山順樹, 小川武甲, 松成ひとみ, 藤原主, 斉藤紗恵子, 池澤有加, 吉岡耕治, 星 宏良, 長嶋比呂志. 抗酸化機能強化培地がブタ体外生産胚の凍結生存性に及ぼす影響. 第102回日本繁殖生物学会大会, 奈良市, 2009年9月10-12日

9) 池田孔佑, 山本亜紀, 松成ひとみ, 中野和明, 藤原主, 長嶋比呂志, 福澤正洋, 宮川周士. ブタ CMP-N-acetylneuraminic acid hydroxylase gene の解析. 第45回日本移植学会総会, 東京都, 2009年9月16-18日

10) 山本亜紀, 徐 恒傑, 武石俊作, 山田正雄, 三善英知, 池田孔佑, 松成ひとみ, 長嶋比呂志, 福澤正洋, 宮川周士. レクチンブロット法による  $\alpha$ Gal-knockout ブタの糖鎖抗原の解析. 第45回日本移植学会総会, 東京都, 2009年9月16-18日

11) 香川則子, 桑山正成, 池田有希, 落合恵子, 長嶋比呂志, 加藤修. 妊孕性保存および QOL 向上を目的とした卵巣ガラス化保存・移植技術の有効性. 第54回日本生殖医学会, 金沢市, 2009年11月22-23日

12) 松成ひとみ, 池澤有加, 渡邊將人, 梅山一大, 中野和明, 藤原 主, 竹内靖浩, 本田香澄, 前原美樹, 高柳就子, 山田和彦, 宮川周士, 長嶋比呂志.  $\alpha$ 1,3 ガラクトース転移酵素遺伝子ダブルノックアウトブタの体細胞クローニングにおける Scriptaid の効果. 第13回日本異種移植研究会, 東京都, 2010年3月14日

13) 池田孔佑, 山本亜紀, 近藤昭宏, 松成ひとみ, 長嶋比呂志, 高間勇一, 上野豪久, 福澤正洋, 宮川周士. ブタ CMP-N-acetylneuraminic acid hydroxylase gene の解析. 第13回日本異種移植研究会, 東京都, 2010年3月14日

14) 松成ひとみ, 小林敏寛, 渡邊將人, 中野和明, 藤原主, 長屋昌樹, 中内啓光, 長嶋比呂志. 膵臓特異的に緑色蛍光タンパク (Venus) を発現するトランスジェニック (Tg) ブタの作出. 第9回日本再生医療学会, 広島市, 2010年3月18-19日

15) 杉本直美, 横尾隆, 増田茂夫, 花園豊, 竹内賢吾, 松成ひとみ, 長嶋比呂志, 土居

雅子, 小林英司. 胎仔腎臓原基の器官培養を利用した幹細胞スクリーニング—手技の仔細と蛍光画像パターンによる分類—. 第9回日本再生医療学会, 広島市, 2010年3月18-19日

16) 岩井聡美, 横尾隆, 杉本直美, 松成ひとみ, 長嶋比呂志, 小林英司. 急性腎不全に陥った腎臓への胎児由来組織の移植効果—バイオイメーキング・ラットを用いた検討—. 第9回日本再生医療学会, 広島市, 2010年3月18-19日

17) 横尾隆, 松成ひとみ, 岩井聡美, 松本啓, 長嶋比呂志, 小林英司. 異種胎仔組織を用いた再生腎臓誘導法の開発. 第9回日本再生医療学会, 広島市, 2010年3月18-19日

18) 松成ひとみ, 中野和明, 藤原主, 池澤有加, 小川武甲, 高柳就子, 渡邊将人, 梅山一大, 長嶋比呂志. ブタにおける連続核移植の可能性: 第6世代クローンの作出. 日本畜産学会第112回大会, 東京都, 2010年3月28-30日

19) 松成ひとみ, 竹内靖浩, 保谷美恵, 関口溪人, 望月寛徳, 日高龍路, 渡邊将人, 梅山一大, 高柳就子, 中野和明, 藤原主, 長嶋比呂志. Kusabira-Orange 遺伝子導入トランスジェニッククローン(Tg-C)ブタの繁殖能力および遺伝子伝達. 日本畜産学会第112回大会, 東京都, 2010年3月28-30日

20) 藤原主, 松成ひとみ, 梅山一大, 渡邊将人, 中野和明, 竹内靖浩, 中野貞雄, 長嶋比呂志. 自動冷却装置を用いた遺伝子改変ブタ精子の凍結保存. 日本畜産学会第

112回大会, 東京都, 2010年3月28-30日

21) 日高龍路, 梅山一大, 望月寛徳, 関口溪人, 松成ひとみ, 中野和明, 藤原主, 渡邊将人, 長嶋比呂志. 糖尿病発症遺伝子改変ブタの長期飼育に関する研究. 日本畜産学会第112回大会, 東京都, 2010年3月28-30日

22) 天羽杏実, 橋本周, 右島理可, 山中昌哉, 中野和明, 長嶋比呂志, 高橋昌志, 笹山典久, 森本義晴: 胚操作性の高い中空糸膜を用いた超急速凍結後のヒト胚の発育能力. In: 第28回日本受精着床学会総会・学術講演会: 28-29 Jul 2010; 横浜.

23) 渡邊将人, 梅山一大, 松成ひとみ, 高柳就子, 春山エリカ, 中野和明, 藤原主, 池澤有加, 中内啓光, 長嶋比呂志: ブタ細胞における Zinc finger nuclease (ZFN)による EGFP 遺伝子のノックアウト (KO). In: 第103回日本繁殖生物学会: 1-4 Sep 2010; 十和田.

