

学位論文 博士（工学）

レーザー誘起応力波による遺伝子導入法を用いた
脊髄損傷モデルラットの運動機能改善

2012 年度

慶應義塾大学大学院理工学研究科

安藤 貴洋

本論文の構成と目的

脊髄損傷は、交通事故やスポーツ外傷などに伴って脊柱に強い外力が加わり、脊髄実質が損傷する病態である。現在、日本には約 10 万人の患者がいるとされているが、若年層の患者も多く、長年にわたる麻痺による日常生活の不自由と精神的負担を余儀なくされている。しかし、神経組織の再生能は他の生体組織と比べて極めて低いことから、現在までに脊髄損傷によって失われた機能を回復するための有効な治療法は確立されていない。

期待される脊髄損傷の治療法の一つとして、遺伝子治療が近年注目を集めている。この遺伝子治療の根幹技術となる遺伝子導入技術には、治療対象が中枢神経系の場合、特に高い安全性、精密性、および時間的制御性が求められる。それに加えて、脊髄は管状の椎骨で囲まれた神経組織であるため、生体深部まで治療遺伝子を導入できる技術が必要である。

レーザーを用いる遺伝子導入法は、エネルギーの空間的・時間的制御性が高いことに加えて、光ファイバを用いることにより、臨床現場において操作性に富む経カテーテル的遺伝子治療を実現できるといった特長を備えている。その中でも、固体材料へのパルスレーザー照射によって発生するレーザー誘起応力波(laser-induced stress wave, LISW)を用いた遺伝子導入法は、一度の適用で遺伝子導入できる細胞数が多く、かつ応力波が光よりも散乱が少なく生体内を伝搬するため深部組織への適用が可能である。

本研究は、LISW による遺伝子導入技術を用いた脊髄損傷の遺伝子治療を目的として行われたものである。本論文は次の 6 章で構成されている。

第 1 章は序論であり、最初に脊髄損傷に対する現行の治療法と、その一つとして高い治療効果が有望視されている遺伝子治療について概説している。次いで、遺伝子治療の根幹技術となる遺伝子導入法の研究動向と技術的課題を明確にした上で、本研究の目的と意義を述べている。

第 2 章では、LISW の発生および伝搬理論について述べた後、脊髄の模擬組織を用いて行った LISW の伝搬特性計測の結果と考察を示している。脊髄への標的部位選択的な遺伝子導入を達成するために必要な圧力伝搬特性が得られていることを明らかにしている。

第 3 章では、ラットの健常脊髄を対象とした、LISW によるレポーター遺伝子の導入結果について述べている。その遺伝子発現の特性から、発現効率のレーザーパラメータ依存性、発現部位の標的性、発現細胞種、さらに本遺伝子導入技術の安全性を評価している。

第 4 章では、脊髄損傷モデルラットを対象にグリア瘢痕の形成を抑制する効果のある遺伝子を導入し、その運動機能に関する評価をしている。グリア瘢痕は、脊髄損傷により活性化されたグリア細胞が集積して形成され、神経軸索の伸長を阻害する。LISW による遺

伝子導入技術を用い、グリア瘢痕形成の一端を担う中間径フィラメントタンパク質の発現を抑制することで、下肢運動機能の改善効果が得られたことを実証している。中間径フィラメントタンパク質発現の抑制効果に加え、組織学的な評価を行い、遺伝子治療後の運動機能改善を多角的に検証している。

第 5 章は、LISW による脊髄損傷の遺伝子治療技術を臨床現場に適用するための、光ファイバを用いた経カテーテル的遺伝子導入デバイスの開発について述べている。先端部の最大外径が 2.7 mm の遺伝子導入デバイスを作製し、遺伝子導入に必要な LISW の圧力特性と遺伝子発現特性が得られていることを実証している。

第 6 章は本研究の結論であり、本研究により得られた成果を総括するとともに、今後の展望を述べている。

目次

	頁
第1章 序論	1
1.1 はじめに	2
1.2 脊髄損傷	2
1.3 脊髄損傷の治療方法	3
1.3.1 神経保護	4
1.3.2 細胞補充	4
1.3.3 軸索再生	5
1.4 遺伝子治療と遺伝子導入技術	7
1.4.1 ウイルスベクター法	8
1.4.2 化学的手法	9
1.4.3 物理的手法	10
1.4.3.1 エレクトロポレーション	11
1.4.3.2 超音波遺伝子導入法	12
1.5 レーザを用いた遺伝子導入技術	13
1.5.1 レーザ直接照射法	13
1.5.2 レーザ誘起応力波による遺伝子導入	15
1.6 本研究の目的と論文の構成	17
参考文献, 図表	19
第2章 レーザ誘起応力波の発生と生体内伝搬	58
2.1 はじめに	59
2.2 レーザ誘起応力波の物理	59
2.3 レーザ誘起応力波の伝搬	63
2.4 レーザ誘起応力波の伝搬特性計測	65
2.4.1 レーザ誘起応力波の発生	65
2.4.2 レーザ誘起プラズマの計測	66
2.4.3 レーザ誘起応力波の圧力測定	67
2.4.4 レーザ誘起応力波伝搬の可視化	68
2.5 実験結果	69

2.5.1 レーザ誘起プラズマ	70
2.5.2 レーザ誘起応力波の圧力測定	70
2.5.3 レーザ誘起応力波伝搬の可視化	72
2.6 考察	73
2.6.1 脊髄実質に対する LISW 直接適用の検討	73
2.6.2 椎骨を介した脊髄への LISW 間接適用の検討	74
2.7 まとめ	75
参考文献, 図表	76
第3章 レーザ誘起応力波による健常ラット脊髄への部位選択的遺伝子導入	102
3.1 はじめに	103
3.2 中枢神経系の構成	103
3.3 LISW の物理特性と細胞への力学的作用	105
3.4 健常ラット脊髄へのレポーター遺伝子導入実験	109
3.4.1 プラスミド DNA	109
3.4.2 レーザ誘起応力波の適用	110
3.4.3 遺伝子発現の評価	111
3.4.4 遺伝子発現細胞の同定	113
3.4.5 運動機能評価	114
3.5 実験結果	114
3.5.1 EGFP 発現遺伝子の導入	114
3.5.2 ルシフェラーゼ発現遺伝子の導入	115
3.5.3 遺伝子発現細胞の同定	116
3.5.4 運動機能評価	117
3.6 考察	117
3.6.1 LISW の物理特性と細胞への力学的作用	117
3.6.2 遺伝子発現部位と遺伝子発現細胞	119
3.6.3 レーザ誘起応力波の安全性	120
3.6.4 遺伝子発現特性と脊髄損傷治療	121
3.7 まとめ	122
参考文献, 図表	124

第4章 レーザ誘起応力波を用いた siRNA 導入による	
脊髄損傷モデルラットの運動機能改善	147
4.1 はじめに	148
4.2 実験方法	149
4.2.1 ラット脊髄損傷モデル	150
4.2.2 レーザ誘起応力波	150
4.2.3 損傷脊髄に対する LISW 適用の安全性の調査	150
4.2.4 損傷脊髄への siRNA 導入	151
4.2.5 蛍光標識 siRNA の分布評価	152
4.2.6 中間径フィラメントタンパク質の発現評価	153
4.2.7 組織学的評価	154
4.2.8 運動機能評価	154
4.3 実験結果	155
4.3.1 損傷脊髄に対する LISW 適用の安全性の調査	155
4.3.2 損傷脊髄内における siRNA 分布	155
4.3.3 中間径フィラメントタンパク質の発現特性	156
4.3.4 損傷脊髄におけるグリア瘢痕と空洞形成	156
4.3.5 運動機能スコアの経時変化	157
4.4 考察	157
4.4.1 損傷脊髄に対する LISW 適用の安全性	157
4.4.2 LISW の伝搬特性と蛍光標識 siRNA の導入	158
4.4.3 損傷脊髄への治療用 siRNA の導入と運動機能の改善	159
4.5 まとめ	160
参考文献, 図表	161
第5章 光ファイバ式遺伝子導入デバイスの開発とその特性評価	181
5.1 はじめに	182
5.2 ナノ秒パルスレーザーの光ファイバ伝送	183
5.2.1 実験方法	184
5.2.2 結果と考察	184
5.3 光ファイバ式遺伝子導入デバイスの開発と特性評価	185
5.3.1 実験方法	186

5.3.2 結果と考察	187
5.4 光ファイバ式遺伝子導入デバイスを用いた遺伝子導入実験	188
5.4.1 実験方法	188
5.4.1.1 ラット皮膚への遺伝子導入実験	188
5.4.1.2 健常ラット脊髄への遺伝子導入実験	189
5.4.2 結果と考察	190
5.5 まとめ	191
参考文献, 図表	193
第6章 結論	209
6.1 はじめに	210
6.2 レーザ誘起応力波の発生と生体内伝搬(第2章)	211
6.3 レーザ誘起応力波による健常ラット脊髄への部位選択的遺伝子導入(第3章)	211
6.4 レーザ誘起応力波を用いた siRNA 導入による 脊髄損傷モデルラットの運動機能改善(第4章)	211
6.5 光ファイバ式遺伝子導入デバイスの開発とその特性評価(第5章)	212
6.6 総括	213
6.7 展望	213
謝辞	216
著者文献目録	218

第 1 章

序論

1.1 はじめに

「成体哺乳類の中樞神経系は，自己再生・自己修復の能力を失っているため，一度損傷を受けると二度と再生しない．この辛辣な宣告を覆すことができるのであれば，それは将来の科学に他ならない．」これは，20世紀初頭にスペインの神経解剖学者 Cajal (1906年，神経系の構造研究に対してノーベル生理学・医学賞を受賞)が，その著書“*Degeneration and Regeneration of the Nervous System*”の中に記した有名な言葉である[1]．損傷した中樞神経系が再生しないという概念は，以後70年余りにわたり，科学者，医師のみならず一般人も含めて“常識”として受け入れられてきた．しかし，ここ30年ほどの研究成果は，まさにこの通説を覆し，哺乳動物において機能学的な意義をもった中樞神経系の再生が可能であることを明らかにした．ここでの「再生」とは，神経軸索の再伸長と成熟神経細胞の分裂増殖を意味している．

中樞神経系の一つである脊髄の外傷性損傷においても，効果的に神経路を再生するための様々な治療法が研究されている．現在までに確立された治療技術はないものの，有望な治療法の一つに遺伝子治療が挙げられる．この遺伝子治療の根幹技術となる遺伝子導入技術には，再生能の乏しい神経組織を対象とすることから，他組織に比して特に高い安全性，精密性，および時間的制御性が求められる．それに加えて，脊髄は管状の椎骨で囲まれた神経組織であるために，生体深部まで治療遺伝子を導入できる技術が必要である．しかし，これらの技術的課題を解決する手法はこれまでに実現されていない．

本章では，本研究が目指す脊髄損傷の治療について，最初に最近の研究動向をまとめる．そして，その治療法の一つの遺伝子治療について概説した後，遺伝子導入技術に関する研究動向を述べる．ここで技術的な課題を明確にした上で，本論文で取り上げるレーザ誘起応力波を用いた脊髄組織への遺伝子導入技術の位置づけを示し，最後に本研究の目的と意義を示す．

1.2 脊髄損傷

脊髄損傷は，交通事故，高所転落，スポーツ外傷などに伴って脊柱(背骨)に強い外力(多くは背側からの外力)が加わり，その中に存在する脊髄実質が損傷する病態である．脊髄が損傷を受けると，損傷部より下位に存在する運動・知覚・自律神経系に麻痺を生ずるため，損傷部位が脳に近い位置であるほど障害は重度となる．日本における外傷性脊髄損傷の発生頻度は欧米とほぼ同等であり，毎年新たな受傷者はおよそ5000人(人口100万人あたり

40.7 人[2])にのぼる。そして現在、日本には推定 10 万人の脊髄損傷患者がいるとされる。日本における脊髄損傷の疫学データ[3-5]を見ると、受傷時年齢が 20～25 歳と 55～60 歳にピークのある二峰性の特徴がある(Fig. 1-1)。60 歳前後で受傷が多くなっている原因は、高齢者が相対的に増加していることと、加齢に伴う脊椎管の狭窄が生じ、軽度の打撃でも比較的簡単に脊髄損傷を起こしやすいことが挙げられる。若年層の受傷頻度が高いのは、他国と同様で、交通事故、労働災害事故、およびスポーツ事故が若年者に多いためである。米国脊髄損傷統計センター(National Spinal Cord Injury Statistical Center, NSCISC)のデータベース[6]によれば、2011 年の米国の脊髄損傷受傷者全体の 49.9%は 16 歳から 30 歳の間である(Fig. 1-2)。米国の場合、若年者にスポーツ事故、交通事故、および労働災害事故が特に多く、さらに銃外傷による脊髄損傷も加わるためにこうした特徴が見られる。いずれにせよ脊髄損傷の受傷者は 20 代前半の若年層に多く、長年にわたる麻痺による日常生活の不自由と精神的負担を余儀なくされている。

脊髄損傷が起こると、損傷部の神経組織は直接挫傷によって出血性の壊死が生じる(一次損傷)。さらに損傷部に生じた炎症がその周辺に波及し、一次損傷により壊死した組織の周囲の細胞までもが壊死とアポトーシスで失われる(二次損傷)。やがて炎症の沈静化とともに、増殖および肥大化したアストロサイト(グリア)が瘢痕を形成し、その中心部は空洞状となる(Fig. 1-3)。このように、損傷脊髄では様々な現象が時間の経過とともに生じている。現在までに考えられている治療方法を次節 1.3 で説明する。

1.3 脊髄損傷の治療方法

脊髄損傷によって対麻痺(両下肢のみの運動麻痺)と四肢麻痺が起こるとの記述は、古代エジプトのパピルス文書にまで遡る。人類が誕生して以来、その活動に伴って外傷性脊髄損傷は不可避免的に起こり続けており、その悲劇的な病状の救済は古くから人々の切実な関心事であった。そのため、「哺乳動物の中樞神経系が再生するか」という問題に対し、長年にわたり盛んに研究がなされてきた。

中枢神経細胞には断裂した軸索を再び伸ばす能力がないという概念は、1981 年の Aguayo らの実験[7]によって覆された。彼らは切断されたラット脊髄に末梢神経片を移植し、そこに中枢神経軸索が伸びてくることを、トレーサーの順行性標識(神経細胞体から標識し、終末部への色素の輸送を観察)と逆行性標識(軸索末端から標識し、細胞体への色素の輸送を観察)により確認した。それ以降、神経細胞を取り巻く環境を整えることで軸索は再生するという考えが急速に広まった。1990 年に Schwab らが発表した論文の中で、中枢神経の

髓鞘(ミエリン)とオリゴデントロサイトに神経突起の伸長を抑制する因子(後に Nogo と名付けられたタンパク質)が存在し、その因子の抗体による中和化で軸索再生が導かれることを報告し注目を集めた[8, 9]. 再生不能説から再生可能説へのパラダイムシフトが起きたのはこの時期である. 特に 1996 年, 米国科学誌 *Science* に脊髄再生の展望が掲載され, 「ヒトの脊髄損傷の効果的な再生治療の可能性は, もはや憶測ではなく現実的な目標になった」と主張されたことはその象徴である[10].

現在考えられている脊髄損傷の治療法は大きく 3 つに分類される[11]. 1 つ目は神経保護, 2 つ目は細胞補充, 3 つ目は軸索再生である(Fig. 1-4). これらの治療法を補完する療法としては, 神経回路を再編するためのリハビリテーションがある. 既に, 脊髄損傷ラットとネコに対するトレッドミル機器を用いて, 下肢運動機能の回復が見られたとする研究報告[12, 13], および脊髄損傷患者に対しても体重支持型の動力補助付きトレッドミルまたは持続的な電気刺激により機能回復をもたらしたとする報告もされている[14, 15]. こうした受動的な関節可動域訓練と機能的電気刺激(functional electrical stimulation, FES)は, 脊髄損傷の集学的治療(専門医別の縦割り治療ではなく各専門医が協力して治療する治療方針)の中で重要な位置づけにある. 次に, 上記の 3 つの治療法を詳説する.

1.3.1 神経保護

脊髄の直接的な損傷に引き続いて起こる遅発性の炎症は, 神経細胞のアポトーシス(apoptosis, 能動的細胞死)を誘起する. 「神経保護」は, 二次損傷に伴う神経細胞のアポトーシスを軽減するためにステロイド系の抗炎症薬を損傷後早期に大量投与する治療法が代表であり, 既に臨床応用されている[16]. その作用機序は必ずしも明らかではないが, 一般にはフリーラジカルによって引き起こされる脂質過酸化と, それに牽引された炎症反応を抑制することでアポトーシスを防ぐと考えられている. しかし, その反面, 副腎不全あるいは血糖上昇をはじめとする多くの深刻な副作用を生じることが知られている. ステロイド剤の投与以外にも, 興奮性アミノ酸受容体の阻害剤や, アポトーシス細胞内におけるシグナル伝達の阻害剤の投与などの研究が精力的に行われているが[17], これらはまだ臨床応用には至っていない. その理由として, 薬物治療には不可避的な問題である, 損傷脊髄内における薬剤の動態制御の困難性とそれら薬剤の潜在的副作用が挙げられる.