24) 中野和明, 松成ひとみ, 前原美樹, 竹内靖浩, 小川武甲, 藤原主, 池澤有加, 本田香澄, 荻原由以, 笹山典久, 白数昭雄, 大田久由, 高橋昌志, 長嶋比呂志: 中空糸法を用いたブタMII期卵及び初期胚のガラス化保存. In: 第103回日本繁殖生物学会: 1-4 Sep 2010; 十和田.

25) 本田香澄, 松成ひとみ, 藤原主, 竹内靖浩, 中野和明, 池澤有加, 前原美樹, 梅山一大, 渡邊将人, 長嶋比呂志: トランジェニックブタ凍結精子の卵管内人工授精. In: 第103回日本繁殖生物学会: 1-4 Sep 2010; 十和田.

- 26) 松成ひとみ, 前原美樹, 池澤有加, 中野和明, 落合恵子, 竹内靖浩, 本田香澄, 笹山典久, 白数昭雄, 荻原由以, 高橋昌志, 長嶋比呂志: 中空糸法によるマウス胚のガラス化保存. In: 第103回日本繁殖生物学会: 1-4 Sep 2010; 十和田.
- 27) 松成ひとみ, 小林俊寛, 渡邊将人, 梅山一大, 高柳就子, 中野和明, 藤原主, 池澤有加, 本田香澄, 前原美樹, 竹内靖浩, 須磨崎亮, 中内啓光, 長嶋比呂志: 臓器再生研究に向けた臍臓形成不全トランスジェニックブタの作出. In: 第103回日本繁殖生物学会: 1-4 Sep 2010; 十和田.
- 28) 梅山一大, 渡邊将人, 松成ひとみ, 中野和明, 藤原主, 日高龍路, 竹内靖浩, 望月寛徳, 関口溪人, 長嶋比呂志: 糖尿病モデルトランスジェニッククローンブタの作出 IV. 変異型ヒトHNF-1 $\alpha$ 遺伝子を導入した Dominant-negative変異体の後代産仔作出. In: 第103回日本繁殖生物学会: 1-4 Sep 2010; 十和田.
- 29) 天羽杏実, 橋本周, 右島理可, 山中昌哉, 中野和明, 長嶋比呂志, 高橋昌志, 笹山典久, 森本義晴: 胚と中空糸膜をユニットとしたヒト胚の超急速凍結. In: 第13回日本IVF学会: 18-19 Sep 2010; 大阪.
- 30) 本田みちよ, 水本みのり, 小西敏功, 松成ひとみ, 長嶋比呂志, 相澤守: クサビラオレンジブタ頭蓋骨より単離した骨芽細胞の骨分化過程の解析. In: 第14回生体関連セラミックス討論会: 3 Dec 2010; 京都.
- 31) Watanabe M, Umeyama K, Matsunari H, Takayanagi S, Haruyama E, Nakano K, Fujiwara T, Ikezawa Y, Nakauchi H, Nagashima H: Zinc-finger nucleases(ZFNs) -driven gene disruption can work in porcine primary cultured cells. In: 第33回日本分子生物学会年会: 7-10 Dec 2010; 神戸.
- 32) 正木英樹, 濱仲早苗, 脇山由起子, 山口智之, 長嶋比呂志, 中内啓光: Characterization of transgene-free porcine iPS cell. In: 第33回日本分子生物学会年会: 7-10 Dec 2010; 神戸.
- 33) 岩井聡美, 横尾隆, 松成ひとみ, 田中友加, 寺岡義布史, 大段秀樹, 長嶋比呂志, 小林英司: ブタをscaffoldとする腎臓再生: IV.ネコにおけるエリスロポエチン療法の開発. In: 第10回日本再生医療学会: 1-2 Mar 2011; 東京.
- 34) 松成ひとみ, 横尾隆, 岩井聡美, 渡邊将人, 梅山一大, Medin JA, 長嶋比呂志, 小林英司: ブタをscaffoldとする腎臓再生: III. Suicide geneを発現する遺伝子改変ブタの作出. In: 第10回日本再生医療学会: 1-2 Mar 2011; 東京.
- 35) 横尾隆, 松成ひとみ, 岩井聡美, 松本啓, 辻収彦, 岡野James洋尚, 岡野栄之, 長嶋比呂志, 小林英司: ブタをscaffoldとする腎臓再生 II: エリスロポエチン(EPO)産生組織の体内発生法の開発. In: 第10回日本再生医療学会: 1-2 Mar 2011; 東京.
- 36) 長嶋比呂志, 松成ひとみ, 横尾隆, 岩井聡美, 小林英司: ブタをscaffoldとする腎臓再生: I. クローンブタを利用した腎臓原基の発達能の検証. In: 第10回日本再生医



療学会: 1-2 Mar 2011; 東京.

37) 水本みのり, 吉川哲史, 小西敏功, 本田みちよ, 松成ひとみ, 竹内靖浩, 長嶋比呂志, 相澤守: 機械粉碎アパタイトとキトサン溶液を利用したキレート硬化型セメントの作製とその生体適合性. In: 日本セラミックス協会2011年年会: 16-18 Mar 2011; 浜松.

38) 重光勇介, 本田みちよ, 水本みのり, 松成ひとみ, 竹内靖浩, 長嶋比呂志, 相澤守: クサビラオレンジ蛍光遺伝子を導入したブタを用いた二極化した細孔構造を備えたb-リン酸三カルシウム多孔体のin vivo評価. In: 日本セラミックス協会2011年年会: 16-18 Mar 2011; 浜松.