1.3.2 細胞補充

「細胞補充」は、失われた組織を補填するために神経細胞を移植、あるいは分化能を持った神経幹細胞を損傷部に移植し分化制御する神経再生である。胚性幹細胞(embryonic stem cells, ES 細胞)と人工多能性幹細胞(induced pluripotent stem cells, iPS 細胞)の作製以来、脊髄損傷を含めた中枢神経疾患に対する有望な治療法として、神経幹細胞の移植による再生医学は大きな注目を集めている[18-21]。神経幹細胞は、自己複製能と多分化能の特徴を併せ持つことが知られているため[22]、移植細胞を十分に確保できる利点がある。マウス ES 細胞を用いて神経細胞へと誘導する方法はこれまで広く研究されており[23]、ES 細胞由来の神経幹細胞と神経前駆細胞は期待を集める移植細胞源と言える。ES 細胞移植による脊髄損傷への有効性については、これまでに 1999 年に McDonald らがマウス ES 細胞を胚様体へと誘導し、ラット脊髄損傷モデルに移植し、良好な機能回復を報告している[24]。また、2005 年に Keirstead らはヒト ES 細胞から高純度のオリゴデントロサイト前駆細胞へと効率的に誘導し、それをラット脊髄損傷モデルに移植し、脱髄した軸索の再髄鞘化と後肢機能改善を報告している[25]。しかし、ES 細胞の作製には不妊治療の余剰胚を用いるため、倫理的な問題は避けられない。さらに、ES 細胞の場合、通常他人の細胞を移植する同種移植となるため、免疫学的拒絶反応の問題、腫瘍化のリスクなど、解決しなければならない問題は極めて多い。その点、iPS 細胞および成体幹細胞である神経堤細胞(ニューロンとグリアへの分化能力を保持する前駆細胞の一つ)は自家組織からの採取が可能であるため、安全性が高く、倫理的・免疫学的問題を克服できる可能性は高い。2006 年、Yamanaka らが、レトロウイルスを使ったマウス線維芽細胞への 4 種(Oct3/4, Sox2, Klf4, c-Myc)の遺伝子導入による iPS 細胞作製[26]を発表して以降、脊髄損傷に対する iPS 細胞由来神経幹細胞移植の共同研究を慶應義塾大学と京都大学が開始している。2010 年、Tsuji らは外傷性脊髄損傷モデルマウスを対象として、損傷後亜急性期とされている 9 日目[27, 28]に胎児由来 iPS 細胞を移植し、コントロール群に比して有意な下肢運動機能改善を得た[29]。さらに、2011 年にはヒト iPS 細胞から分化誘導した神経幹細胞を免疫不全の脊髄損傷モデルマウスに移植し、顕著な下肢運動機能改善の結果が得られている[30]。こうした幹細胞移植による脊髄損傷治療研究が精力的に進められる一方で、幹細胞の分化制御をはじめ、調整方法の違いによる移植後の性質変化(移植細胞による腫瘍化の問題は iPS 細胞研究でも多く指摘されている[31-34])、神経再生に必要となる移植細胞数、最適な移植時期が明らかになっていないことなど[35]、動物実験レベルでも未解決な課題が数多く残されているのが現状である。

1.3.3 軸索再生

「軸索再生」は、神経細胞体の軸索伸長力を促進、またはその阻害因子を抑制することによる神経軸索の再生を目的とする。近年の研究によれば、神経細胞自身は軸索再生能力を保持しているにもかかわらず、軸索周囲の細胞が産生する軸索再生阻害因子がその再生を妨げていることが明らかになっている(Fig. 1-5)。軸索再生の促進に必要な条件は、次の3つに分類できる。

- (1) 軸索断端周囲への神経成長因子および神経栄養因子の分布
- (2) 軸索伸長を阻害する生理活性物質の抑制
- (3) 神経軸索伸長に対する物理的障壁の低減

(1)に関してこれまで報告されているのは、神経成長因子(nerve growth factor, NGF)[36, 37], 脳由来神経栄養因子(brain-derived neurotrophic factor, BDNF)[38-40], ニューロトロフィン-3(neurotrophin-3, NT-3)[41, 42], グリア細胞由来神経栄養因子(glial cell line-derived neurotrophic factor, GDNF)[43, 44], 血管内皮細胞増殖因子(vascular endothelial growth factor, VEGF) [45], および肝細胞増殖因子(hepatocyte growth factor, HGF)[46]が挙げられる。また、それらの因子の直接的な発現ではないが、神経成長因子受容体の下流に位置する軸索伸長シグナルを活性化して軸索再生を促す研究事例[47]もある。BDNF と NT-3 は中枢神経に対する活性が強いため、動物実験レベルにおいてこれら因子の局所投与だけでも軸索伸長が促進されるが、持続的な神経再生の促進には、少なくとも数日から数週間以上の長期的な神経成長因子および神経栄養因子の作用が必要となる。

軸索伸長の障害物としてよく知られているのは、損傷により活性化されたグリアが集積して形成されるグリア瘢痕(glial scar)である。グリア瘢痕の構成物には、軸索の先端(growth cone)に作用し成長を停止させる生理活性を持つ物質がある。これらを抑制する方法が(2)である。神経突起の伸長抑制因子として最も注目されているのが2000年に同定されたNogoであり[48-50], この生理活性を特異的抗体の投与によって中和することで軸索伸長が改善されることが知られている[51]。現在までに、軸索周囲を取り巻くミエリンに発現している Nogo[52], MAG (myelin associated glycoprotein)[53-55], OMgp (oligodendrocyte myelin glycoprotein)[56, 57]という 3 つの糖タンパク質が中枢神経の軸索再生を抑制することがわかっている。

(3)の物理的障壁とはグリア瘢痕のことである。脊髄損傷後に発現する活性化アストロサイトによるグリア瘢痕形成が軸索伸長を阻害するという事は 1980 年代から知られている[58]。近年の研究成果により、グリア瘢痕を形成する細胞外基質のコンドロイチン硫酸

プロテオグリカン(chondroitin sulfate proteoglycans, CSPG), セマフォリン 3A などが同定され, その阻害による神経再生の報告が相次いでいる. その中でも, 2002 年に Bradbury らが CSPG のグリコサミノグリカン鎖を除去する酵素であるコンドロイチナーゼ ABC を, ラット脊髄損傷モデルの髄腔内に持続注入し, 前肢由来の上行性軸索および下行性皮質脊髄路の軸索再生が促進され, 歩行運動機能が顕著に回復することを示したことは有名である [59]. 2004 年には, Okano らの研究グループが, グリア瘢痕形成に寄与する Interleukin-6 (IL-6) の受容体に対する抗体を脊髄損傷モデルマウスに投与することで機能学的な回復が見られたと報告している [60]. さらに 2006 年には, 同グループがセマフォリン 3A の阻害剤による損傷脊髄の再生誘導を報告している [61]. 一方, 2003 年アストロサイトの細胞骨格タンパク質であるグリア線維酸性タンパク質(glial fibrillary acidic protein, GFAP)と vimentin を欠損したマウスで脊髄損傷後の神経再生が促進されたという報告があり, グリア瘢痕抑制の別のアプローチとして注目を集めている [62]. 2009 年には Desclaux らが, ニューロンとグリアの共培養中において GFAP と vimentin の発現を抑制する siRNA (small interfering RNA) を活性化アストロサイトに導入し, 神経突起の伸長が有意に促進できることを示した [63]. さらに 2011 年には, Toyooka らにより, 脊髄損傷モデルラットを対象に GFAP と vimentin の発現を抑制する siRNA 溶液の注入で, 脊髄損傷に起因する神経因性膀胱(神経性の損傷が原因の膀胱機能障害)を防げることが報告されている [64].

こうした事例に見られるように, 神経細胞の軸索伸長を促進, または軸索伸展の阻害因子を抑制することは効果的な脊髄損傷治療につながる. ただし, 上述したように, 軸索再生に効果を持つ因子を直接投与するだけでは組織内での拡散が限定的であり, 持続的な効果が望めないのが難点である. また, 直接投与では部位標的性がなく, 標的細胞以外の副作用も懸念される. この問題を解決する有力な方法として, 遺伝子導入によって安定で継続的な特定因子の発現が可能であると考えられている [65, 66]. しかし, あらゆるタンパク質またはサイトカインの発現遺伝子を用いた研究結果が報告されているものの [67], 脊髄損傷後の外来遺伝子導入で機能学的な回復を得たという報告例 [68-73] は全体数に比して極めて少ない. その原因として, 神経組織の脆弱性と血液脳脊髄液関門(血液と脳脊髄液の間の物質交換を制御する機構)に代表される防御機能から, 安全かつ効率的に, そして損傷部位だけに治療目的の因子を発現させる技術が確立していないことが挙げられる.

1.4 遺伝子治療と遺伝子導入技術

遺伝子治療は, 細胞内に外因性の遺伝子を導入し, 疾患治療に関わる遺伝子を補充, あ

るいは導入遺伝子によって異常を来すタンパク質の発現を抑制する治療法である。脊髄損傷を受傷後、神経細胞の軸索伸長を促進、または軸索再生の阻害因子を抑制するためにこの遺伝子治療を施せば効果的な脊髄損傷の治療が期待できる。

正式に認可された世界初の遺伝子治療は、1990年にアメリカ国立衛生研究所(National Institutes of Health, NIH)で行われた、ADA (adenosine deaminase)欠損症の4歳の患者に対するものであった。ADA欠損症は、リンパ球にADAと呼ばれる酵素がないために重症の免疫不全を起こす病気で、感染症による致死率が極めて高い。当時は、患者から採取した末梢血からT細胞を単離して培養し、レトロウイルスを使って正常なADA遺伝子をT細胞内に導入し体内に戻す遺伝子治療を行った。この治療が高い効果をもたらしたことから、以後、欠損・変異遺伝子だけでなく、免疫強化または異常細胞のアポトーシス誘導、細胞増殖制御などを目的とした研究も進められ、治療対象となる疾患は年々増加している[74](Fig. 1-6)。臨床試験の64.7%はガンを対象としているが、心血管疾患、感染症、神経疾患など、その対象となる疾患は多岐にわたっている。2011年までに1700例を越える臨床研究が世界で展開されており、日本単独では19例が実施されている[74]。遺伝子治療は特に米国を中心に臨床研究が行われており、2011年までの承認数は米国だけで1100例にも及ぶ。しかし、世界全体の臨床試験のうち、遺伝子治療の毒性と安全性の評価である第I相研究が60%を占め、治療効果の評価を含む第II相以降は少ない。その大きな理由は、遺伝子治療に不可欠である、安全で高効率な細胞内への遺伝子導入技術が確立されていないためである。臨床試験の場合、特に高い安全性が求められることは言うまでもない。

これまでに多くの遺伝子導入法が研究されており、ベクターと呼ばれる細胞内への外因性遺伝子の運び屋として、ウイルスあるいはプラスミドDNAが用いられる。プラスミドDNAはウイルスと比較すると免疫原性と病原性が低いので安全性は高いものの、それ単独では導入効率が低い。それ故、細胞内に効率よく導入するための化学的修飾、および物理エネルギーを利用した遺伝子導入法が開発されている[75-79] (Fig. 1-7)。遺伝子導入技術として、ウイルスベクター法、化学的手法、および物理的手法について以下に概説する。

1.4.1 ウイルスベクター法

ウイルスベクター法は、導入したい遺伝子をレトロウイルスやアデノウイルスなどのゲノムに組み込み、その感染能力を利用して遺伝子導入を行う手法である[80-82]。細胞表面に存在する特異的な受容体を介して細胞に感染するため、効率よく遺伝子を導入できる。2012年6月までに日本で承認された遺伝子治療の臨床研究は30例あるが、そのうちの23

例と最も使用されているのがこのウイルスベクター法である[83]. しかし, ウイルスベクターを用いた臨床試験においては, 深刻な副作用が報告されている. 1999年, 米国ペンシルバニア大学の Wilson らのグループによって行われた, アデノウイルスベクターを用いた OTC (ornithine transcarbamylase)欠損症に対する臨床研究において, 18歳の男性患者が心肺肝不全によりベクター投与の4日後に死亡した[84, 85]. 冠動脈内へのアデノウイルスベクター投与により IL-6 などのサイトカインが上昇し死亡に至った. 患者の臓器を調べると, マウスではほとんどが肝臓に集積していたアデノウイルスベクターが, 肝臓だけではなくリンパ節, 脾臓, 骨髄などの他臓器にも検出された. さらに, 1999年からフランス, 続いてイギリスで行われた X 連鎖重症複合免疫不全症 (X-linked severe combined immunodeficiency diseases, X-SCID)患者に対するレトロウイルスベクターを用いた遺伝子治療でも重大な副作用が報告されている[86-89]. 両国で治療を受けた患者 20名のうち, フランスで4名, イギリスで1名が T リンパ性白血病を発症し, 1名が死亡している. 2002年に発症した2例では, 患者の染色体中の原ガン遺伝子(LIM domain only-2, LMO-2)の近傍にレトロウイルスが組み込まれ, その異常活性化がガン化を引き起こした[90]. ウイルスベクター法は, その高い導入効率から多くの臨床試験で用いられているが, 安全性には大きな問題が残っている. そのため, 2000年以降では, 特にウイルスベクターと比較して大量生産および品質維持が容易なプラスミドベクターを用いた遺伝子導入法が注目を集め[91, 92], 急速に研究が進められている.

1.4.2 化学的手法

化学的手法として, リン酸カルシウム, カチオン性ポリマー, およびカチオン性脂質を用いる方法が挙げられる[93-95]. どの方法も導入機序は同じで, 負に帯電した核酸(DNAまたは RNA)と, リン酸カルシウムあるいはカチオン性物質が正電荷をもつ複合体を形成し, 負に帯電している細胞膜に付着することで, 細胞のエンドサイトーシス(貪食作用)によって遺伝子が細胞内に取り込まれるというものである. 最も歴史が長いのはリン酸カルシウム法であり, 1973年に Graham と van der Eb が提唱し[96], その後 Wigler らが発展させた[97]. 核酸とリン酸カルシウムから形成された微細粒子を用いるが, リン酸カルシウム粒子が凝集しやすいことおよび手技が複雑なことが欠点として挙げられる. カチオン性ポリマー, およびカチオン性脂質を用いた遺伝子導入法は, それぞれ Wu らと Felgner らによって1987年に考案された[98, 99]. 現在市販されているおよそ 60種類の遺伝子導入試薬の中で, 半数以上がこのカチオン性試薬である[100]. カチオン性ポリマーの中では, 導入

効率の高さからポリエチレンイミン(polyethyleneimine, PEI)[101, 102]が核酸のキャリア(担体)としてよく用いられている。一方、カチオン性脂質として最も広く用いられているのはリポソームである。リポソームとは、生体の細胞膜を構成しているリン脂質が形成する人工的な小胞である。リポソームを用いた遺伝子導入法はリポフェクションと呼ばれ、これを応用した導入試薬として、既に Lipofectin[®] (Invitrogen), Lipofecamin[®] (Invitrogen), FuGENE[®] (Promega)などが製品化されている[103]。

一般に、これら化学的手法の導入効率は核酸と正電荷型ベクターの混合比、複合体を取り巻く溶液の pH 値、温度、細胞膜の状態などに大きく左右されることから[94]、培養細胞での遺伝子導入には適しているが、細胞外環境を一定に維持するのが難しい生体組織内では、その効率が低く実用的でないと考えられている[104]。また、導入効率の細胞種依存性が大きいこと、キャリアの生体内拡散による非標的細胞への導入による副作用の懸念、およびキャリアそのものの細胞毒性が指摘されている[100]。

1.4.3 物理的手法

近年、安全性の高さと取り扱いの簡便さから、キャリアを用いないプラスミド DNA の直接導入(Naked DNA 法)が注目を集めている。2011年までに世界で臨床応用されている遺伝子治療のうち、アデノウイルス(23.2%)、レトロウイルス(20.3%)に次いで多いのが、この Naked DNA 法(18.5%)である[74]。この方法が初めて報告されたのは1990年で、Wolffらは、1 µg/ml のプラスミド DNA を20%スクロースまたはリン酸緩衝生理食塩水とともにマウス骨格筋に直接注入するだけで遺伝子発現を得た[105]。プラスミド DNA は培養細胞に接触させてもほとんど取り込まれないが、生体組織の場合、骨格筋、心筋、皮膚、肝臓、および甲状腺への直接注入によって遺伝子発現が得られている[106-112]。その導入機序は、組織内細胞にプラスミド DNA に非特異的なレセプターが存在し、それに結合した遺伝子が組織圧力によって細胞内に押し込まれると考えられている[113]。しかし、プラスミド DNA の直接投与だけでは生体内の核酸分解酵素と単核食細胞系の働きにより導入効率は低く[114, 115]、かつ適用可能な組織も限られるため、物理刺激または物理エネルギーの併用による遺伝子導入効率の向上および発現を増強する試みが行われている[116-118]。

これまでに報告された物理的手法として、マイクロインジェクション、遺伝子銃、エレクトロポレーション(電気穿孔法)、超音波遺伝子導入法(ソノポレーション)、レーザー直接照射法、マグネトフェクション、およびハイドロダイナミクス法がある。Table 1-1 にそれぞれの遺伝子導入法の特徴をまとめた[78, 103, 117]。後述するように、これら物理的手法の中

で、脊髄を対象とした遺伝子導入では 2002 年以降にエレクトロポレーション[119-121], 2005 年以降に超音波遺伝子導入法[122, 123]を用いた研究成果が報告されている。

1.4.3.1 エレクトロポレーション

エレクトロポレーション(electroporation)は、高電圧パルスを用いて遺伝子を細胞内に導入する方法である[124-126]。培養細胞の場合は細胞懸濁液に、生体組織の場合は導入標的部位に電圧が印加するように電極を装着する。電極はニードル型、ピンセット(プレート)型が一般的で、電極間隔は数 mm であるが、単一細胞を対象にキャピラリー型のエレクトロポレーション装置も知られている。生体組織を対象としたとき、典型的には 200 V/cm 以上の電界をパルス幅 1~50 ms, 周波数 1 Hz 程度で数秒間作用させる。物理的手法の中では比較的歴史が長く、1982 年、Neumann らが培養マウス L 細胞を対象に遺伝子導入を初めて報告した[127]。それ以来、皮膚、腎臓、肺、肝臓、骨格筋、心筋、脊髄、脳、角膜などの多種の組織を対象とした遺伝子導入がこれまでに報告されている[116, 128-130]。エレクトロポレーションによる遺伝子導入の機序は次の通りである[131-134]。まず細胞を含む溶液に電気パルスを印加すると細胞内外の膜電位差が変化し、負に帯電したプラスミド DNA が細胞膜に集積する。そして一定の閾値(電圧またはパルス幅)を越えた電界が印加されると、脂質二重層を破壊し、数十ミリ秒の間だけ直径 20~120 nm 程度の小孔が一時的に形成され、周囲のプラスミド DNA が細胞内に取り込まれるというものである(Fig. 1-8)。1990 年、Chang らが、エレクトロポレーションによってヒト赤血球の細胞膜に形成された小孔を電子顕微鏡で観察できたことを初めて報告している[135]。

エレクトロポレーションによる遺伝子導入効率、電圧、パルス幅、温度、細胞種、DNA 濃度などに依存する。例えば、ラット脊髄への遺伝子導入では電圧 200 V, パルス幅 50~75 ms, 5 パルスの条件が用いられている[119-121]。現在、Gene Pulser XcellTM (Bio-Rad), ECM830 (BTX), NucleofectorTM (Amaza Biosystems)などの装置が市販されている。エレクトロポレーションは手技が簡便で、安価な装置では概ね数十万円からと比較的低コストではあるが、熱発生による組織損傷や、生体内での電界の空間制御の困難さなどの問題点がある。2000 年に報告されたエレクトロポレーションによるラット脳室壁への遺伝子導入では、高電圧の電気パルスで周辺神経組織の不可逆的な組織変性が生じてしまうため、神経再生治療には本方法が不向きであると報告されている[136]。また *in vivo* において、多くの場合は体内に直接電極を差し込む必要があり侵襲的である。先に挙げたラット脊髄への遺伝子導入[119-121]においても、電極カテーテルを髄腔内に挿入しており、容易に組織損傷を生じる

恐れがあるため安全性に問題がある。

1.4.3.2 超音波遺伝子導入法

超音波を用いた遺伝子導入法は、Fechheimer らによって 1987 年初めて報告された[137]。1990 年までに報告された研究事例[137-139]では、照射時間は数秒から数十分まで様々であるが、比較的高いパワー(~100 W)で低周波数(20 ~ 50 kHz)の超音波が用いられていたことから、キャビテーションが遺伝子導入プロセスに寄与しているとされた[140]。液体中に縦波を伝搬させると、波の進行方向に周期的な密度勾配が生じ高圧域と低圧域が発生する。液中に溶解した微小気泡を核として、気泡が圧力の変動に伴い成長し、その後急速に圧壊する。この空洞現象をキャビテーションと呼ぶ。キャビテーションの発生は超音波の周波数に依存し、その発生に必要な音波の最低強度は周波数の増大に伴って指数関数的に増大する。周波数は気泡を形成するための直接的な条件にはならないが、気泡の形成する音圧を越えたときに、低周波数の方が負圧を長い間保って気泡が生成しやすい環境を維持するためである。気泡が圧壊するとき、エレクトロポレーションと同様に細胞膜に小孔が形成され、細胞膜付近にある遺伝子が細胞内へ取り込まれる。キャビテーションは組織損傷も誘起するが、周波数 20 ~ 50 kHz の低周波数の超音波では前述の理由によりキャビテーションを発生しやすく[141, 142]、遺伝子導入時の侵襲性が高いことが問題視されていた。一方、1996 年、Kim らが周波数 1 ~ 3 MHz、強度 0.5 ~ 2.5 W/cm² の超音波照射でも、細胞周囲のプラスミド DNA 濃度を高めることで数%の導入効率は達成できることを示した[143]。

超音波遺伝子導入法が特に注目を集めるようになったのは、導入効率を上げるために、直径 1 ~ 10 μm のマイクロバブルでキャビテーションを発生させる方法が提案された 1998 年以降である[144-147]。さらにこれによって、超音波とマイクロバブルの標的化による低侵襲性が達成されるようになった。キャビテーションが発生するとき、周囲に高速の液体マイクロジェット流(最大速度はおおよそ 700 m/s とされる)が発生して細胞膜に衝突し、小孔を形成する(Fig. 1-9, 1-10) [148-152]。そのため、マイクロバブルのごく近傍でのみ効率的な遺伝子導入が達成できるようになった。2011 年に Nejad らによるヒト単球系培養細胞(U937)への超音波照射時(周波数 0.834 MHz、音圧(振幅) 0.07 ~ 0.12 MPa)の高速度カメラ撮影の実験結果では、細胞膜に形成された小孔の開孔時間は約 20 ms であったとしている[153]。

導入効率は超音波の強度、周波数、デューティ比(duty cycle)、照射時間、併用する超音波造影剤の特性などに依存するが、他の物理的遺伝子導入法と比較して、導入効率のばらつきが大きい。さらに、2005 年以降に報告がされた超音波遺伝子導入法によるラット脊髄

への遺伝子導入では[122, 123], 遺伝子発現を得るためのマイクロバブルを使用することで, マイクロバブルが分布する脊髄表層の髄膜細胞に遺伝子発現細胞が局限してしまうという問題がある(Fig. 1-11). 脊髄損傷の遺伝子治療では, 脊髄実質内での遺伝子発現が必要となるため, 現状では本手法による遺伝子治療の実現は難しいと考えられる.

1.5 レーザを用いた遺伝子導入技術

レーザーを用いた遺伝子導入法は 1980 年代から報告された. 空間制御性が高い, 非接触での応用が可能, および光ファイバと組み合わせた経カテーテル的応用が可能である利点から注目を集めている[154, 155]. 最初の報告は 1984 年で, Tsukakoshi らが細胞膜のレーザーアブレーションにより遺伝子を導入した[156]. その後, 1980 年代はレーザーを細胞に直接照射する方法が主流であったが, 生体深部への応用を視野に入れ, 1990 年代以降は多様な方法が報告されるようになった. Table 1-2 にこれまでに報告されているレーザーおよび光を用いた各種遺伝子導入法をまとめた[154]. その多くはレポーター遺伝子を対象としたものである. レポーター遺伝子は, 導入されて発現すると染色性, 蛍光および化学発光を生じるタンパク質を産生する遺伝子で, 遺伝子導入の有無あるいはその発現量を調べるために用いられるが, 治療効果は持たない. 代表的なものにルシフェラーゼ, β -ガラクトシダーゼ, 緑色蛍光タンパク質(green fluorescent protein, GFP)などをコードした遺伝子が挙げられる. 次に, レーザ直接照射法と, レーザで誘起される応力波を用いる方法を説明する.

1.5.1 レーザ直接照射法

集光したパルスレーザーを細胞膜に照射し, アブレーションによって小孔を形成することで, 細胞周囲に存在する外来遺伝子を拡散により細胞内に導入できる. 1984 年, Tsukakoshi らは, 正常ラット腎臓細胞の細胞膜に顕微鏡下で Q スイッチ・Nd:YAG レーザ(パルス幅 5 ns)の第 3 次高調波(波長 355 nm)を単一パルス照射することで, 直径数 μm の小孔を形成し, 外来遺伝子の発現を得た[156]. エレクトロポレーションおよび超音波遺伝子導入法で確認されている小孔と同様に, 細胞膜の脂質二重層の性質から, 形成された小孔は数秒で閉じることが確認された. この単一細胞へのレーザー照射による遺伝子導入法は *optoinjection* と呼ばれる(Fig. 1-12). 特定の細胞に遺伝子を導入する方法としては, 針でプラスミド DNA を直接注入する方法(マイクロインジェクション)があるが, 非接触で高速に導入できる *optoinjection* は注目され, 後にレーザーパルス走査の高速化および光ピンセットの併用の方法

が考案された[157-166]. 光源に紫外域のレーザー光(波長 355 nm または 405 nm)と波長 488 nm のアルゴンレーザーが多く用いられたのは、波長が短くビーム径を小さく集光しやすいこと、細胞の光吸収係数が高いことなどによる。ただし、波長 300 nm 以下になると核酸の光吸収が高く DNA の光障害が問題となるため、その利用は避けられた。

2000 年代に入り超短パルスレーザーを利用した細胞微細加工(ナノサージェリー)の研究が盛んになると、遺伝子導入への応用研究も進められた。ナノ秒紫外レーザーパルスよりも精密にかつ照射周囲への影響を少なく導入できるのが利点である。最初の報告は、2002 年の Tirlapur と König らによる[167]. 彼らは、波長 800 nm, 繰り返し周波数 80 MHz, ピーク光強度 10^{12} W/cm² のフェムト秒 Ti:sapphire レーザを用い、平均出力 50~100 mW のレーザー光を高開口数(numerical aperture, NA)の対物レンズで細胞膜上に集光して 16 ms 照射することで、チャイニーズハムスター卵巣(Chinese hamster ovary, CHO)細胞の細胞膜に小孔を形成した。これにより、細胞機能に影響なく、GFP をコードしたプラスミド DNA を 100%の効率で導入できたと報告している。このフェムト秒レーザーを利用した単一細胞内への分子送達法では、平均出力 50~225 mW の照射で、90%以上の細胞生存率を維持しつつ[167-172], 蛍光色素, プラスミド DNA, およびメッセンジャーRNA の細胞内導入が実証されている[173-176]. また、他にも、波長 1064 nm, パルス幅 17 ps の Nd:YAG レーザを用いた植物細胞(タバコ BY-2 細胞)への蛍光色素(propidium iodide)およびレポーター遺伝子の導入が 2008 年に報告されている[177].

複数の培養細胞を対象としたレーザー遺伝子導入法は、オプトポレーション(optoporation)と呼ばれる(Fig. 1-12). レーザ光を細胞培養液中の細胞から離れた位置に集光し、そこで生じた光学的絶縁破壊(laser-induced optical breakdown)に続く衝撃波(laser-induced shock wave)とキャビテーション(cavitation)によって遺伝子を導入する[178-181]. ここで、「衝撃波」は圧力、密度、速度が急激に変化するような不連続面を指し、音速を越えて伝搬する弾性波を表す。この方法では、単一パルス照射で複数の細胞内への分子送達が可能であるため、optoinjection と比べて単位時間あたりに処理できる細胞数(スループット)が大幅に増大する。しかし、音速を越えた衝撃波が細胞培養液中を伝搬するのは数十から数百 μm であり、細胞膜のごく近傍にレーザー光を集光する必要がある。そのため、集光位置の近傍に存在する細胞に容易にネクロシス(necrosis, 壊死)を誘起し安全性に問題がある[182-184]. さらに、パルス幅がナノ秒オーダーの場合には、照射部周囲への熱影響が生じ、細胞機能に影響を与える問題もある。

他にも近年では、色素およびナノ粒子を光吸収体として用い、細胞近傍のアブレーション、細胞膜の局所加熱[185-193], および光化学的反応[194-201]を引き起こして細胞内分子

送達に取り組む研究が相次いで報告されている。レーザの空間制御性の高さを活かし、いずれも培養細胞を対象として部位選択的、細胞選択的な遺伝子導入が実現されている。

レーザ直接照射法を用いた *in vivo* における遺伝子導入は、2003年に初めて報告された[202]。Zeiraらは、Ti:sapphireレーザ(波長780nm, パルス幅200fs, 繰り返し周波数76MHz)の出力ビームを50倍のNA=0.5の対物レンズで1 μ m以下の径に集光し、倒立型顕微鏡下でステージ上のマウスに照射した。ルシフェラーゼ発現遺伝子をコードしたプラスミドDNAを脛骨上方の筋組織に注入し、同部位の皮下焦点深さ2mmでレーザ光を走査させながら照射した。照射範囲95 μ m \times 95 μ m, 照射時間5秒の条件で、40日以上にわたり高いレベルのルシフェラーゼの発現が得られた。さらに、エリスロポエチン(赤血球生成促進因子)をコードしたプラスミドDNAの導入を試みたところ、8週間後においてヘマトクリット(血液中に占める赤血球の容積%)が約2割高くなったと報告した。さらに2007年、同グループはB型肝炎モデルマウスを対象にその抗原を発現するプラスミドDNAを同手法で皮膚組織に導入し、7ヶ月以上の高い免疫作用を得たと報告している[203]。また、2009年には本手法による遺伝子導入の効率を高めるため、ルシフェラーゼ発現遺伝子のマウス脛骨筋への導入実験によって、最適なレーザ強度と照射時間の検討がなされている[204]。

こうして、レーザ直接照射法による *in vivo* での遺伝子導入は細胞選択的に、かつ非接触に組織障害なく導入できる利点がある一方で、その多くが顕微鏡下での操作を必要とするため簡便とは言い難く、さらに生体組織の光吸収、散乱特性の高さから遺伝子導入が可能な部位がごく浅部(深くとも1~2mm程度)の組織に限られてしまうといった問題がある[205]。脊髄を遺伝子治療の対象としたとき、最終的な目標となるヒト脊髄の実質の太さは約10~15mmである。運動機能を司る神経軸索は脊髄の腹側を走行しているため、脊髄損傷後の運動機能改善を目標とすると組織深部(腹側)への遺伝子導入が必要とされるが、レーザの直接照射では脊髄表面からの適用で組織深部まで遺伝子導入をすることは難しい。

1.5.2 レーザ誘起応力波による遺伝子導入

より生体深部への適用が可能な方法としては、固体媒質にパルスレーザを照射したときに発生する応力波(Laser-induced stress wave, LISW, または Photomechanical wave, PMW)を用いた遺伝子導入法がある[206-217]。1990年以降、超音波遺伝子導入法の研究が進む一方で、より高強度の音波(衝撃波)で遺伝子および薬剤導入の作用がないかを調べる研究も進められた。固体媒質へのレーザパルス照射で発生する応力(stress)の伝搬は必ずしも超音速とは限らないため、この場合の圧力伝搬は、「衝撃波(shock wave)」よりも広義の意味で

の固体中の圧力伝搬を指す「応力波(stress wave)」という言葉を用いる。1992年, Gambihlerらが衝撃波結石破碎装置で発生させた圧力をマウス白血病細胞に作用させることで細胞膜の透過性が亢進すると報告した[218, 219]。それ以来, LISWでも同様の効果が得られることが多数報告されている[206-217, 220-238]。

1995年以降, 米国 Harvard Medical School の Doukas らの研究グループは, LISWによって数百 Da から数十 kDa までの低分子量薬剤を細胞内に導入できること, 圧力上昇速度, 圧力積分値といった LISW の物理的特性が細胞膜透過性の亢進に寄与することなどを実験的に示した(Fig. 1-13) [228, 230]。それらの報告によると, 圧力上昇速度および圧力の時間積分値が大きくなるに従い細胞内への外来分子輸送効率が上昇することを明らかにしている。また, Lin らは Q スイッチ・ルビーレーザー(波長 694.3 nm, パルス幅 28 ns, レーザフルエンス 53 J/cm²)をポリスチレン板に照射して LISW を発生させ, 末梢血液細胞に 72 kDa の FITC-デキストランを導入した。この研究の中で彼らは, LISW は細胞膜のみならず核膜の透過性も亢進できることを明らかにした[237]。LISW による細胞内分子送達の機序は未だ完全には明らかになっていないが, 瞬間的な圧力の作用で, 細胞膜を構成する脂質二重層に“可逆的な”構造変化を起こすことが近年の研究で明らかになっている(Fig. 1-14) [239, 240]。分子動力学シミュレーションとして, リン脂質である dipalmitoylphosphatidylcholine (DPPC)分子からなる細胞膜の周囲に水分子が存在する状態で, 一定領域内に分子密度が高くなったとき(圧力波パルスの作用時)を模擬し, 脂質二重層の疎水部に水分子が導入され, 細胞膜を貫く孔構造が自発的に形成されることが示されている。

細胞内への送達対象を遺伝子とした研究では, *in vitro* において 1995 年に Flotte らがサル腎臓由来細胞に LacZ 発現遺伝子の導入[220], また *in vivo* においては 2004 年に Ogura らがラット皮膚へのレポーター遺伝子の導入を最初に報告している(Fig. 1-15) [206]。その遺伝子発現領域はレーザーのスポット径とよく対応しており, 皮膚組織に対して空間選択的に遺伝子導入が可能であることが示された。また, Satoh らはカチオン性試薬(PEI)を併用することでマウス脳を対象に LISW を用いて GFP 発現遺伝子の導入を報告した[208]。導入部位として脳室壁, 海馬(歯状回)のいずれにおいても発現が見られ, 最大で約 3.5 mm の深度において遺伝子の発現を確認している。さらに 2007 年には, Terakawa らが臨床応用にも一部用いられている肝細胞増殖因子(HGF)遺伝子を *ex vivo* においてラット移植皮膚に導入し, 移植後の新生血管生成が促進されたことを報告した[212, 213]。これは, LISW を用いた遺伝子導入による最初の治療効果の実証である。

上述のように, 空間制御性の高さ, 深部適用性, 光ファイバ応用への期待など多くの利点があることから, LISW を用いた遺伝子導入に関する研究は近年急速に広がりを見せて

いる。しかし、動物を対象として *in vivo* で遺伝子導入が報告されている生体部位はラットの皮膚[206, 213, 215, 216], 顔面筋[217], マウス脳[208]に限定されている。遺伝子治療の研究が盛んになるとともに, LISW を用いた遺伝子治療が対象とする疾患も, レーザの特性を活かして経内視鏡的, 空間選択的な遺伝子治療が求められる疾患を中心としてさらに拡大すると考えられる。