39) 鷹本拓也, 島田愛生, 安富由美子, 本田みちよ, 水本みのり, 松成ひとみ, 竹内靖浩, 長嶋比呂志, 相澤守: クサビラオレンジブタ脛骨埋入による高強度化アパタイトファイバースキャフォールドの生体適合性評価. In: 日本セラミックス協会2011年年会: 16-18 Mar 2011; 浜松.

40) 前原美樹, 松成ひとみ, 中野和明, 落合恵子, 本田香澄, 竹内靖浩, 池澤有加, 池田有希, 長嶋比呂志: 哺乳動物卵・初期胚および組織のガラス化保存について. In: 京都臓器保存セミナー: 19 Mar 2011; 京都.

41) 梅山一大, 渡邊将人, 松成ひとみ, 中野和明, 竹内靖浩, 本田香澄, 横尾隆, 長嶋比呂志: 糖尿病合併症研究に適した遺伝子改変ブタの開発. In: 第58回日本実験動物学会: 25-27 May 2011; 東京.

42) 本田みちよ, 小西敏功, 水本みのり,

松成ひとみ, 長嶋比呂志, 相澤守: ケイ素含有アパタイトセラミックス上でのクサビラオレンジブタ頭蓋骨由来骨芽細胞の骨分化過程の解析. In: 第122回無機マテリアル学会: 2-3 Jun 2011; 船橋.

43) 本田みちよ, 小西敏功, 水本みのり, 松成ひとみ, 長嶋比呂志, 相澤守: クサビラオレンジブタ頭蓋骨由来骨芽細胞の単離とその生物学的評価. In: 第20回硬組織再生生物学会: 27 Aug 2011; 東京.

44) 天羽杏実, 橋本周, 右島理可, 山中昌哉, 中野和明, 長嶋比呂志, 高橋昌志, 笹山典久, 森本義晴: 中空糸膜デバイスを用いた凍結融解操作後の卵子回収率の検討. In: 第29回日本受精着床学会総会: 9-13 Sep 2011; 東京.

45) 前原美樹, 本田香澄, 中野和明, 松成ひとみ, 竹内靖浩, 金井貴博, 松田泰輔, 萩原由以, 笹山典久, 白数昭雄, 高橋昌志, 渡邊将人, 梅山一大, 花園豊, 長嶋比呂志: 中空糸法でガラス化されたブタ体外成熟・受精桑実胚からの高効率産仔作出. In: 第104回日本繁殖生物学会大会: 15-17 Sep 2011; 盛岡.

46) 中野和明, 松成ひとみ, 前原美樹, 竹内靖浩, 小川武甲, 松田泰輔, 金井貴博, 本田香澄, 萩原由以, 笹山典久, 白数昭雄, 太田久由, 高橋昌志, 長嶋比呂志: 中空糸法を用いてガラス化されたトウキョウX胚からの高効率産仔作出. In: 第104回日本繁殖生物学会大会: 15-17 Sep 2011; 盛岡.

47) 本田香澄, 竹内靖浩, 松田泰輔, 金井貴博, 前原美樹, 松成ひとみ, 中野和明, 梅

山一大, 渡邊將人, 中内啓光, 長嶋比呂志: 遺伝子改変ブタの凍結精子を用いた体外受精による産仔作出. In: 第104回日本繁殖生物学会大会: 15-17 Sep 2011; 盛岡.

48) 松成ひとみ, 金井貴博, 本田香澄, 前原美樹, 竹内靖浩, 渡邊將人, 梅山一大, 中野和明, 池澤有加, 高柳就子, 中内啓光, 長嶋比呂志: シングルコピーの赤色蛍光蛋白 Kusbira-Orange 遺伝子を組み込んだトランスジェニックブタの系統確立. In: 第104回日本繁殖生物学会大会: 15-17 Sep 2011; 盛岡.

49) 梅山一大, 渡邊將人, 松成ひとみ, 中野和明, 藤原主, 日高龍路, 竹内靖浩, 本田香澄, 望月寛徳, 関口溪人, 長嶋比呂志: 糖尿病モデル・変異型ヒトHNF-1 $\alpha$ 遺伝子を導入したトランスジェニックブタの病態解析. In: 第25回日本糖尿病・肥満動物学会: 5 Nov 2011; 東京.

50) 水本みのり, 小西敏功, 本田みちよ, 松成ひとみ, 竹内靖浩, 長嶋比呂志, 相澤守: キトサン添加によるインジェクション型アパタイトセメントの試作と大型動物による生体適合性の検証. In: 第33回日本バイオマテリアル学会大会: 21-22 Nov 2011; 京都.

51) 梅山一大, 渡邊將人, 松成ひとみ, 中野和明, 竹内靖浩, 本田香澄, 長田道夫, 横尾隆, 長嶋比呂志: 糖尿病発症遺伝子改変ブタによる結節性病変を有した腎病変の作出. In: 第23回日本糖尿病性腎症研究会: 3-4 Dec 2011; 東京.

52) 江副賢二, 河野博臣, 藪内晶子, 香川

則子, 池澤有加, 中西彬, 青野文仁, 竹原祐志, 長嶋比呂志, 加藤修: 排卵誘発を目的としたhCG投与がマウスの子宮および着床後胚発生に与える影響. In: 第56回日本生殖医学会学術講演会総会: 8-9 Dec 2011; 横浜.

53) 王丹丹, 高間勇一, 上野豪久, 福沢正洋, 武石俊作, 宮川周士, 興津輝, 中野和明, 松成ひとみ, 長嶋比呂志:  $\alpha$ Gal-knockout ブタ関連の豚島の糖鎖抗原の解析. In: 第14回日本異種移植研究会: 10 Dec 2011; 広島.