1.6 本研究の目的と論文の構成

脊髄損傷の治療プロトコルの一つとして軸索再生が期待されるが, そのためには遺伝子導入による持続的な神経栄養因子の発現あるいは軸索伸長阻害因子の抑制が必要となる。上述した通り, 現在種々の遺伝子導入法が研究されており, 脊髄損傷に対する遺伝子治療の研究成果もまた数多く報告されている。しかし, 遺伝子導入効率, 安全性の面では技術的な問題が残されており, これらを解決する遺伝子導入法の確立が求められている。さらに, 遺伝子導入により産生されたタンパク質の生物活性が高い場合には, 標的細胞以外の遺伝子発現で副作用を引き起こす可能性がある。特に, 中枢神経系の遺伝子治療においては, 健常組織に影響を与えない空間選択的な遺伝子発現が求められる。それに加えて, 脊髄は椎骨で形成された管腔内にある神経組織であるために, 生体深部まで治療遺伝子を導入できる技術が必要とされる。

これらの技術的課題を解決するため, 本研究ではレーザを用いた遺伝子導入技術に着目した。レーザ光を使った遺伝子導入法は, エネルギーの空間的・時間的制御性が高いことに加え, 光ファイバによる導光で臨床現場での操作性に富む経カテーテル的遺伝子治療を実現できる潜在能力を備えている。中でも, LISW を用いた遺伝子導入法では一回の適用で遺伝子導入できる細胞数が多く, かつ応力波が光よりも散乱が少なく生体内を伝搬するため, 深部組織への適用が可能である。これは, 生体深部に位置する脊髄の遺伝子治療にとって魅力的な特性である。

本研究の目的は, LISW を用いた脊髄損傷の遺伝子治療である。それを実現するために, まず脊髄における LISW の伝搬特性を明らかにする。脊髄が生体深部に位置することを勘案すると, LISW 適用時の伝搬特性の調査は必要不可欠である。次に, これまで実証例のない LISW による脊髄への遺伝子導入を, 健常ラット脊髄を対象とした実験により実証し, その遺伝子発現特性を調査する。ここで得られた特性に基づき, LISW による遺伝子導入法を用いて脊髄内に治療遺伝子を導入し, 脊髄損傷によって破断した神経軸索再生の促進を試みる。さらにこの技術を臨床現場に適用する目的で, 光ファイバを用いた経カテーテ

ル的遺伝子導入デバイスの開発とその特性の評価を行う。

本論文の構成図を Figure 1-16 に示す。

第 2 章では、最初に LISW の発生および伝搬理論について述べる。そして、脊髄の模擬組織を用いて行った LISW の伝搬特性計測の結果を示し、脊髄への標的部位選択的な遺伝子導入を達成するために必要な圧力伝搬特性が得られていることを示す。

第 3 章では、健常ラットの脊髄組織を対象に行った、LISW によるレポーター遺伝子の導入結果について述べる。その遺伝子発現の特性から、発現効率のレーザーパラメータ依存性、発現部位の標的性、発現細胞種、さらに本遺伝子導入技術の安全性の評価を行う。

第 4 章では、脊髄損傷モデルラットを対象に、グリア瘢痕の形成を抑制する遺伝子を導入し、その運動機能の改善を評価する。グリア瘢痕形成の一端を担う中間径フィラメントタンパク質の抑制効果に加え、組織学的な評価を行い、遺伝子治療後の運動機能改善を多角的に検証した。

第 5 章は、LISW による脊髄損傷の遺伝子治療を臨床現場に適用するための光ファイバを用いた経カテーテル的遺伝子導入デバイスの開発の成果について述べる。

第 6 章は本研究の結論であり、得られた成果を総括するとともに、今後の展望を述べる。

なお、本研究において実施した動物実験は、全て防衛医科大学校実験動物倫理委員会の承認の下に実施された。

参考文献 第1章

- [1] S. Ramón y Cajal, *Degeneration and regeneration of the nervous system* (Oxford University Press, Oxford, 1928).
- [2] 新宮彦助, “脊髄損傷の予防,” 日本パラプレジア医学会雑誌 **13**(1), pp. 48-49 (2000).
- [3] H. Shingu, M. Ohama, T. Ikata, S. Katoh, T. Akatsu, “A nationwide epidemiological survey of spinal cord injuries in Japan from January 1990 to December 1992,” *Paraplegia* **33**(4), pp. 183-188 (1995).
- [4] 住田幹男, 徳弘昭博, 内田竜生, ほか編, *脊髄損傷の Outcome—日米のデータベースより—* (医歯薬出版, 2001).
- [5] 柴崎啓一, “全国脊髄損傷登録統計2002年1月～12月,” 日本脊髄障害医学会雑誌 **18**(1), pp. 271-274 (2005).
- [6] *The 2011 Annual Statistical Report for the Spinal Cord Injury Model Systems*, The National Spinal Cord Injury Statistical Center (2012).
- [7] S. David, A. J. Aguayo, “Axonal elongation into peripheral nervous system "bridges" after central nervous system injury in adult rats,” *Science* **214**(4523), pp. 931-933 (1981).
- [8] L. Schnell, M. E. Schwab, “Axonal regeneration in the rat spinal cord produced by an antibody against myelin-associated neurite growth inhibitors,” *Nature* **343**(6255), pp. 269-272 (1990).
- [9] B. S. Bregman, E. Kunkel-Bagden, L. Schnell, H. N. Dai, D. Gao, M. E. Schwab, “Recovery from spinal cord injury mediated by antibodies to neurite growth inhibitors,” *Nature* **378**(6556) pp. 498-501 (1995).
- [10] W. Young, “Spinal cord regeneration,” *Science* **273**(5274) p. 451 (1996).
- [11] 中村耕三, 三浦俊樹, 大堀靖夫, 荒居聖子, 星地亜都司, 田中栄, 緒方徹, 山本直哉, 山本真一, 中福雅人, “脊髄再生の試みと現状,” *リハビリテーション医学* **42**(1), pp. 45-49 (2005).
- [12] R. R. Roy, R. J. Talmadge, J. A. Hodgson, H. Zhong, K. M. Baldwin, V. R. Edgerton, “Training effects on soleus of cats spinal cord transected (T12-13) as adults,” *Muscle Nerve* **21**(1), pp. 63-71 (1998).
- [13] W. K. Timoszyk, R. D. De Leon, N. London, R. R. Roy, V. R. Edgerton, D. J. Reinkensmeyer, “The rat lumbosacral spinal cord adapts to robotic loading applied during stance,” *J. Neurophysiol.* **88**(6), pp. 3108-3117 (2002).
- [14] T. G. Hornby, D. H. Zemon, D. Campbell, “Robotic-assisted, body-weight-supported treadmill

training in individuals following motor incomplete spinal cord injury,” *Phys. Ther.* **85**(1), pp. 52-66 (2005).

- [15] H. Kern, S. Boncompagni, K. Rossini, W. Mayr, G. Fanò, M. E. Zanin, M. Podhorska-Okolow, F. Protasi, U. Carraro, “Long-term denervation in humans causes degeneration of both contractile and excitation-contraction coupling apparatus, which is reversible by functional electrical stimulation (FES): a role for myofiber regeneration?,” *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* **63**(9), pp. 919-931 (2004).
- [16] M. B. Bracken, M. J. Shepard, T. R. Holford, L. Leo-Summers, E. F. Aldrich, M. Fazl, M. Fehlings, D. L. Herr, P. W. Hitchon, L. F. Marshall, R. P. Nockels, V. Pascale, P. L. Perot, J. Piepmeyer, V. K. Sonntag, F. Wagner, J. E. Wilberger, H. R. Winn, W. Young, “Administration of methylprednisolone for 24 or 48 hours or tirilazad mesylate for 48 hours in the treatment of acute spinal cord injury,” *JAMA* **277**(20), pp. 1597-1604 (1997).
- [17] W. B. Jacobs, M. G. Fehlings, “The molecular basis of neural regeneration,” *Neurosurg.* **53**(4), pp. 943-948 (2003).
- [18] P. J. Horner, F. H. Gage, “Regenerating the damaged central nervous system,” *Nature* **407**(6807), pp. 963-970 (2000).
- [19] S. U. Kim, J. de Vellis, “Stem cell-based cell therapy in neurological diseases: a review,” *J. Neurosci. Res.* **87**(10), pp. 2183-2200 (2009).
- [20] V. Sahni, J. A. Kessler, “Stem cell therapies for spinal cord injury,” *Nat. Rev. Neurol.* **6**(7), pp. 363-372 (2010).
- [21] S. Gögel, M. Gubernator, S. L. Minger, “Progress and prospects: stem cells and neurological diseases,” *Gene Ther.* **18**(1), pp. 1-6 (2011).
- [22] A. Björklund, O. Lindvall, “Cell replacement therapies for central nervous system disorders,” *Nat. Neurosci.* **3**(6), pp. 537-544 (2000).
- [23] M. Bibel, J. Richter, K. Schrenk, K. L. Tucker, V. Staiger, M. Korte, M. Goetz, Y. A. Barde, “Differentiation of mouse embryonic stem cells into a defined neuronal lineage,” *Nat. Neurosci.* **7**(9), pp. 1003-1009 (2004).
- [24] J. W. McDonald, X. Z. Liu, Y. Qu, S. Liu, S. K. Mickey, D. Turetsky, D. I. Gottlieb, D. W. Choi, “Transplanted embryonic stem cells survive, differentiate and promote recovery in injured rat spinal cord,” *Nat. Med.* **5**(12), pp. 1410-1412 (1999).
- [25] H. S. Keirstead, G. Nistor, G. Bernal, M. Totoiu, F. Cloutier, K. Sharp, O. Steward, “Human embryonic stem cell-derived oligodendrocyte progenitor cell transplants remyelinate and

- restore locomotion after spinal cord injury,” *J. Neurosci.* **25**(19), pp. 4694-4705 (2005).
- [26] K. Takahashi, S. Yamanaka, “Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors,” *Cell* **126**(4), pp. 663-676 (2006).
- [27] Y. Ogawa, K. Sawamoto, T. Miyata, S. Miyao, M. Watanabe, M. Nakamura, B. S. Bregman, M. Koike, Y. Uchiyama, Y. Toyama, H. Okano, “Transplantation of *in vitro*-expanded fetal neural progenitor cells results in neurogenesis and functional recovery after spinal cord contusion injury in adult rats,” *J. Neurosci. Res.* **69**(6), pp. 925-933 (2002).
- [28] S. Okada, K. Ishii, J. Yamane, A. Iwanami, T. Ikegami, H. Katoh, Y. Iwamoto, M. Nakamura, H. Miyoshi, H. J. Okano, C. H. Contag, Y. Toyama, H. Okano, “*In vivo* imaging of engrafted neural stem cells: its application in evaluating the optimal timing of transplantation for spinal cord injury,” *FASEB J.* **19**(13), pp. 1839-1841 (2005).
- [29] O. Tsuji, K. Miura, Y. Okada, K. Fujiyoshi, M. Mukaino, N. Nagoshi, K. Kitamura, G. Kumagai, M. Nishino, S. Tomisato, H. Higashi, T. Nagai, H. Katoh, K. Kohda, Y. Matsuzaki, M. Yuzaki, E. Ikeda, Y. Toyama, M. Nakamura, S. Yamanaka, H. Okano, “Therapeutic potential of appropriately evaluated safe-induced pluripotent stem cells for spinal cord injury,” *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **107**(28), pp. 12704-12709 (2010).
- [30] S. Nori, Y. Okada, A. Yasuda, O. Tsuji, Y. Takahashi, Y. Kobayashi, K. Fujiyoshi, M. Koike, Y. Uchiyama, E. Ikeda, Y. Toyama, S. Yamanaka, M. Nakamura, H. Okano, “Grafted human-induced pluripotent stem-cell-derived neurospheres promote motor functional recovery after spinal cord injury in mice,” *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **108**(40), pp. 16825-16830 (2011).
- [31] K. Okita, S. Yamanaka, “Induced pluripotent stem cells: opportunities and challenges,” *Philos. Trans. R Soc. Lond. B Biol. Sci.* **366**(1575), pp. 2198-2207 (2011).
- [32] D. Ogawa, Y. Okada, M. Nakamura, Y. Kanemura, H. J. Okano, Y. Matsuzaki, T. Shimazaki, M. Ito, E. Ikeda, T. Tamiya, S. Nagao, H. Okano, “Evaluation of human fetal neural stem/progenitor cells as a source for cell replacement therapy for neurological disorders: properties and tumorigenicity after long-term *in vitro* maintenance,” *J. Neurosci. Res.* **87**(2), pp. 307-317 (2009).
- [33] L. Grabel, “Prospects for pluripotent stem cell therapies: into the clinic and back to the bench,” *J. Cell Biochem.* **113**(2), pp. 381-387 (2012).
- [34] T. Yamashita, H. Kawai, F. Tian, Y. Ohta, K. Abe, “Tumorigenic development of induced pluripotent stem cells in ischemic mouse brain,” *Cell Transplant.* **20**(6), pp. 883-891 (2011).
- [35] 榎本光裕, 若林良明, 四宮謙一, “脊髓再生医療の現状と展望,” *日本腰痛会誌* **8**(1), pp.

16-20 (2002).

- [36] M. H. Tuszynski, D. A. Peterson, J. Ray, A. Baird, Y. Nakahara, F. H. Gage, "Fibroblasts genetically modified to produce nerve growth factor induce robust neuritic ingrowth after grafting to the spinal cord," *Exp. Neurol.* **126**(1), pp. 1-14 (1994).
- [37] M. H. Tuszynski, K. Gabriel, F. H. Gage, S. Suhr, S. Meyer, A. Rosetti, "Nerve growth factor delivery by gene transfer induces differential out-growth of sensory, motor, and noradrenergic neurites after adult spinal cord injury," *Exp. Neurol.* **137**(1), pp. 157-173 (1996).
- [38] L. B. Jakeman, P. Wei, Z. Guan, B. T. Stokes, "Brain-derived neurotrophic factor stimulates hindlimb stepping and sprouting of cholinergic fibers after spinal cord injury," *Exp. Neurol.* **154**(1), pp. 170-184 (1998).
- [39] Y. Liu, D. Kim, B. T. Himes, S. Y. Chow, T. Schallert, M. Murray, A. Tessler, I. Fischer, "Transplants of fibroblasts genetically modified to express BDNF promote regeneration of adult rat rubrospinal axons and recovery of forelimb function," *J. Neurosci.* **19**(11), pp. 4370-4387 (1999).
- [40] M. Koda, M. Hashimoto, M. Murakami, K. Yoshinaga, O. Ikeda, M. Yamazaki, S. Koshizuka, T. Kamada, H. Moriya, H. Shirasawa, S. Sakao, H. Ino, "Adenovirus vector-mediated *in vivo* gene transfer of brain-derived neurotrophic factor (BDNF) promotes rubrospinal axonal regeneration and functional recovery after complete transection of the adult rat spinal cord," *J. Neurotrauma* **21**(3), pp. 329-337 (2004).
- [41] R. Grill, K. Murai, A. Blesch, F. H. Gage, M. H. Tuszynski, "Cellular delivery of neurotrophin-3 promotes corticospinal axonal growth and partial functional recovery after spinal cord injury," *J. Neurosci.* **17**(14), pp. 5560- 5572 (1997).
- [42] D. M. McTigue, P. J. Horner, B. T. Stokes, F. H. Gage, "Neurotrophin-3 and brain-derived neurotrophic factor induce oligodendrocyte proliferation and myelination of regenerating axons in the contused adult rat spinal cord," *J. Neurosci.* **18**(14), pp. 5354-5365 (1998).
- [43] X. Q. Tang, Y. Wang, Z. H. Huang, J. S. Han, Y. Wan, "Adenovirus-mediated delivery of GDNF ameliorates corticospinal neuronal atrophy and motor function deficits in rats with spinal cord injury," *Neuroreport* **15**(3), pp. 425-429 (2004).
- [44] A. Blesch, M. H. Tuszynski, "GDNF gene delivery to injured adult CNS motor neurons promotes axonal growth, expression of the trophic neuropeptide CGRP, and cellular protection," *J. Comp. Neurol.* **436**(4), pp. 399-410 (2001).
- [45] F. Facchiano, E. Fernandez, S. Mancarella, G. Maira, M. Miscusi, D. D'Arcangelo, G.

- Cimino-Reale, M. L. Falchetti, M. C. Capogrossi, R. Pallini, "Promotion of regeneration of corticospinal tract axons in rats with recombinant vascular endothelial growth factor alone and combined with adenovirus coding for this factor," *J. Neurosurg.* **97**(1), pp. 161-168 (2002).
- [46] K. Kitamura, A. Iwanami, M. Nakamura, J. Yamane, K. Watanabe, Y. Suzuki, D. Miyazawa, S. Shibata, H. Funakoshi, S. Miyatake, R. S. Coffin, T. Nakamura, Y. Toyama, H. Okano, "Hepatocyte growth factor promotes endogenous repair and functional recovery after spinal cord injury," *J. Neurosci. Res.* **85**(11), pp. 2332-2342 (2007).
- [47] T. Miura, S. Tanaka, A. Seichi, M. Arai, T. Goto, H. Katagiri, T. Asano, H. Oda, K. Nakamura, "Partial functional recovery of paraplegic rat by adenovirus-mediated gene delivery of constitutively active MEK1," *Exp. Neurol.* **166**(1), pp. 115-126 (2000).
- [48] M. S. Chen, A. B. Huber, M. E. van der Haar, M. Frank, L. Schnell, A. A. Spillmann, F. Christ, M. E. Schwab, "Nogo-A is a myelin-associated neurite outgrowth inhibitor and an antigen for monoclonal antibody IN-1," *Nature* **403**(6768), pp. 434-439 (2000).
- [49] T. GrandPré, F. Nakamura, T. Vartanian, S. M. Strittmatter, "Identification of the Nogo inhibitor of axon regeneration as a Reticulon protein," *Nature* **403**(6768), pp. 439-444 (2000).
- [50] R. Prinjha, S. E. Moore, M. Vinson, S. Blake, R. Morrow, G. Christie, D. Michalovich, D. L. Simmons, F. S. Walsh, "Inhibitor of neurite outgrowth in humans," *Nature* **403**(6768), pp. 383-384 (2000).
- [51] D. Merkler, G. A. Metz, O. Raineteau, V. Dietz, M. E. Schwab, K. Fouad, "Locomotor recovery in spinal cord-injured rats treated with an antibody neutralizing the myelin-associated neurite growth inhibitor Nogo-A," *J. Neurosci.* **21**(10), pp. 3665-3673 (2001).
- [52] P. Caroni, M. E. Schwab, "Antibody against myelin-associated inhibitor of neurite growth neutralizes nonpermissive substrate properties of CNS white matter," *Neuron* **1**(1), pp. 85-96 (1988).
- [53] L. McKerracher, S. David, D. L. Jackson, V. Kottis, R. J. Dunn, P. E. Braun, "Identification of myelin-associated glycoprotein as a major myelin-derived inhibitor of neurite growth," *Neuron* **13**(4), pp. 805-811 (1994).
- [54] M. Domeniconi, Z. Cao, T. Spencer, R. Sivasankaran, K. Wang, E. Nikulina, N. Kimura, H. Cai, K. Deng, Y. Gao, Z. He, M. Filbin, "Myelin-associated glycoprotein interacts with the Nogo66 receptor to inhibit neurite outgrowth," *Neuron* **35**(2), pp. 283-290 (2002).
- [55] B. P. Liu, A. Fournier, T. GrandPré, S. M. Strittmatter, "Myelin-associated glycoprotein as a functional ligand for the Nogo-66 receptor," *Science* **297**(5584), pp. 1190-1193 (2002).

- [56] V. Kottis, P. Thibault, D. Mikol, Z. C. Xiao, R. Zhang, P. Dergham, P. E. Braun, "Oligodendrocyte-myelin glycoprotein (OMgp) is an inhibitor of neurite outgrowth," *J. Neurochem.* **82**(6), pp. 1566-1569 (2002).
- [57] K. C. Wang, V. Koprivica, J. A. Kim, R. Sivasankaran, Y. Guo, R. L. Neve, Z. He, "Oligodendrocyte-myelin glycoprotein is a Nogo receptor ligand that inhibits neurite outgrowth," *Nature* **417**(6892), pp. 941-944 (2002).
- [58] C. P. Barrett, E. J. Donati, L. Guth, "Differences between adult and neonatal rats in their astroglial response to spinal injury," *Exp. Neurol.* **84**(2), pp. 374-385 (1984).
- [59] E. J. Bradbury, L. D. Moon, R. J. Popat, V. R. King, G. S. Bennett, P. N. Patel, J. W. Fawcett, S. B. McMahon, "Chondroitinase ABC promotes functional recovery after spinal cord injury," *Nature* **416**(6881), pp. 636-640 (2002).
- [60] S. Okada, M. Nakamura, Y. Mikami, T. Shimazaki, M. Mihara, Y. Ohsugi, Y. Iwamoto, K. Yoshizaki, T. Kishimoto, Y. Toyama, H. Okano, "Blockade of interleukin-6 receptor suppresses reactive astrogliosis and ameliorates functional recovery in experimental spinal cord injury," *J. Neurosci. Res.* **76**(2), pp. 265-276 (2004).
- [61] S. Kaneko, A. Iwanami, M. Nakamura, A. Kishino, K. Kikuchi, S. Shibata, H. J. Okano, T. Ikegami, A. Moriya, O. Konishi, C. Nakayama, K. Kumagai, T. Kimura, Y. Sato, Y. Goshima, M. Taniguchi, M. Ito, Z. He, Y. Toyama, H. Okano, "A selective Sema3A inhibitor enhances regenerative responses and functional recovery of the injured spinal cord," *Nat. Med.* **12**(12), pp. 1380-1389 (2006).
- [62] V. Menet, M. Prieto, A. Privat, M. Giménez y Ribotta, "Axonal plasticity and functional recovery after spinal cord injury in mice deficient in both glial fibrillary acidic protein and vimentin genes," *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **100**(15), pp. 8999-9004 (2003).
- [63] M. Desclaux, M. Teigell, L. Amar, R. Vogel, M. Giménez y Ribotta, A. Privat, J. Mallet, "A novel and efficient gene transfer strategy reduces glial reactivity and improves neuronal survival and axonal growth *in vitro*," *PLoS One* **4**(7), pp. e6227/1-15 (2009).
- [64] T. Toyooka, H. Nawashiro, N. Shinomiya, K. Shima, "Down-regulation of glial fibrillary acidic protein and vimentin by RNA interference improves acute urinary dysfunction associated with spinal cord injury in rats," *J. Neurotrauma* **28**(4), pp. 607-618 (2011).
- [65] M. Berry, L. Barrett, L. Seymour, A. Baird, A. Logan, "Gene therapy for central nervous system repair," *Curr. Opin. Mol. Ther.* **3**(4), pp. 338-349 (2001).
- [66] S. Franz, N. Weidner, A. Blesch, "Gene therapy approaches to enhancing plasticity and

- regeneration after spinal cord injury,” *Exp. Neurol.* **235**(1), pp. 62-69 (2012).
- [67]X. Bo, D. Wu, J. Yeh, Y. Zhang, “Gene therapy approaches for neuroprotection and axonal regeneration after spinal cord and spinal root injury,” *Curr. Gene Ther.* **11**(2), pp. 101-115 (2011).
- [68]B. Blits, M. Oudega, G. J. Boer, M. B. Bunge, J. Verhaagen, “Adeno-associated viral vector-mediated neurotrophin gene transfer in the injured adult rat spinal cord improves hind-limb function,” *Neuroscience* **118**(1), pp. 271-281 (2003).
- [69]B. Blits, M. B. Bunge, “Direct gene therapy for repair of the spinal cord,” *J. Neurotrauma* **23**(3-4), pp. 508-520 (2006).
- [70]B. H. Choi, Y. Ha, X. Huang, S. R. Park, J. Chung, D. K. Hyun, H. Park, H. C. Park, S. W. Kim, M. Lee, “Hypoxia-inducible expression of vascular endothelial growth factor for the treatment of spinal cord injury in a rat model,” *J. Neurosurg. Spine* **7**(1), pp. 54-60 (2007).
- [71]W. C. Huang, H. S. Kuo, M. J. Tsai, H. Ma, C. W. Chiu, M. C. Huang, L. H. Yang, P. T. Chang, Y. L. Lin, W. C. Kuo, M. J. Lee, J. C. Liu, H. Cheng, “Adeno-associated virus-mediated human acidic fibroblast growth factor expression promotes functional recovery of spinal cord-contused rats,” *J. Gene Med.* **13**(5), pp. 283-289 (2011).
- [72]K. Kitamura, K. Fujiyoshi, J. Yamane, F. Toyota, K. Hikishima, T. Nomura, H. Funakoshi, T. Nakamura, M. Aoki, Y. Toyama, H. Okano, M. Nakamura, “Human hepatocyte growth factor promotes functional recovery in primates after spinal cord injury,” *PLoS One* **6**(11), pp. e27706/1-13 (2011).
- [73]S. R. Jeong, M. J. Kwon, H. G. Lee, E. H. Joe, J. H. Lee, S. S. Kim, H. Suh-Kim, B. G. Kim, “Hepatocyte growth factor reduces astrocytic scar formation and promotes axonal growth beyond glial scars after spinal cord injury,” *Exp. Neurol.* **233**(1), pp. 312-322 (2012).
- [74]Website of The Journal of Gene Medicine, Wiley (2012 年 7 月)
<http://www.wiley.com//legacy/wileychi/genmed/clinical/>
- [75]T. Niidome, L. Huang, “Gene therapy progress and prospects: nonviral vectors,” *Gene Ther.* **9**(24), pp. 1647-1652 (2002).
- [76]原島秀吉, 田畑泰彦, ウイルスを用いない遺伝子導入法の方法論の新たな展開 (メディカルドゥ, 2006).
- [77]S. D. Li, L. Huang, “Non-viral is superior to viral gene delivery,” *J. Control. Release* **123**(3), pp. 181-183 (2007).
- [78]M. S. Al-Dosari, X. Gao, “Nonviral gene delivery: principle, limitations, and recent progress,”

AAPS J **11**(4), pp. 671-681 (2009).

- [79] P. Lam, D. A. Dean, “Progress and prospects: nuclear import of nonviral vectors,” *Gene Ther.* **17**(4), pp. 439-447 (2010).
- [80] 濱田洋文, “次世代ウイルスベクターの開発と遺伝子治療への応用,” *細胞工学* **20**(9), pp. 1216-1221 (2001).
- [81] P. Mancheño-Corvo, P. Martín-Duque, “Viral gene therapy,” *Clin. Transl. Oncol.* **8**(12), pp. 858-867 (2006).
- [82] R. Waehler, S. J. Russell, D. T. Curiel, “Engineering targeted viral vectors for gene therapy,” *Nat. Rev. Genet.* **8**(8), pp. 573-587 (2007).
- [83] 国立医薬品食品衛生研究所 遺伝子細胞医学部 ウェブサイト (2012年7月)
<http://www.nihs.go.jp/cgtp/cgtp/home-j.html>
- [84] E. Marshall, “Gene therapy death prompts review of adenovirus vector,” *Science* **286**(5448), pp. 2244-2245 (1999).
- [85] E. Marshall, “Gene therapy on trial,” *Science* **288**(5468), pp. 951-957 (2000).
- [86] European Society of Gene Therapy, “French gene therapy group reports on the adverse event in a clinical trial of gene therapy for X-linked severe combined immune deficiency (X-SCID). Position statement from the European Society of Gene Therapy.” *J. Gene Med.* **5**(1), pp. 82-84 (2003).
- [87] Gansbacher B; European Society of Gene Therapy, “Report of a second serious adverse event in a clinical trial of gene therapy for X-linked severe combined immune deficiency (X-SCID). Position of the European Society of Gene Therapy (ESGT),” *J. Gene Med.* **5**(3), pp. 261-262 (2003).
- [88] K. Pike-Overzet, M. van der Burg, G. Wagemaker, J. J. van Dongen, F. J. Staal, “New insights and unresolved issues regarding insertional mutagenesis in X-linked SCID gene therapy,” *Mol. Ther.* **15**(11), pp. 1910-1916 (2007).
- [89] Thrasher A, Gaspar B, “Severe adverse event in clinical trial of gene therapy for X-SCID,” *Letter to the American Society of Gene Therapy* (2007).
<http://www.asgct.org/UserFiles/XSCIDstatement.pdf>
- [90] S. Hacein-Bey-Abina, C. Von Kalle, M. Schmidt, M. P. McCormack, N. Wulffraat, P. Leboulch, A. Lim, C. S. Osborne, R. Pawliuk, E. Morillon, R. Sorensen, A. Forster, P. Fraser, J. I. Cohen, G. de Saint Basile, I. Alexander, U. Wintergerst, T. Frebourg, A. Aurias, D. Stoppa-Lyonnet, S. Romana, I. Radford-Weiss, F. Gross, F. Valensi, E. Delabesse, E. Macintyre, F. Sigaux, J.

- Soulier, L. E. Leiva, M. Wissler, C. Prinz, T. H. Rabbitts, F. Le Deist, A. Fischer, M. Cavazzana-Calvo, "LMO2-associated clonal T cell proliferation in two patients after gene therapy for SCID-X1," *Science* **302**(5644), pp. 415-419 (2003).
- [91] M. Nishikawa, L. Huang, "Nonviral vectors in the new millennium: delivery barriers in gene transfer," *Hum. Gene Ther.* **12**(8), pp. 861-870 (2001).
- [92] S. Li, Z. Ma, "Nonviral gene therapy," *Curr. Gene Ther.* **1**(2), pp. 201-226 (2001).
- [93] M. Morille, C. Passirani, A. Vonarbourg, A. Clavreul, J. P. Benoit, "Progress in developing cationic vectors for non-viral systemic gene therapy against cancer," *Biomaterials* **29**(24-25), pp. 3477-3496 (2008).
- [94] T. K. Kim, J. H. Eberwine, "Mammalian cell transfection: the present and the future," *Anal. Bioanal. Chem.* **397**(8), pp. 3173-3178 (2010).
- [95] N. M. Rao, "Cationic lipid-mediated nucleic acid delivery: beyond being cationic," *Chem. Phys. Lipids.* **163**(3), pp. 245-252 (2010).
- [96] F. L. Graham, A. J. van der Eb, "A new technique for the assay of infectivity of human adenovirus 5 DNA," *Virology* **52**(2), pp. 456-467 (1973).
- [97] M. Wigler, A. Pellicer, S. Silverstein, R. Axel, "Biochemical transfer of single-copy eucaryotic genes using total cellular DNA as donor," *Cell* **14**(3), pp. 725-731 (1978).
- [98] P. L. Felgner, T. R. Gadek, M. Holm, R. Roman, H. W. Chan, M. Wenz, J. P. Northrop, G. M. Ringold, M. Danielsen, "Lipofection: a highly efficient, lipid-mediated DNA-transfection procedure," *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **84**(21), pp. 7413-7417 (1987).
- [99] G. Y. Wu, C. H. Wu, "Receptor-mediated *in vitro* gene transformation by a soluble DNA carrier system," *J. Biol. Chem.* **262**(10), pp. 4429-4432 (1987).
- [100] C. Tros de Ilarduya, Y. Sun, N. Düzgüneş, "Gene delivery by lipoplexes and polyplexes," *Eur. J. Pharm. Sci.* **40**(3), pp. 159-170 (2010).
- [101] O. Boussif, F. Lezoualc'h, M. A. Zanta, M. D. Mergny, D. Scherman, B. Demeneix, J. P. Behr, "A versatile vector for gene and oligonucleotide transfer into cells in culture and *in vivo*: polyethylenimine," *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **92**(16), pp. 7297-7301 (1995).
- [102] S. Ferrari, A. Pettenazzo, N. Garbati, F. Zacchello, J. P. Behr, M. Scarpa, "Polyethylenimine shows properties of interest for cystic fibrosis gene therapy," *Biochim. Biophys. Acta* **1447**(2-3), pp. 219-225 (1999).
- [103] 折茂英生, 遺伝子導入と発現(1), *日医大医会誌* **7**(2), pp. 92-96 (2011).
- [104] 田畑泰彦編, ドラッグデリバリーシステム DDS 技術の新たな展開とその活用法

(メディカルドゥ, 2003).

- [105] J. A. Wolff, R. W. Malone, P. Williams, W. Chong, G. Acsadi, A. Jani, P. L. Felgner, "Direct gene transfer into mouse muscle *in vivo*," *Science* **247**(4949 Pt 1), pp. 1465-1468 (1990).
- [106] K. Li, R. E. Welikson, K. L. Vikstrom, L. A. Leinwand, "Direct gene transfer into the mouse heart," *J. Mol. Cell Cardiol.* **29**(5), pp. 1499-1504 (1997).
- [107] G. Acsadi, S. S. Jiao, A. Jani, D. Duke, P. Williams, W. Chong, J. A. Wolff, "Direct gene transfer and expression into rat heart *in vivo*," *New Biol.* **3**(1), pp. 71-81 (1991).
- [108] M. A. Hickman, R. W. Malone, K. Lehmann-Bruinsma, T. R. Sih, D. Knoell, F. C. Szoka, R. Walzem, D. M. Carlson, J. S. Powell, "Gene expression following direct injection of DNA into liver," *Hum. Gene Ther.* **5**(12), pp. 1477-1483 (1994).
- [109] M. L. Sikes, B. W. O'Malley Jr, M. J. Finegold, F. D. Ledley, "*In vivo* gene transfer into rabbit thyroid follicular cells by direct DNA injection," *Hum. Gene Ther.* **5**(7), 837-844 (1994).
- [110] G. Zhang, D. Vargo, V. Budker, N. Armstrong, S. Knechtle, J. A. Wolff, "Expression of naked plasmid DNA injected into the afferent and efferent vessels of rodent and dog livers," *Hum. Gene Ther.* **8**(15), pp. 1763-1772 (1997).
- [111] V. Budker, G. Zhang, S. Knechtle, J. A. Wolff, "Naked DNA delivered intraportally expresses efficiently in hepatocytes," *Gene Ther.* **3**(7), pp. 593-598 (1996).
- [112] K. A. Choate, P. A. Khavari, "Direct cutaneous gene delivery in a human genetic skin disease," *Hum. Gene Ther.* **8**(14), pp. 1659-1665 (1997).
- [113] J. A. Wolff, V. Budker, "The mechanism of naked DNA uptake and expression," *Adv. Genet.* **54**, pp. 3-20 (2005).
- [114] D. Lechardeur, K. J. Sohn, M. Haardt, P. B. Joshi, M. Monck, R. W. Graham, B. Beatty, J. Squire, H. O'Brodovich, G. L. Lukacs, "Metabolic instability of plasmid DNA in the cytosol: a potential barrier to gene transfer," *Gene Ther.* **6**(4), pp. 482-497 (1999).
- [115] B. E. Houk, G. Hochhaus, J. A. Hughes, "Kinetic modeling of plasmid DNA degradation in rat plasma," *AAPS PharmSci.* **1**(3), pp. E9/1-6 (1999).
- [116] D. J. Wells, "Gene therapy progress and prospects: electroporation and other physical methods," *Gene Ther.* **11**(18), pp. 1363-1369 (2004).
- [117] S. Mehier-Humbert, R. H. Guy, "Physical methods for gene transfer: improving the kinetics of gene delivery into cells," *Adv. Drug Deliv. Rev.* **57**(5), pp. 733-753 (2005).
- [118] X. Gao, K. S. Kim, D. Liu, "Nonviral gene delivery: what we know and what is next,"

AAPS J. **9**(1), pp. E92-104 (2007).