54) 岩井聡美, 田中友加, 寺岡義布史, 大段秀樹, 横尾隆, 松成ひとみ, 長嶋比呂志, 小林英司: ブタ胎仔後腎移植を用いたペット猫腎不全治療戦略-ネコにおける抗ブタ抗体の存在と対策. In: 第14回日本異種移植研究会: 10 Dec 2011; 広島.

55) 宮川周士, 王丹丹, 高間勇一, 上野豪久, 福沢正洋, 長嶋比呂志: 異種移植ブタ開発研究の流れ. In: 第14回日本異種移植研究会: 10 Dec 2011; 広島.

56) 松成ひとみ, 横尾隆, 松本啓, 横手伸也, 岩井聡美, Medin JA, 渡邊將人, 梅山一大, 佐藤有里, 中野和明, 前原美樹, 長嶋比呂志, 小林英司: 再生ヒト化腎臓作製に向けて-ブタ胎仔腎臓原基の発育と消去に関する新戦略. In: 第14回日本異種移植研究会: 10 Dec 2011; 広島.

57) 中野和明, 渡邊將人, 松成ひとみ, 松田泰輔, 本田香澄, 前原美樹, 竹内靖浩, 金井貴博, 新井良和, 梅山一大, 藤城修平, 長屋昌樹, 花園豊, 長嶋比呂志: ブタ単為発生胚を用いた人工多能性幹細胞のキメラ形

成能検証システムの確立. In: 第34回日本分子生物学会大会: 13-16 Dec 2011; 横浜.  
58) 竹内靖浩, 久保喜辰, 山本拓也, 本田香澄, 金井貴博, 松田泰輔, 梅山一大, 石川健次, 菅沼俊輔, 長嶋比呂志: 新規に開発した精子解析装置を用いたブタ精子凍結過程における運動性変化の解析. In: 第96回日本養豚学会大会: 22-23 Mar 2012; 東京.  
59) 竹内靖浩, 山本拓也, 久保喜辰, 本田香澄, 金井貴博, 松田泰輔, 梅山一大, 石川健次, 菅沼俊輔, 長嶋比呂志: 新規開発した精子解析装置を用いたブタ精子運動性解析. In: 日本畜産学会第115回大会: 27-30 Mar 2012; 名古屋.

招待講演

- 1) 長嶋比呂志. 遺伝子改変ブタの再生医療への応用 自治医科大学先端医療技術開発センターシンポジウム. 下野市 (自治医科大学)、2009年4月8日
- 2) 長嶋比呂志. トランスレーショナルリサーチ推進のためのブタの遺伝子改変の現状. バイオ・ナノテクフォーラムイブニングセミナー21. 東京都 (東京女子医大)、2009年4月27日
- 3) 長嶋比呂志. Tokyo Pig Center 機構 (構想). 自治医科大学CDAMTec内覧会、下野市 (東京女子医大)、2009年7月14日
- 4) Nagashima H. Recent advances in production of genetically modified pigs in Meiji University. Yunnan Agricultural University. Yunnan, China, 19 Aug, 2009

5) 長嶋比呂志. トランスレーショナルリサーチに向けたクローンブタ・遺伝子改変ブタの開発. 東京電機大学公開講座 ME 講座 第33回、東京都 (東京電機大学)、2009年9月24日

6) 長嶋比呂志. クローン動物とクローニング技術の医学・医療への応用. 体細胞クローン技術の取り扱いと利用方向. 平成21年度問題別研究会「体細胞クローン技術の現状と将来展望」東京都、2009年12月14日~15日

7) 長嶋比呂志. クローンブタのaging研究への応用の可能性. In: 第28回日本受精着床学会総会・学術講演会: 28-29 Jul 2010, 横浜.

8) Nagashima H, Matsunari H, Ikezawa Y, Nakao K, Kurome M, Watanabe M, Umeyama K, Miyagawa S. Necessity and possibility of serial cloning in development of advanced genetically engineered pigs for xenotransplantation., 2010 Seoul Forum on Xenotransplantation, 2010, Seoul, Korea. pp. 53-60.

9) 長嶋比呂志: ブタ体細胞クローン技術を基盤とした移植・再生医学への取り組み. In: 第8回北関東甲信越肝移植談話会. 15 Jan 2011 東京.

10) Nagashima H: The interface between reproductive biology and regenerative medicine. In: World Congress on Reproductive Biology (Second Scientific Meeting): 9-12 Oct

2011; Cairns, Australia; 2011.

11) 長嶋比呂志: 異種移植研究の過去・現在・未来: ブタ発生工学の視点から. In: 第14回日本異種移植研究会: 10 Dec 2011; 広島.

12) 長嶋比呂志, 松成ひとみ, 渡邊将人,

梅山一大, 長屋昌樹: トランスレーショナルリサーチモデルとしての遺伝子改変ブタ・クローンブタの最前線. In: 先進医用ブタの開発と前臨床研究拠点形成プロジェクト第2回公開シンポジウム: ブタの医用動物への展開: 22 Mar2012; 鹿児島.

表 1. ウサギ軟骨細胞の低温保存後の生存性

培地名	2 週間保存 (%)			3 週間保存 (%)		
	生存率	apoptosis	apoptosis + necrosis	生存率	apoptosis	apoptosis + necrosis
mHFDM-1	96.4	0.7	3.6	79.5	1.4	20.5
RPMI	94.6	4.2	5.4	54.9	2.0	45.1
RPMI+supl	96.5	2.9	3.5	64.1	0.6	35.9

表 2. mHFDM-1 で低温保存したウサギ軟骨細胞の生存性に対する回復培養の影響

	生存率 (%)	apoptosis (%)	apoptosis + necrosis (%)
2 週間保存	91.3	3.5	8.7
2 週間保存 + 1 日培養	94.2	4.2	5.7
3 週間保存	87.6	1.0	12.4
3 週間保存 + 1 日培養	89.6	4.5	10.4

厚生労働科学研究費補助金（再生医療実用化研究事業）  
 分担研究報告書 長嶋比呂志

表 3. 新規法でガラス化されたウサギ軟骨由来積層化細胞シートの融解後の形態変化および細胞生存性

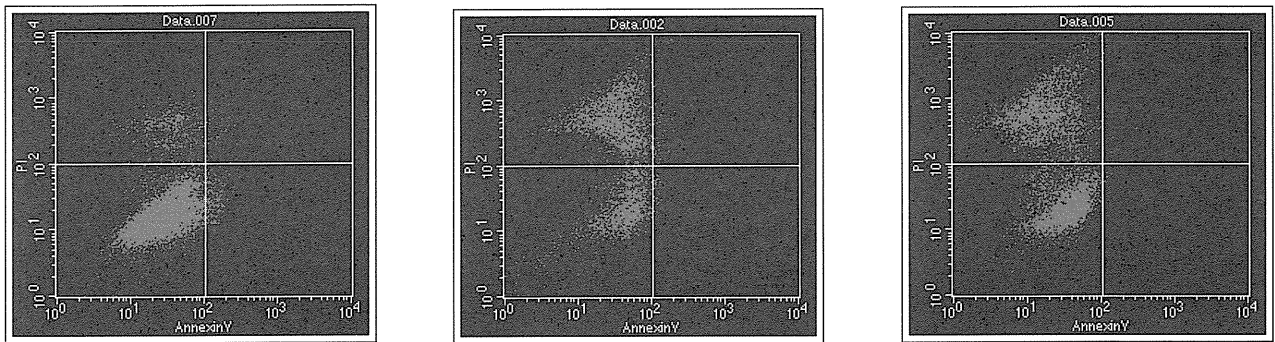
細胞	実験区 (PLLの有無)	実施数	融解後の 破損率(%)	細胞の 平均生存率
ウサギ軟骨細胞 A (凍結細胞)	非ガラス化	2	—	94.1%
	+	2	0/2(0.0%)	93.5%
	—	2	2/2(100.0%)	94.2%
ウサギ軟骨細胞 B (凍結細胞)	非ガラス化	2	—	96.3%
	+	3	0/3(0.0%)	89.5%
	—	3	3/3(100.0%)	89.8%
ウサギ軟骨細胞 C (初代培養細胞)	非ガラス化	3	—	95.2%
	+	3	0/3(0.0%)	90.1%
	—	3	2/3(66.7%)	90.9%

表 4. 従来法でガラス化されたウサギ軟骨由来積層化細胞シートの融解後の形態および細胞生存性評価

PLLの有無	実施数	融解後の破損率(%)	細胞の平均生存率
+	2	0/2(0.0)	78.8%
—	3	3/3(100.0)	—

表 5. パッケージング法でガラス化されたウサギ軟骨由来積層化細胞シートの融解後の形態および細胞生存性評価

実施数	融解後の破損率(%)	細胞の平均生存率
3	0/3(0.0)	87.2%



①mHFDM-1

Gated	(%)
UL	4.94
UR	0.41
LL	92.85
LR	1.8

②RPMI

Gated	(%)
UL	58.85
UR	1.63
LL	38.59
LR	0.93

③RPMI+supl

Gated	(%)
UL	38.57
UR	0.23
LL	61.08
LR	0.12

図 1. ウサギ軟骨培養細胞の低温保存後の生存性（保存期間：3 週間）

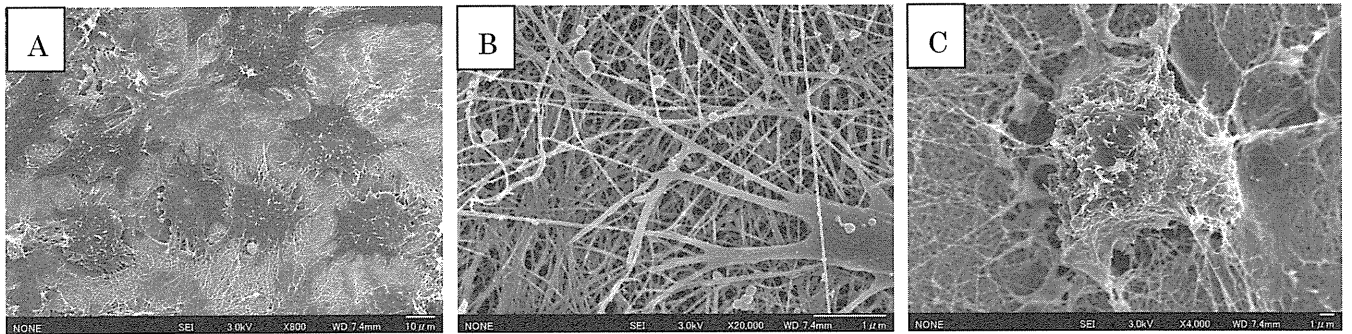


図 2. ウサギ軟骨細胞シートの走査電顕像（培養 14 日目）

(A: 細胞と細胞外基質の全体(×800), B: 細胞外基質のネットワーク構造(×20,000), C: 軟骨細胞に特徴的なコロニーの形成(×4,000))