- [119] C. R. Lin, M. H. Tai, J. T. Cheng, A. K. Chou, J. J. Wang, P. H. Tan, M. Marsala, L. C. Yang, "Electroporation for direct spinal gene transfer in rats," *Neurosci. Lett.* **317**(1), pp. 1-4 (2002).
- [120] C. R. Lin, L. C. Yang, T. H. Lee, C. T. Lee, H. T. Huang, W. Z. Sun, J. T. Cheng, "Electroporation-mediated pain-killer gene therapy for mononeuropathic rats," *Gene Ther.* **9**(18), pp. 1247-1253 (2002).
- [121] C. M. Wu, M. W. Lin, J. T. Cheng, Y. M. Wang, Y. W. Huang, W. Z. Sun, C. R. Lin, "Regulated, electroporation-mediated delivery of pro-opiomelanocortin gene suppresses chronic constriction injury-induced neuropathic pain in rats," *Gene Ther.* **11**(11), pp. 933-940 (2004).
- [122] M. Shimamura, N. Sato, Y. Taniyama, H. Kurinami, H. Tanaka, T. Takami, T. Ogihara, M. Tohyama, Y. Kaneda, R. Morishita, "Gene transfer into adult rat spinal cord using naked plasmid DNA and ultrasound microbubbles," *J. Gene Med.* **7**(11), pp. 1468-1474 (2005).
- [123] M. Takahashi, K. Kido, A. Aoi, H. Furukawa, M. Ono, T. Kodama, "Spinal gene transfer using ultrasound and microbubbles," *J. Control. Release* **117**(2), pp. 267-272 (2007).
- [124] S. Somiari, J. Glasspool-Malone, J. J. Drabick, R. A. Gilbert, R. Heller, M. J. Jaroszeski, R. W. Malone, "Theory and *in vivo* application of electroporative gene delivery," *Mol. Ther.* **2**(3), pp. 178-187 (2000).
- [125] J. Gehl, "Electroporation: theory and methods, perspectives for drug delivery, gene therapy and research," *Acta Physiol. Scand.* **177**(4), pp. 437-447 (2003).
- [126] C. Favard, D. S. Dean, M. P. Rols, "Electrotransfer as a non viral method of gene delivery," *Curr. Gene Ther.* **7**(1), pp. 67-77 (2007).
- [127] E. Neumann, M. Schaefer-Ridder, Y. Wang, P. H. Hofschneider, "Gene transfer into mouse lymphoma cells by electroporation in high electric fields," *EMBO J.* **1**(7), pp. 841-845 (1982).
- [128] A. E. Trezise, L. Palazon, W. L. Davies, W. H. Colledge, "*In vivo* gene expression: DNA electrotransfer," *Curr. Opin. Mol. Ther.* **5**(4), pp. 397-404 (2003).
- [129] M. Cemazar, M. Golzio, G. Sersa, M. P. Rols, J. Teissié, "Electrically-assisted nucleic acids delivery to tissues *in vivo*: where do we stand?," *Curr. Pharm. Des.* **12**(29), pp. 3817-3825 (2006).
- [130] L. C. Heller, R. Heller, "*In vivo* electroporation for gene therapy," *Hum. Gene Ther.* **17**(9), pp. 890-897 (2006).

- [131] J. Teissie, M. Golzio, M. P. Rols, "Mechanisms of cell membrane electropermeabilization: a minireview of our present (lack of ?) knowledge," *Biochim. Biophys. Acta* **1724**(3), pp. 270-280 (2005).
- [132] C. Chen, S. W. Smye, M. P. Robinson, J. A. Evans, "Membrane electroporation theories: a review," *Med. Biol. Eng. Comput.* **44**(1-2), pp. 5-14 (2006).
- [133] J. M. Escoffre, T. Portet, L. Wasungu, J. Teissié, D. Dean, M. P. Rols, "What is (still not) known of the mechanism by which electroporation mediates gene transfer and expression in cells and tissues," *Mol. Biotechnol.* **41**(3), pp. 286-295 (2009).
- [134] Y. K. Lee, P. G. Deng, "Review of micro/nano technologies and theories for electroporation of biological cells," *Sci. China Phys. Mech. Astron.* **55**(6), pp. 996-1003 (2012).
- [135] D. C. Chang, T. S. Reese, "Changes in membrane structure induced by electroporation as revealed by rapid-freezing electron microscopy," *Biophys. J.* **58**(1), pp. 1-12 (1990).
- [136] T. Kondoh, Y. Motooka, A. K. Bhattacharjee, T. Kokunai, N. Saito, N. Tamaki, "*In vivo* gene transfer into the periventricular region by electroporation," *Neurol. Med. Chir. (Tokyo)* **40**(12), pp. 618-622 (2000).
- [137] M. Fechheimer, J. F. Boylan, S. Parker, J. E. Siskin, G. L. Patel, S. G. Zimmerm, "Transfection of mammalian cells with plasmid DNA by scrape loading and sonication loading," *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **84**(23), pp. 8463-8467 (1987).
- [138] M. Fechheimer, D. L. Taylor, "Introduction of exogenous molecules into the cytoplasm of *Dictyostelium discoideum* amoebae by controlled sonication," *Methods Cell Biol.* **28**, pp. 179-190 (1987).
- [139] M. Joersbo, J. Brunstedt, "Inoculation of sugar beet protoplasts with beet necrotic yellow vein virus particles by mild sonication," *J. Virol. Methods* **29**(1), pp. 63-69 (1990).
- [140] M. W. Miller, D. L. Miller, A. A. Brayman, "A review of *in vitro* bioeffects of inertial ultrasonic cavitation from a mechanistic perspective," *Ultrasound Med. Biol.* **22**(9), pp. 1131-1154 (1996).
- [141] H. R. Guzmán, A. J. McNamara, D. X. Nguyen, M. R. Prausnitz, "Bioeffects caused by changes in acoustic cavitation bubble density and cell concentration: a unified explanation based on cell-to-bubble ratio and blast radius," *Ultrasound Med. Biol.* **29**(8), pp. 1211-1222 (2003).
- [142] W. Wei, B. Zheng-zhong, W. Yong-jie, Z. Qing-wu, M. Ya-lin, "Bioeffects of low-frequency ultrasonic gene delivery and safety on cell membrane permeability control," *J.*

- Ultrasound Med. **23**(12), pp. 1569-1582 (2004).
- [143] H. J. Kim, J. F. Greenleaf, R. R. Kinnick, J. T. Bronk, M. E. Bolander, “Ultrasound-mediated transfection of mammalian cells,” *Hum. Gene Ther.* **7**(11), pp. 1339-1346 (1996).
- [144] W. J. Greenleaf, M. E. Bolander, G. Sarkar, M. B. Goldring, J. F. Greenleaf, “Artificial cavitation nuclei significantly enhance acoustically induced cell transfection,” *Ultrasound Med. Biol.* **24**(4), pp. 587-595 (1998).
- [145] A. Lawrie, A. F. Brisken, S. E. Francis, D. C. Cumberland, D. C. Crossman, C. M. Newman, “Microbubble-enhanced ultrasound for vascular gene delivery,” *Gene Ther.* **7**(23), pp. 2023-2027 (2000).
- [146] S. Koch, P. Pohl, U. Cobet, N. G. Rainov, “Ultrasound enhancement of liposome-mediated cell transfection is caused by cavitation effects,” *Ultrasound Med. Biol.* **26**(5), pp. 897-903 (2000).
- [147] T. Li, K. Tachibana, M. Kuroki, M. Kuroki, “Gene transfer with echo-enhanced contrast agents: comparison between Alunex, Optison, and Levovist in mice—initial results,” *Radiology* **229**(2), pp. 423-428 (2003).
- [148] Y. Taniyama, K. Tachibana, K. Hiraoka, T. Namba, K. Yamasaki, N. Hashiya, M. Aoki, T. Ogihara, K. Yasufumi, R. Morishita, “Local delivery of plasmid DNA into rat carotid artery using ultrasound,” *Circulation* **105**(10), pp. 1233-1239 (2002).
- [149] A. van Wamel, A. Bouakaz, M. Versluis, N. de Jong, “Micromanipulation of endothelial cells: ultrasound-microbubble-cell interaction,” *Ultrasound Med. Biol.* **30**(9), pp. 1255-1258 (2004).
- [150] S. Mitragotri, “Healing sound: the use of ultrasound in drug delivery and other therapeutic applications,” *Nat. Rev. Drug Discov.* **4**(3), pp. 255-260 (2005).
- [151] R. Suzuki, Y. Oda, N. Utoguchi, K. Maruyama, “Progress in the development of ultrasound-mediated gene delivery systems utilizing nano- and microbubbles,” *J. Control. Release* **149**(1), pp. 36-41 (2011).
- [152] L. B. Feril Jr, K. Tachibana, “Use of ultrasound in drug delivery systems: emphasis on experimental methodology and mechanisms,” *Int. J. Hyperthermia* **28**(4), pp. 282-289 (2012).
- [153] S. Moosavi Nejad, S. H. Hosseini, H. Akiyama, K. Tachibana, “Optical observation of cell sonoporation with low intensity ultrasound,” *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **413**(2), pp. 218-223 (2011).

- [154] 佐藤俊一, 寺川光洋, 小原實, “レーザー光を用いた遺伝子導入,” ウイルスを用いない遺伝子導入法の方法論の新たな展開, pp. 160-166 (メディカルドゥ, 2006).
- [155] C. P. Yao, Z. X. Zhang, R. Rahmzadeh, G. Huettmann, “Laser-based gene transfection and gene therapy,” *IEEE Trans. Nanobioscience* **7**(2), pp. 111-119 (2008).
- [156] M. Tsukakoshi, S. Kurata, Y. Nomiya, Y. Ikawa, T. Kasuya, “A novel method of DNA transfection by laser microbeam cell surgery,” *Appl. Phys. B* **35**(3), pp. 135-140 (1984).
- [157] S. Kurata, M. Tsukakoshi, T. Kasuya, Y. Ikawa, “The laser method for efficient introduction of foreign DNA into cultured cells,” *Exp. Cell Res.* **162**(2), pp. 372-378 (1986).
- [158] W. Tao, J. Wilkinson, E. J. Stanbridge, M. W. Berns, “Direct gene transfer into human cultured cells facilitated by laser micropuncture of the cell membrane,” *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **84**(12), pp. 4180-4184 (1987).
- [159] M. W. Berns, W. H. Wright, R. Wiegand Steubing, “Laser microbeam as a tool in cell biology,” *Int. Rev. Cytol.* **129**, pp. 1-44 (1991).
- [160] G. Weber, K. O. Greulich, “Manipulation of cells, organelles, and genomes by laser microbeam and optical trap,” *Int. Rev. Cytol.* **133**, pp. 1-41 (1992).
- [161] Y. Guo, H. Liang, M. W. Berns, “Laser-mediated gene transfer in rice,” *Physiol. Plant.* **93**(1), pp. 19-24 (1995).
- [162] Y. Shirahata, N. Ohkohchi, H. Itagak, S. Satomi, “New technique for gene transfection using laser irradiation,” *J. Investig. Med.* **49**(2), pp. 184-190 (2001).
- [163] H. Schneckenburger, A. Hendinger, R. Sailer, W. S. Strauss, M. Schmitt, “Laser-assisted optoporation of single cells,” *J. Biomed. Opt.* **7**(3), pp. 410-416 (2002).
- [164] S. K. Mohanty, M. Sharma, P. K. Gupta, “Laser-assisted microinjection into targeted animal cells,” *Biotechnol. Lett.* **25**(11), pp. 895-899 (2003).
- [165] Y. A. Badr, M. A. Kereim, M. A. Yehia, O. O. Fouad, A. Bahieldin, “Production of fertile transgenic wheat plants by laser micropuncture,” *Photochem. Photobiol. Sci.* **4**(10), pp. 803-807 (2005).
- [166] L. Paterson, B. Agate, M. Comrie, R. Ferguson, T. Lake, J. Morris, A. Carruthers, C. T. Brown, W. Sibbett, P. Bryant, F. Gunn-Moore, A. Riches, K. Dholakia, “Photoporation and cell transfection using a violet diode laser,” *Opt. Express* **13**(2), pp. 595-600 (2005).
- [167] U. K. Tirlapur, K. König, “Targeted transfection by femtosecond laser,” *Nature* **418**(6895), pp. 290-291 (2002).

- [168] V. Kohli, J. P. Acker, A. Y. Elezzabi, "Reversible permeabilization using high-intensity femtosecond laser pulses: applications to biopreservation," *Biotechnol. Bioeng.* **92**(7), pp. 889-899 (2005).
- [169] F. Stracke, I. Rieman, K. König, "Optical nanoinjection of macromolecules into vital cells," *J. Photochem. Photobiol. B* **81**(3), pp. 136-142 (2005).
- [170] C. Peng, R. E. Palazzo, I. Wilke, "Laser intensity dependence of femtosecond near-infrared optoinjection," *Phys. Rev. E Stat. Nonlin. Soft Matter Phys.* **75**(4 Pt 1), pp. 041903/1-8 (2007).
- [171] J. Baumgart, W. Bintig, A. Ngezahayo, S. Willenbrock, H. Murua Escobar, W. Ertmer, H. Lubatschowski, A. Heisterkamp, "Quantified femtosecond laser based opto-perforation of living GFSHR-17 and MTH53 a cells," *Opt. Express* **16**(5), pp. 3021-3031 (2008).
- [172] M. Lei, H. Xu, H. Yang, B. Yao, "Femtosecond laser-assisted microinjection into living neurons," *J. Neurosci. Methods* **174**(2), pp. 215-218 (2008).
- [173] A. Uchugonova, K. König, R. Bueckle, A. Isemann, G. Tempea, "Targeted transfection of stem cells with sub-20 femtosecond laser pulses," *Opt. Express* **16**(13), pp. 9357-9364 (2008).
- [174] D. Stevenson, B. Agate, X. Tsampoula, P. Fischer, C. T. Brown, W. Sibbett, A. Riches, F. Gunn-Moore, K. Dholakia, "Femtosecond optical transfection of cells: viability and efficiency," *Opt. Express* **14**(16), pp. 7125-7133 (2006).
- [175] Y. Hosokawa, S. Iguchi, R. Yasukuni, Y. Hiraki, C. Shukunami, H. Masuhara, "Gene delivery process in a single animal cell after femtosecond laser microinjection," *Appl. Surf. Sci.* **255**(24), pp. 9880-9884 (2009).
- [176] P. Soman, W. Zhang, A. Umeda, Z. J. Zhang, S. Chen, "Femtosecond laser-assisted optoporation for drug and gene delivery into single mammalian cells," *J. Biomed. Nanotechnol.* **7**(3), pp. 334-341 (2011).
- [177] H. Schinkel, P. Jacobs, S. Schillberg, M. Wehner, "Infrared picosecond laser for perforation of single plant cells," *Biotechnol. Bioeng.* **99**(1), pp. 244-248 (2008).
- [178] D. J. Stevenson, F. J. Gunn-Moore, P. Campbell, K. Dholakia, "Single cell optical transfection," *J. R. Soc. Interface* **7**(47), pp. 863-871 (2010).
- [179] J. S. Soughayer, T. Krasieva, S. C. Jacobson, J. M. Ramsey, B. J. Tromberg, N. L. Allbritton, "Characterization of cellular optoporation with distance," *Anal. Chem.* **72**(6), pp. 1342-1347 (2000).
- [180] V. Venugopalan, A. Guerra 3rd, K. Nahen, A. Vogel, "Role of laser-induced plasma formation in pulsed cellular microsurgery and micromanipulation," *Phys. Rev. Lett.* **88**(7), pp.

078103/1-4 (2002).

- [181] T. Knoll, L. Trojan, S. Langbein, S. Sagi, P. Alken, M. S. Michel, "Impact of holmium:YAG and neodymium:YAG lasers on the efficacy of DNA delivery in transitional cell carcinoma," *Lasers Med. Sci.* **19**(1), pp. 33-36 (2004).
- [182] M. R. Koller, E. G. Hanania, J. Stevens, T. M. Eisfeld, G. C. Sasaki, A. Fieck, B. Ø. Palsson, "High-throughput laser-mediated in situ cell purification with high purity and yield," *Cytometry A* **61**(2), pp. 153-161 (2004).
- [183] I. B. Clark, E. G. Hanania, J. Stevens, M. Gallina, A. Fieck, R. Brandes, B. O. Palsson, M. R. Koller, "Optoinjection for efficient targeted delivery of a broad range of compounds and macromolecules into diverse cell types," *J. Biomed. Opt.* **11**(1), pp. 014034/1-8 (2006).
- [184] K. Rhodes, I. Clark, M. Zatcoff, T. Eustaquio, K. L. HoyteL, M.R. Koller, "Cellular laserfection," *Methods Cell Biol.* **82**, pp. 309-333 (2007).
- [185] G. Palumbo, M. Caruso, E. Crescenzi, M. F. Tecce, G. Roberti, A. Colasanti, "Targeted gene transfer in eucaryotic cells by dye-assisted laser optoporation," *J. Photochem. Photobiol. B* **36**(1), pp. 41-46 (1996).
- [186] C. M. Pitsillides, E. K. Joe, X. Wei, R. R. Anderson, C. P. Lin, "Selective cell targeting with light-absorbing microparticles and nanoparticles," *Biophys. J.* **84**(6), pp. 4023-4032 (2003).
- [187] Y. Umebayashi, Y. Miyamoto, M. Wakita, A. Kobayashi, T. Nishisaka, "Elevation of plasma membrane permeability on laser irradiation of extracellular latex particles," *J. Biochem.* **134**(2), pp. 219-224 (2003).
- [188] C. Yao, R. Rahmanzadeh, E. Endl, Z. Zhang, J. Gerdes, G. Hüttmann, "Elevation of plasma membrane permeability by laser irradiation of selectively bound nanoparticles," *J. Biomed. Opt.* **10**(6), pp. 064012/1-8 (2005).
- [189] G. B. Braun, A. Pallaoro, G. Wu, D. Missirlis, J. A. Zasadzinski, M. Tirrell, N. O. Reich, "Laser-activated gene silencing via gold nanoshell-siRNA conjugates," *ACS Nano* **3**(7), pp. 2007-2015 (2009).
- [190] C. Yao, X. Qu, Z. Zhang, G. Hüttmann, R. Rahmanzadeh, "Influence of laser parameters on nanoparticle-induced membrane permeabilization," *J. Biomed. Opt.* **14**(5), 054034/1-7 (2009).
- [191] M. Terakawa, Y. Tanaka, "Dielectric microsphere mediated transfection using a femtosecond laser," *Opt. Lett.* **36**(15), pp. 2877-2879 (2011).