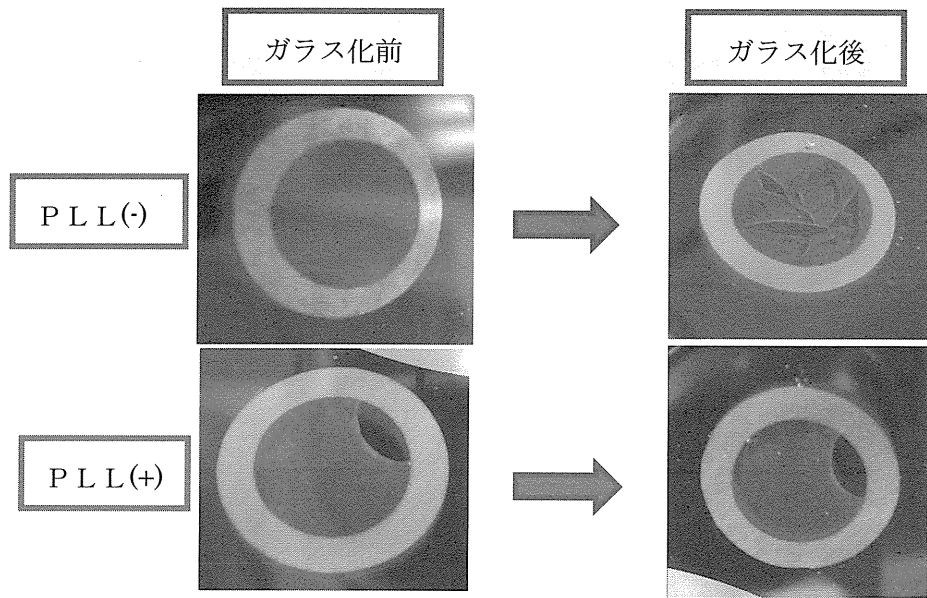


図 3. 新規法でガラス化されたウサギ軟骨細胞シート（東海大学にて作製）

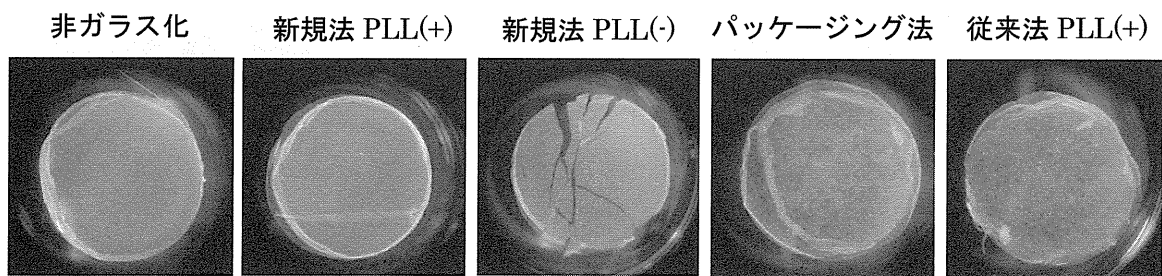


図 4. 種々の方法でガラス化された細胞シートの融解後の形態変化

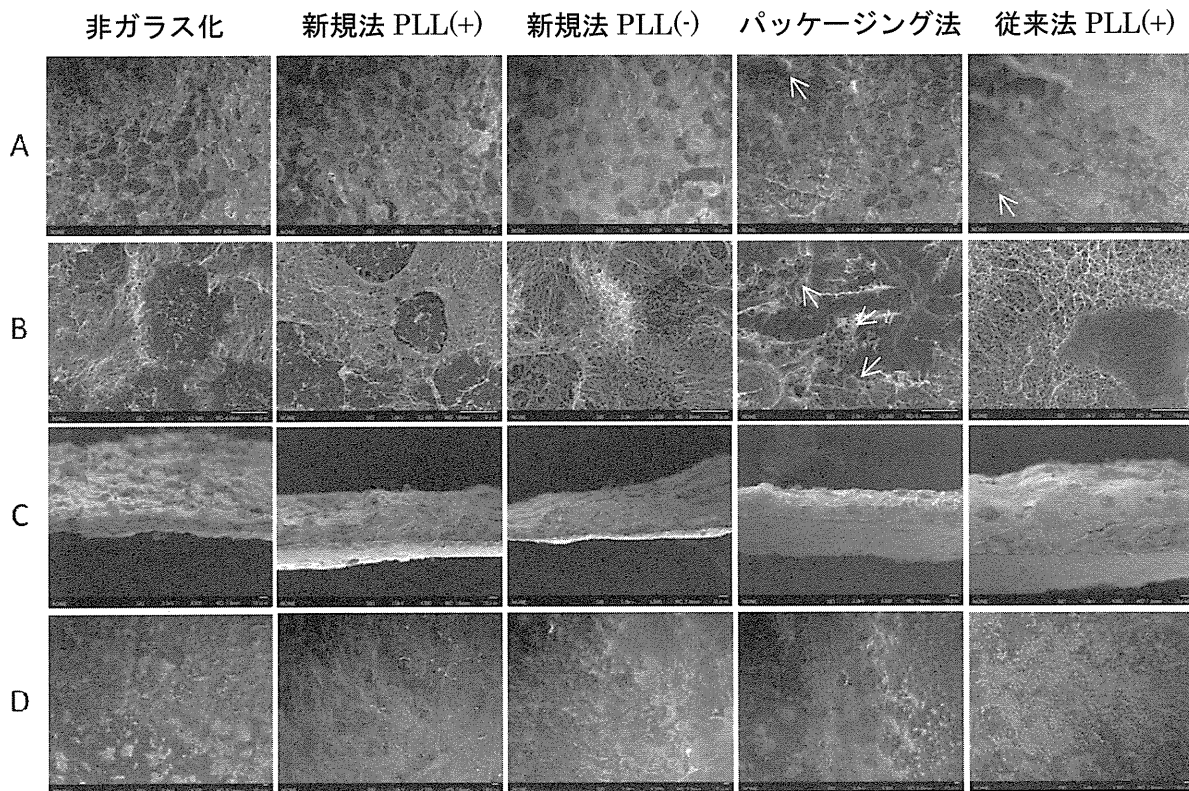


図 5. 種々の方法でガラス化された細胞シート表面および断面構造の走査型電顕像  
(A: 上面(×300)、B: 上面(×2,000)、C: 断面(×500)、D: 下面(×300))



## 光を用いた細胞シートの非侵襲的特性評価に関する検討

研究協力者 谷川 待子 防衛医科大学校 医用工学講座 研究員  
分担研究者 石原 美弥 防衛医科大学校 医用工学講座 教授

研究要旨：本研究では、同種細胞シート移植のための技術開発に関する研究の 1 つとして、「製造工程の異なる種々のヒト細胞シートの非侵襲的特性評価」に関する研究成果として報告する。移植に用いる細胞シートそのものを非侵襲的に評価することで再生医療のバリデーション実施が可能となる。本研究では、光をモダリティとして選択し、再生医療のバリデーションが可能となるようなシステムを構築することを目的とした。分析手段には分子分光法を採用し、目的を達成できるハイパースペクトル顕微鏡システムの構築をめざした。この結果、生細胞を対象に高分解能で空間情報と波長情報が同時に取得できる、5次元（空間(x、y、z)軸、時間軸、波長軸の5軸）細胞追跡を可能にするシステムを構築できた。

### A. 研究目的

分子分光法は、分子のエネルギー準位に相当する光の波長の吸収特性や発光特性から、分子構造や定量的成分分析が可能な方法である。

この分子分光分析を可能にするハイパースペクトルセンサ（Hyper Spectral Sensor、以下、HSS）は、画像情報及びスペクトル（分光）情報を同時に得ることが可能なセンサであり、元々はリモートセンシングの分野で発展してきたセンサである。近年、この特長を生かしたバイオメディカル分野への応用がなされ始めている。HSS データには、スペクトル情報が画像内の全ての画素に対して取り込まれる特徴を持つ。取得した HSS データを画像化するには、任意の波長に対する強度表示を行うことが可能であり、たとえば赤緑青の 3 つの波長におた波長で撮像を行うのに対し、HSS は、波