- [192] J. Baumgart, L. Humbert, É. Boulais, R. Lachaine, J. J. Lebrun, M. Meunier, “Off-resonance plasmonic enhanced femtosecond laser optoporation and transfection of cancer cells,” *Biomaterials* **33**(7), pp. 2345-2350 (2012).
- [193] M. Terakawa, Y. Tsunoi, T. Mitsuhashi, “*In vitro* perforation of human epithelial carcinoma cell with antibody-conjugated biodegradable microspheres illuminated by a single 80 femtosecond near-infrared laser pulse,” *Int. J. Nanomedicine* **7**, pp. 2653-2660 (2012).
- [194] P. K. Selbo, A. Høgset, L. Prasmickaite, K. Berg, “Photochemical internalisation: a novel drug delivery system,” *Tumour Biol.* **23**(2), pp. 103-112 (2002).
- [195] A. Høgset, L. Prasmickaite, P. K. Selbo, M. Hellum, B. Ø. Engesaeter, A. Bonsted, K. Berg, “Photochemical internalisation in drug and gene delivery,” *Adv. Drug Deliv. Rev.* **56**(1), pp. 95-115 (2004).
- [196] L. Prasmickaite, A. Høgset, B. Ø. Engesaeter, A. Bonsted, K. Berg, “Light-directed gene delivery by photochemical internalization,” *Expert Opin. Biol. Ther.* **4**(9), pp. 1403-1412 (2004).
- [197] N. Nishiyama, A. Iriyama, W. D. Jang, K. Miyata, K. Itaka, Y. Inoue, H. Takahashi, Y. Yanagi, Y. Tamaki, H. Koyama, K. Kataoka, “Light-induced gene transfer from packaged DNA enveloped in a dendrimeric photosensitizer,” *Nat. Mater.* **4**(12), pp. 934-941 (2005).
- [198] K. Berg, M. Folini, L. Prasmickaite, P. K. Selbo, A. Bonsted, B. Ø. Engesaeter, N. Zaffaroni, A. Weyergang, A. Dietze, G. M. Maelandsmo, E. Wagner, O. J. Norum, A. Høgset, “Photochemical internalization: a new tool for drug delivery,” *Curr. Pharm. Biotechnol.* **8**(6), pp. 362-372 (2007).
- [199] S. Oliveira, M. M. Fretz, A. Høgset, G. Storm, R. M. Schiffelers, “Photochemical internalization enhances silencing of epidermal growth factor receptor through improved endosomal escape of siRNA,” *Biochim. Biophys. Acta* **1768**(5), pp. 1211-1217 (2007).
- [200] P. K. Selbo, A. Weyergang, A. Høgset, O. J. Norum, M. B. Berstad, M. Vikdal, K. Berg, “Photochemical internalization provides time- and space-controlled endolysosomal escape of therapeutic molecules,” *J. Control. Release* **148**(1), pp. 2-12 (2010).
- [201] J. T. Wang, F. Giuntini, I. M. Eggleston, S. G. Bown, A. J. MacRobert, “Photochemical internalisation of a macromolecular protein toxin using a cell penetrating peptide-photosensitiser conjugate,” *J. Control. Release* **157**(2), pp. 305-313 (2012).
- [202] E. Zeira, A. Manevitch, A. Khatchaturians, O. Pappo, E. Hyam, M. Darash-Yahana, E. Tavor, A. Honigman, A. Lewis, E. Galun, “Femtosecond infrared laser-An efficient and safe *in*

- vivo* gene delivery system for prolonged expression,” *Mol. Ther.* **8**(2), pp. 342-350 (2003).
- [203] E. Zeira, A. Manevitch, Z. Manevitch, E. Kedar, M. Gropp, N. Daudi, R. Barsuk, M. Harati, H. Yotvat, P. J. Troilo, T. G. Griffiths 2nd, S. J. Pacchione, D. F. Roden, Z. Niu, O. Nussbaum, G. Zamir, O. Papo, I. Hemo, A. Lewis, E. Galun, “Femtosecond laser: a new intradermal DNA delivery method for efficient, long-term gene expression and genetic immunization,” *FASEB J.* **21**(13), pp. 3522-3533 (2007).
- [204] S. W. Tsen, C. Y. Wu, A. Meneshian, S. I. Pai, C. F. Hung, T. C. Wu, “Femtosecond laser treatment enhances DNA transfection efficiency *in vivo*,” *J. Biomed. Sci.* **1**, pp. 16-36 (2009).
- [205] J. M. Escoffre, J. Teissié, M. P. Rols, “Gene transfer: how can the biological barriers be overcome?,” *J. Membr. Biol.* **236**(1), pp. 61-74 (2010).
- [206] M. Ogura, S. Sato, K. Nakanishi, M. Uenoyama, T. Kiyozumi, D. Saito, T. Ikeda, H. Ashida, M. Obara, “*In vivo* targeted gene transfer in skin by the use of laser-induced stress waves,” *Lasers Surg. Med.* **34**(3), pp. 242-248 (2004).
- [207] M. Terakawa, M. Ogura, S. Sato, H. Wakisaka, H. Ashida, M. Uenoyama, Y. Masaki, M. Obara, “Gene transfer into mammalian cells by use of a nanosecond pulsed laser-induced stress wave,” *Opt. Lett.* **29**(11), pp. 1227-1229 (2004).
- [208] Y. Satoh, Y. Kanda, M. Terakawa, M. Obara, K. Mizuno, Y. Watanabe, S. Endo, S. Sato, K. Takishima, “Targeted DNA transfection into the mouse central nervous system using laser-induced stress waves,” *J. Biomed. Opt.* **10**(6), pp. 060501/1-3 (2005).
- [209] W. Tang, D. A. Weidner, Y. B. Hu, R. J. Newton, X. Hu, “Efficient delivery of small interfering RNA to plant cells by a nanosecond pulsed laser-induced stress wave for posttranscriptional gene silencing,” *Plant Sci.* **171**, pp. 375-381 (2006).
- [210] M. Terakawa, S. Sato, H. Ashida, K. Aizawa, M. Uenoyama, Y. Masaki, M. Obara, “*In vitro* gene transfer to mammalian cells by the use of laser-induced stress waves: effects of stress wave parameters, ambient temperature, and cell type,” *J. Biomed. Opt.* **11**(1), pp. 014026/1-7 (2006).
- [211] 佐藤俊一, 寺川光洋, 小原實, “レーザ誘起応力波を用いた選択的遺伝子導入,” *応用物理* **76**(4), pp. 405-409 (2007).
- [212] 寺川光洋, 佐藤俊一, 小原實, “レーザと細胞・組織の相互作用を利用したレーザ治療,” *日本機械学会誌* **110**(1068), pp. 871-873 (2007).
- [213] M. Terakawa, S. Sato, D. Saitoh, H. Tsuda, H. Ashida, H. Okano, M. Obara, “Enhanced angiogenesis in grafted skins by laser-induced stress wave-assisted gene transfer of hepatocyte

- growth factor,” J. Biomed. Opt. **12**(3), pp. 034031/1-8 (2007).
- [214] M. Terakawa, R. Otsuka, S. Sato, Y. Satoh, K. Takishima, H. Ashida, H. Okano, M. Obara, “Laser-induced stress wave-assisted gene transfection with cationic liposome,” Jpn. J. Appl. Phys. **46**(49), pp. 1243-1245 (2007).
- [215] S. Takano, S. Sato, M. Terakawa, H. Asida, H. Okano, M. Obara, “Enhanced transfection efficiency in laser-induced stress wave-assisted gene transfer at low laser fluence by increasing pressure impulse,” Appl. Phys. Express **1**, pp. 038001/1-3 (2008).
- [216] K. Aizawa, S. Sato, M. Terakawa, D. Saitoh, H. Tsuda, H. Ashida, M. Obara, “Accelerated adhesion of grafted skin by laser-induced stress wave-based gene transfer of hepatocyte growth factor,” J. Biomed. Opt. **14**(6), pp. 064043/1-9 (2009).
- [217] A. Kurita, T. Matsunobu, Y. Satoh, T. Ando, S. Sato, M. Obara, A. Shiotani, “Targeted gene transfer into rat facial muscles by nanosecond pulsed laser-induced stress waves,” J. Biomed. Opt. **16**(9), pp. 098002/1-5 (2011).
- [218] S. Gambihler, M. Delius, J. W. Ellwart, “Transient increase in membrane permeability of L1210 cells upon exposure to lithotripter shock waves *in vitro*,” Naturwissenschaften **79**(7), pp. 328-329 (1992).
- [219] S. Gambihler, M. Delius, J. W. Ellwart, “Permeabilization of the plasma membrane of L1210 mouse leukemia cells using lithotripter shock waves,” J. Membr. Biol. **141**(3), pp. 267-275 (1994).
- [220] T. J. Flotte, S. Lee, H. Zhang, D. McAuliffe, T. Douki, A. G. Doukas, “Laser-induced stress transients: applications for molecular delivery,” Proc. SPIE **2391**(1), pp. 202-207 (1995).
- [221] A. G. Doukas, T. J. Flotte, “Physical characteristics and biological effects of laser-induced stress waves,” Ultrasound Med. Biol. **22**(2), pp. 151-164 (1996).
- [222] S. Lee, T. Anderson, H. Zhang, T. J. Flotte, A. G. Doukas, “Alteration of cell membrane by stress waves *in vitro*,” Ultrasound Med. Biol. **22**(9), pp. 1285-1293 (1996).
- [223] D. J. McAuliffe, S. Lee, T. J. Flotte, A. G. Doukas, “Stress-wave-assisted transport through the plasma membrane *in vitro*,” Lasers Surg. Med. **20**(2), pp. 216-222 (1997).
- [224] S. Lee, D. J. McAuliffe, H. Zhang, Z. Xu, J. Taitelbaum, T. J. Flotte, A. G. Doukas, “Stress-wave-induced membrane permeation of red blood cell is facilitated by aquaporins,” Ultrasound Med. Biol. **23**(7), pp. 1089-1094 (1997).
- [225] S. Lee, D. J. McAuliffe, T. J. Flotte, N. Kollias, A. G. Doukas, “Photomechanical transcutaneous delivery of macromolecules,” J. Invest. Dermatol. **111**(6), pp. 925-929 (1998).

- [226] S. Lee, A. G. Doukas, "Laser-generated stress waves and their effects on the cell membrane," *IEEE J. Selected Topics Quant. Electron.* **5**(4), pp. 997-1003 (1999).
- [227] S. Lee, N. Kollias, D. J. McAuliffe, T. J. Flotte, A. G. Doukas, "Topical drug delivery in humans with a single photomechanical wave," *Pharm. Res.* **16**(11), pp. 1717-1721 (1999).
- [228] S. E. Mulholland, S. Lee, D. J. McAuliffe, A. G. Doukas, "Cell loading with laser-generated stress waves: the role of the stress gradient," *Pharm. Res.* **16**(4), pp. 514-518 (1999).
- [229] S. Lee S, D. J. McAuliffe, T. Kodama, A. G. Doukas, "*In vivo* transdermal delivery using a shock tube," *Shock Waves* **10**(5), pp. 307-311 (2000).
- [230] T. Kodama, M. R. Hamblin, A. G. Doukas, "Cytoplasmic molecular delivery with shock waves: importance of impulse," *Biophys. J.* **79**(4), pp. 1821-1832 (2000).
- [231] S. Lee, D. J. McAuliffe, T. J. Flotte, N. Kollias, A. G. Doukas, "Photomechanical transdermal delivery: the effect of laser confinement," *Lasers Surg. Med.* **28**(4), pp. 344-347 (2001).
- [232] S. Lee, D. J. McAuliffe, S. E. Mulholland, A. G. Doukas, "Photomechanical transdermal delivery of insulin *in vivo*," *Lasers Surg. Med.* **28**(3), pp. 282-285 (2001).
- [233] S. Lee, D. J. McAuliffe, N. Kollias, T. J. Flotte, A. G. Doukas, "Permeabilization and recovery of the stratum corneum *in vivo*: the synergy of photomechanical waves and sodium lauryl sulfate," *Lasers Surg. Med.* **29**(2), pp. 145-150 (2001).
- [234] S. Gonzalez, S. Lee, E. Gonzales, A. G. Doukas, "Rapid allergen delivery with photomechanical waves for inducing allergic skin reactions in the hairless guinea pig animal model," *Am. J. Contact Dermat.* **12**(3), pp. 162-165 (2001).
- [235] S. Lee, D. J. McAuliffe, N. Kollias, T. J. Flotte, A. G. Doukas, "Photomechanical delivery of 100-nm microspheres through the stratum corneum: implications for transdermal drug delivery," *Lasers Surg. Med.* **31**(3), pp. 207-210 (2002).
- [236] G. K. Menon, N. Kollias, A. G. Doukas, "Ultrastructural evidence of stratum corneum permeabilization induced by photomechanical waves," *J. Invest. Dermatol.* **121**(1), pp. 104-109 (2003).
- [237] T. Y. Lin, D. J. McAuliffe, N. Michaud, H. Zhang, S. Lee, A. G. Doukas, T. J. Flotte, "Nuclear transport by laser-induced pressure transients," *Pharm. Res.* **20**(6), pp. 879-883 (2003).
- [238] A. G. Doukas, N. Kollias, "Transdermal drug delivery with a pressure wave," *Adv. Drug*

Deliv. Rev. **56**(5), pp. 559-579 (2004).

- [239] K. Koshiyama, T. Kodama, T. Yano, S. Fujikawa, "Structural change in lipid bilayers and water penetration induced by shock waves: molecular dynamics simulations," *Biophys. J.* **91**(6), pp. 2198-2205 (2006).
- [240] K. Koshiyama, T. Yano, T. Kodama, "Self-organization of a stable pore structure in a phospholipid bilayer," *Phys. Rev. Lett.* **105**(1), pp. 018105/1-4 (2010).
- [241] S. Sagi, T. Knoll, L. Trojan, A. Schaaf, P. Alken, M. S. Michel, "Gene delivery into prostate cancer cells by holmium laser application," *Prostate Cancer Prostatic Dis.* **6**(2), pp. 127-130 (2003).
- [242] T. Knoll, S. Sagi, L. Trojan, A. Schaaf, P. Alken, M. S. Michel, "*In vitro* and *ex vivo* gene delivery into proximal tubular cells by means of laser energy--a potential approach for curing cystinuria?," *Urol. Res.* **32**(2), pp. 129-132 (2004).
- [243] M. Ogura, S. Sato, Ashida, M. Obara, "*In vivo* targeted gene transfer by direct irradiation with nanosecond pulsed laser," *Jpn. J. Appl. Phys.* **43**(10A), pp. L1268-L1270 (2004).
- [244] M. T. Fitch, J. Silver, "CNS injury, glial scars, and inflammation: Inhibitory extracellular matrices and regeneration failure," *Exp. Neurol.* **209**(2), pp. 294-301 (2008).
- [245] C. E. Hulsebosch, "Recent advances in pathophysiology and treatment of spinal cord injury," *Adv. Physiol. Educ.* **26**(1-4), pp. 238-255 (2002).
- [246] S. Sato, "Laser-induced stress waves facilitate targeted gene transfer," *SPIE Newsroom*, DOI: 10.1117/2.1200905.1656 (2009).

Table 1-1 Characteristics of physical gene delivery systems [78, 103, 117].

Methods	Route of Gene Delivery	Tissue	Advantages	Limitations
Microinjection	Intratissue	Skin, muscle, liver, brain, heart, thyroid, tendons	Simplicity and safety	<i>In vivo</i> fastidious
Gene gun	Topical	Skin, mucosa	High efficiency	Poor penetration across tissues
Electroporation	Topical, intratissue	Skin, muscle, kidney, lung, liver, joints, heart, spleen, brain, spinal cord, eyes	High efficiency	Invasive and limited working range
Sonoporation	Topical, systemic	Muscle, liver, heart, brain, spinal cord, bone	Site-specific gene delivery	Low efficiency
Direct laser irradiation	Topical	Skin, muscle	High efficiency and spatial controllability	Limited tissue penetration
Magnetofection	Topical	Gastrointestinal tract, vasculature of ear, airway epithelium	High efficiency in vitro	Low efficiency in vivo
Hydrodynamic delivery	Systemic, Intravascular	Skin, muscle, liver	High efficiency and simplicity	Translation to human body

Table 1-2 Methods for gene transfection using a laser beam [154].