ける光強度を基に画像を作成すれば、可視画像に近い RGB 表示を得ることができる。また、蛍光強度分布を取得したい場合は、その蛍光波長（任意の複数の波長あるいは単数の波長でも可）における光強度を画像化することにより得ることができる。

上記の特長を利用し、リモートセンシング分野では、HSS で取得したスペクトル特性の違いから画像内の特異物体を識別・抽出したり、ある波長での光強度に対応した色表示を行うことにより、特定物体の分布状況を把握できる。この HSS の利用は、バイオメディカル分野すなわち、再生医療のバリデーションに有効に利用できると考えられる。

通常、HSS と比較されるのはマルチスペクトルセンサ（以下、MSS）である。MSS は数バンドから十数バンドの離散的に分かれ長を数十～数百バンドに連続的に分けて撮

像を行うものである。つまり、HSSは連続的な多数のバンドでの撮像が可能で、かつ原理的にフィルター切り換えなどが不要であるため、波長分解能が高く、連続のスペクトル特性が同時刻で取得できる特長を持

つ。つまり、得られるデータが図1のように  $x$ 、 $y$ 、 $\lambda$  の3次元データとなる。これにより、連続的なスペクトルで物質の評価・同定が可能であることがわかる。

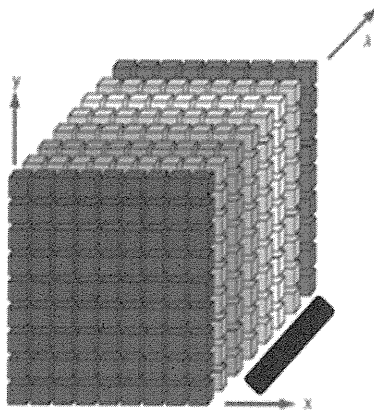


図1 ハイパースペクトルセンサで得られるデータ

HSSの原理としては、一般的に撮像光学系、波長分散素子を用いた分光光学系、及び CCD や FPA などの2次元画像センサ素子から構成される。被写体からの光は撮像光学系（対物レンズ）通過後に線状のスリットを通ることにより1列の光となり、その後波長分散素子にてスリットに対して垂直の方向に分光される。この2次元に広がった光に対して、2次元画像センサの一方のラインで空間軸の光強度情報を、もう一方のラインでスペクトル（波長）軸の光強度情報を取得する。また、HSSと被写体の相対的な位置を、2次元センサの空間軸に対し垂直方向に変化させることにより、もう一方の空間軸の光強度情報を取得する。これにより被写体の2次元画像情報及びス

ペクトル情報が取得できることになり、HSSで取得したデータは直交する2つの空間軸とスペクトル軸を持つ3次元データとなる。ここで、スペクトル情報は、2次元画像センサの1ラインにて取得するため、ほぼ連続的なスペクトル特性を示すデータとなり、その検知波長域は2次元センサの検知波長域に、また波長分解能は検知波長域を画素数で除算した値に相当する。たとえば、1000 nmの波長範囲を500画素のセンサで検知するとき、波長分解能は2 nmとなる。一方、空間分解能は、視野角をセンサの空間軸の画素数で除算した値とHSSと被写体の相対的な位置の変化の割合に依存する。

2次元の画像を得るためには、被写体自身を移動させる方法のほかに、HSSの撮像光学系の前に1次元スキヤニングミラーなどの走査光学系を設置する方法や、HSSを航空機や衛星に搭載して、プラットフォームの進行方向への動きを利用する方法（プッシュブルーム方式）などがある。

波長分散素子としては、プリズム、透過型や反射型のグレーティング、プリズムと透過型グレーティングを組み合わせたもの、音響光学素子などが使用される。その他、HSSデータを取得するための方法として、フレネルレンズ等の回折レンズを用いた焦点位置の波長による違いを利用する方法、干渉フィルターを用いるもの、干渉計を利用するものなどがある。

近年のHSSの発展には、HSSを構成する各要素における性能向上と密接な関係がある。具体的には、2次元画像センサにおける高感度化及び多画素化、MEMS技術の進展による波長分散素子等の光学部品の高性能化、データ解析技術の向上などがHSSの発展に大きく寄与している。これらの進展は、検知波長範囲の拡大にも寄与しており、適用範囲が広がってきている。これらのハイパースペクトルセンサを生物医学分野に適用するためには、微小のものを精細に撮像可能にする必要がある。本研究の目的として、生きた細胞の観察、画像取得やその解析ができる研究用倒立顕微鏡にハイパースペクトルシステムを組み込むようなシステム構築を目的とした。

また、細胞のダイナミックな変化を生きたまま観察する技術が日々進歩を続けている。現在までに生細胞の様々な情報を得ることが可能となった。タイムラプスはその

1つの手段で、細胞を培養しながら時間的あるいは空間的な変化や波長情報などを連続して観察する手法である。これについても詳細に本項で検討する。

## B. 研究方法

本研究でのHSSは、ラインイメージング方式を採用することにした。これにより、高速にデータの取得が可能で、照明光による細胞への影響を最小限にできるからである。分光光学系に波長分散素子を用いたハイパースペクトルセンサを用い、290～870nmの波長範囲を512バンドで検出することで波長分解能2.9nmを実現した。また、検出系には、EMCCDカメラを採用した。

EMCCDカメラは、Electron Multiplier CCD cameraのことで、ノイズに埋もれて画像が記録できないといったCCDの問題を解決すべく開発された増倍型高感度カメラである。増倍型高感度カメラとは、カメラに電子増倍方式を搭載し、信号量を増やすことで感度を高くしたカメラである。具体的原理はCCDチップ上に電子を増倍する電子増倍機能を持つ。蓄積時間（露光時間）を増やすことで利用できる光量を増やす冷却CCDとは異なる方式の高感度カメラであるが、ゲインを下げて使用すると蓄積型高感度カメラとしての使用も可能となる。ただし、暗電流ノイズの面から、冷却が必須となる。さらに、このEMCCDカメラの特徴として、CCDチップの温度が低いほど電子増倍率が高くなる特性がある。そのため、冷却温度の低いことが重要で、かつ、その冷却温度が安定していることも重要である。

システムを構築する際には、この点につ

いて、十分考慮するように配置した。上記の HSS、及び EMCCD を研究用倒立顕微鏡に組み込んだ。つまり、通常の顕微鏡用 CCD は、そのまま残し、検出を切り替える形で HSS 用システムと併用できるようにした。これにより、一般的な顕微鏡画像を取得できるので、複数の研究機関で進める本研究のような体制には資料データ共有に

有用と考えられる。本研究でのタイムラプス実験は測定対象として、単層培養した軟骨細胞と、白色家兎の軟骨細胞を単離して作製した細胞シートを対象にした。また、細胞シートは単層の場合と積層化シートと両方を対象にした。本研究では生きた細胞の観察、画像取得やその解析ができる研究用倒立顕微鏡を使用した。

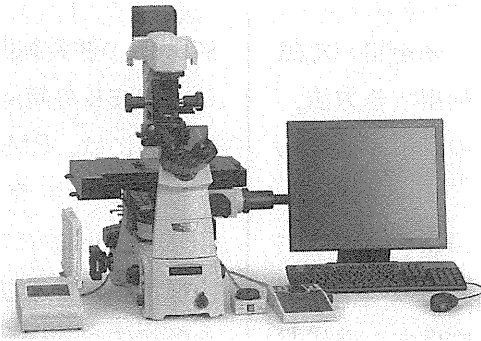


図2 研究用倒立顕微鏡として使用したニコンの「ECLIPSE Ti-E」

タイムラプス観察時に問題となる、長時間観察時のフォーカスずれを自動焦点維持装置を内蔵することにより瞬時に解決し、常に焦点の合った画像が取得できる。画像統合ソフトウェア「NIS-Elements」により、顕微鏡はもちろんカメラ、励起フィルターホイールなど周辺機器を連動させて制御する。Chamlide TC は培養細胞を長期間観察できるインキュベーションシステムであ

る。インキュベーター、加湿器を用い温度、湿度、pH を保ち、培地の蒸発を防ぐことで最適な培養条件を作り出すことができる。インキュベーターを顕微鏡の電動ステージに設置することで、細胞を培養しながら観察ができる。CU-105 コントローラーとガスポンペはポリウレタンチューブで接続し、CU-105 コントローラーの流量計を用いてガス流量を調整できる。