Materials and Methods			Laser source	Cells and Tissue	Delivered genes	References	
Direct laser irradiation	Cultured cells (<i>in vitro</i>)	Single cell	Hd:YAG laser THG (532 nm)	NRK, others	Eco-bpt, others	156-160	
			CW diode laser (405 nm)	CHO	GFP, Antibiotic resistant gene	166	
			Femtosecond Ti:sapphire laser	CHO, PtK2	GFP	167	
	Tissue	<i>In vivo</i>	Multiple cells	Ho:YAG laser	MatLu, UM-UC3, LLC-PK1	GFP	241, 242
			<i>In vivo</i>	Nd:YAG laser SHG (532 nm)	Skin (rat)	GFP	243
				Femtosecond Ti:sapphire laser	Muscle (mouse)	GFP, Luc, Lac Z, mEpo	202
<i>Ex vivo</i>	Ho:YAG laser	Kidney (porcine)	GFP	181			
Laser-induced stress waves	Cultured cells (<i>in vitro</i>)	Multiple cells	Nd:YAG laser SHG (532 nm)	NIH3T3, others	GFP	207, 210	
			Nd:YAG laser (1064 nm)	Plant cells (rice, others)	siRNA	209	
	Tissue	<i>In vivo</i>	Nd:YAG laser SHG (532 nm)	Skin (rat), Brain (mouse)	GFP, Luc, Lac Z	206, 208	
Dye-assisted laser optoporation	Cultured cells (<i>in vitro</i>)	Single cell	Argon ion laser (CW)	NIH3T3, others	GFP, CAT, Lac Z	163, 185	
Particle-assisted laser optoporation	Cultured cells (<i>in vitro</i>)	Multiple cells	Femtosecond Ti:sapphire laser	NIH3T3, C166-GFP	siRNA	189, 191	
Photochemical internalisation	Cultured cells (<i>in vitro</i>)	Multiple cells	CW diode lasers	HCT116, others	GFP	194	
	Tissue	<i>In vivo</i>	CW diode laser (689 nm)	Conjunctiva (rat)	Venus (SEYFP-F46L)	197	

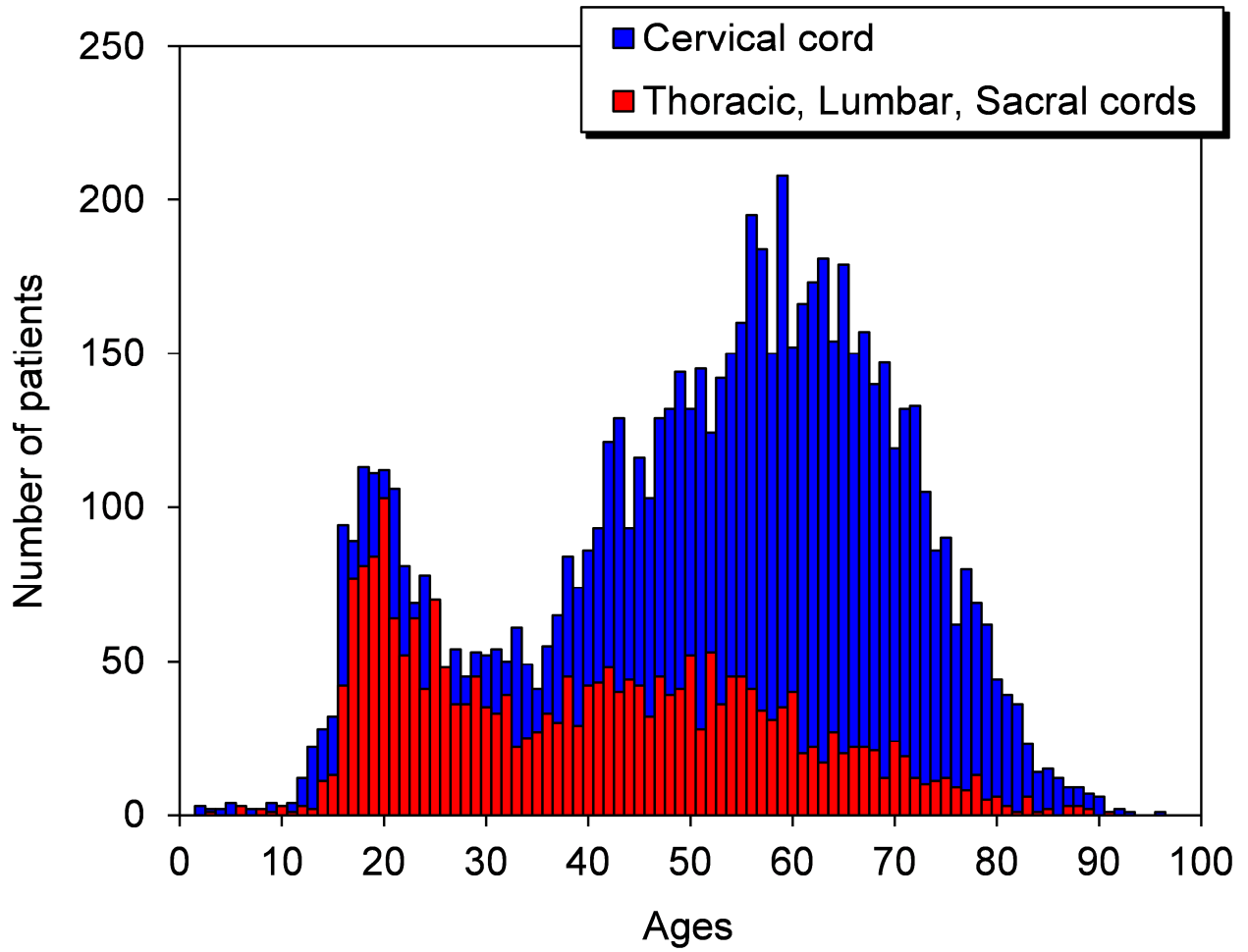


Fig. 1-1 Age distributions of the patients with spinal cord injury in Japan (from 1990 to 1992) [3].

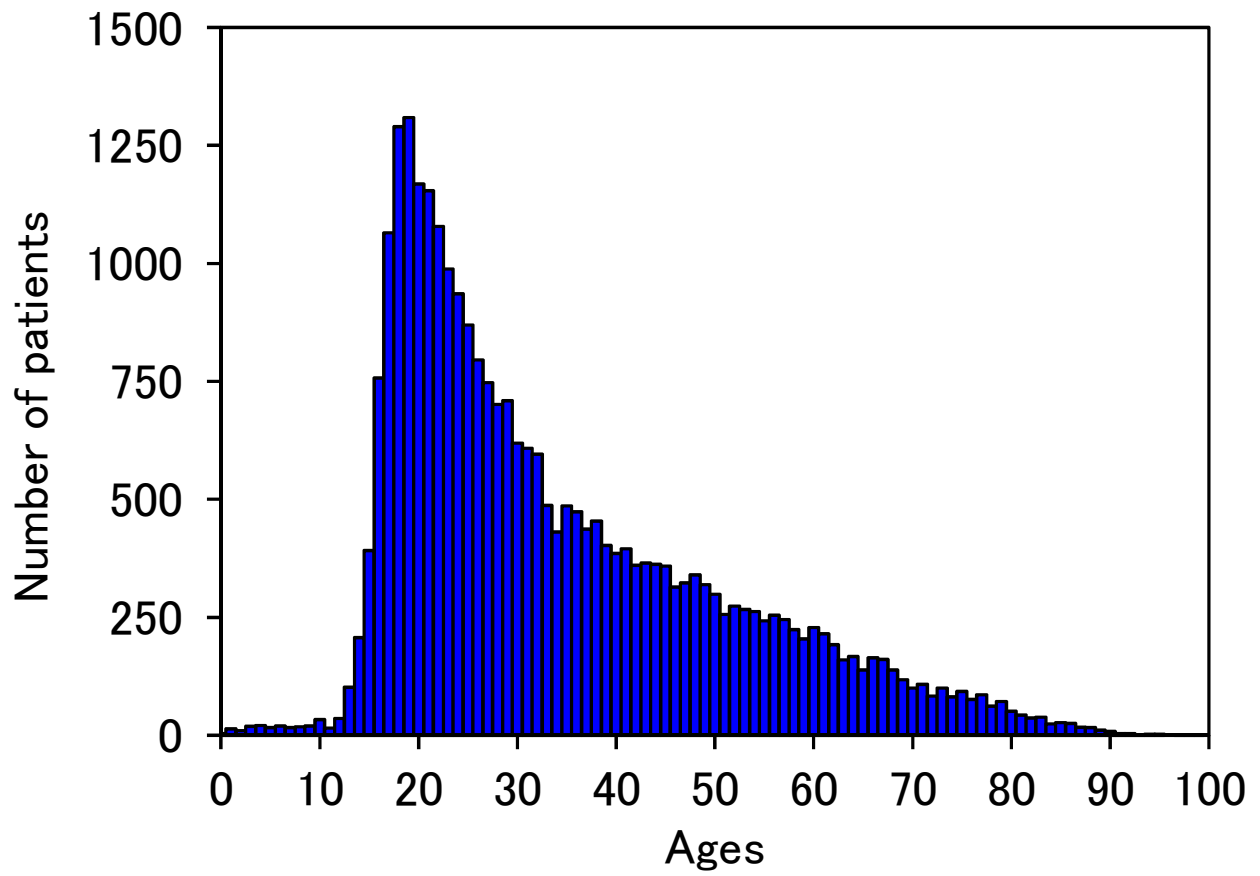


Fig. 1-2 Age distribution of the patients with spinal cord injury in the United States in 2011 [6].

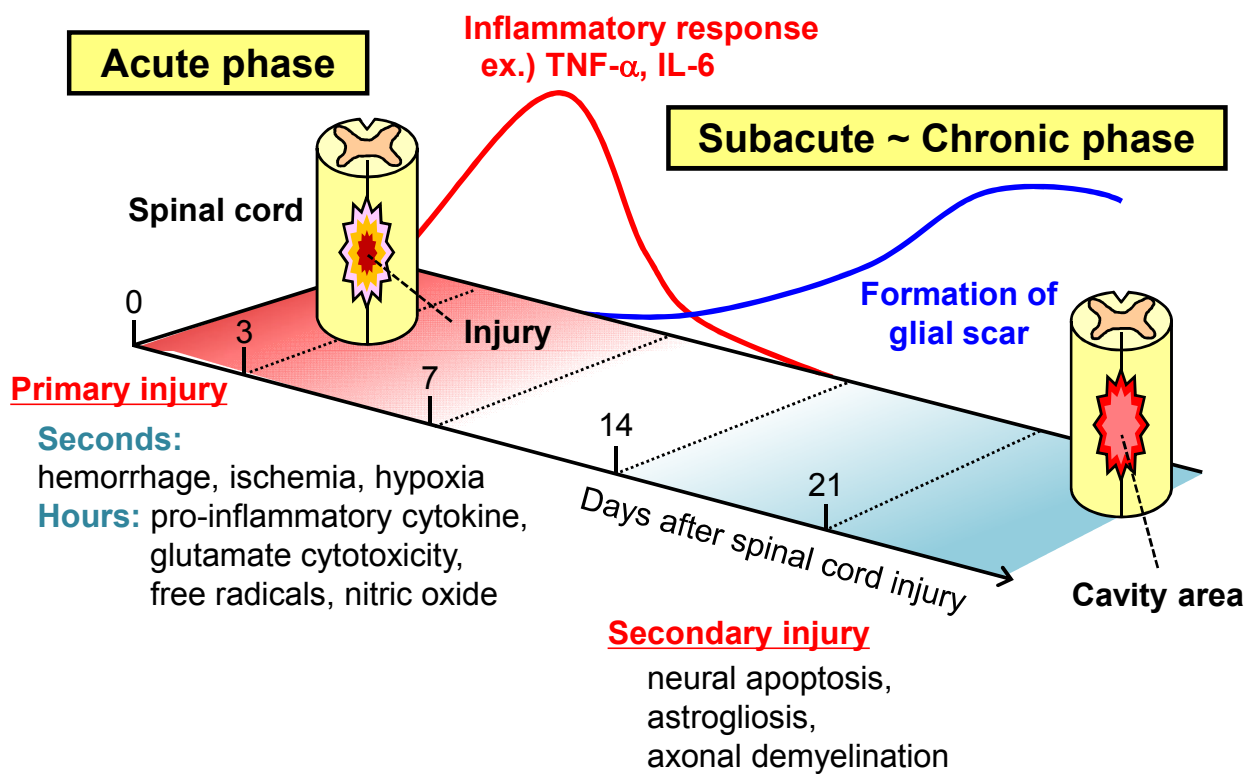


Fig. 1-3 Time-dependent changes in the pathogenic state of spinal cord injury.

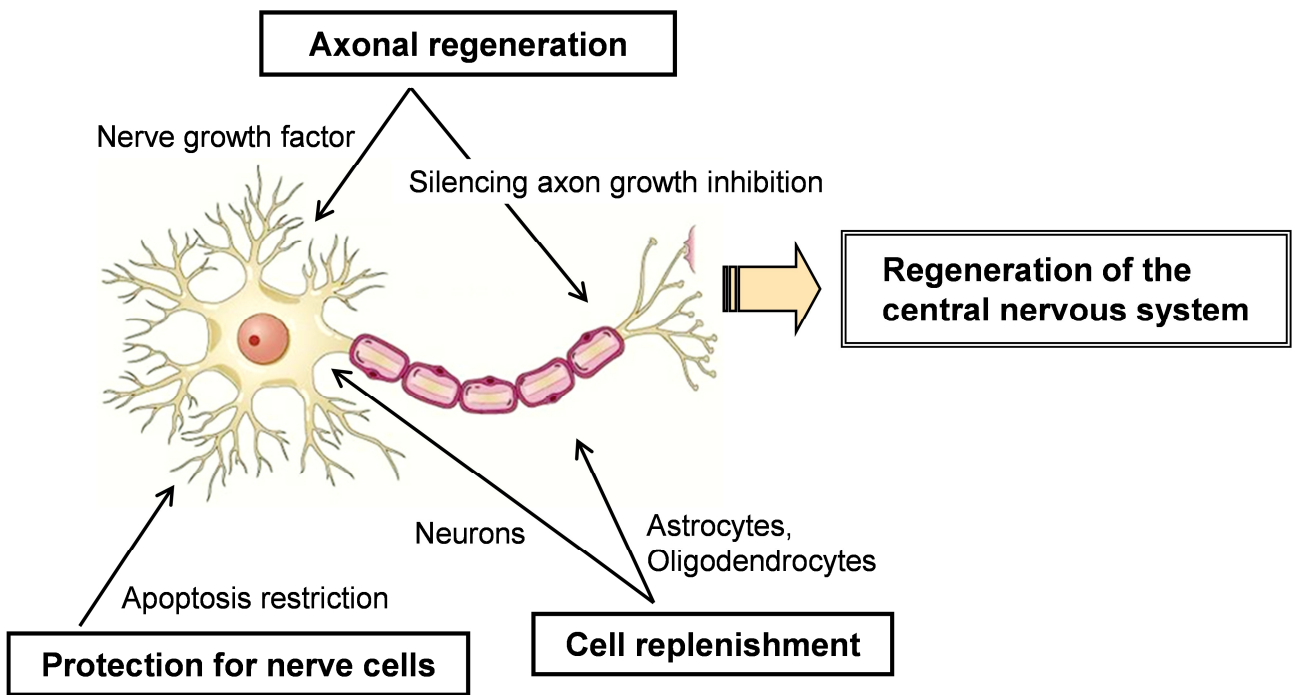


Fig. 1-4 Therapeutic strategies for spinal cord injury [11].

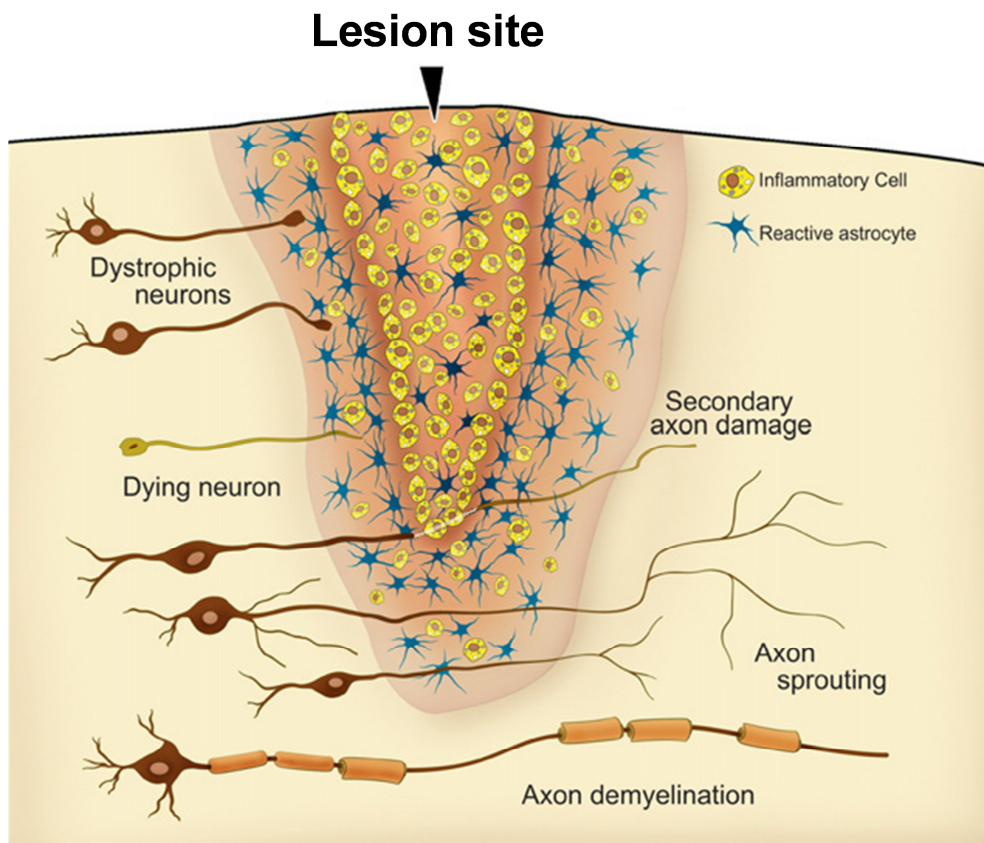


Fig. 1-5 Secondary damage after spinal cord injury and the inhibitory factors for axonal regeneration [244].

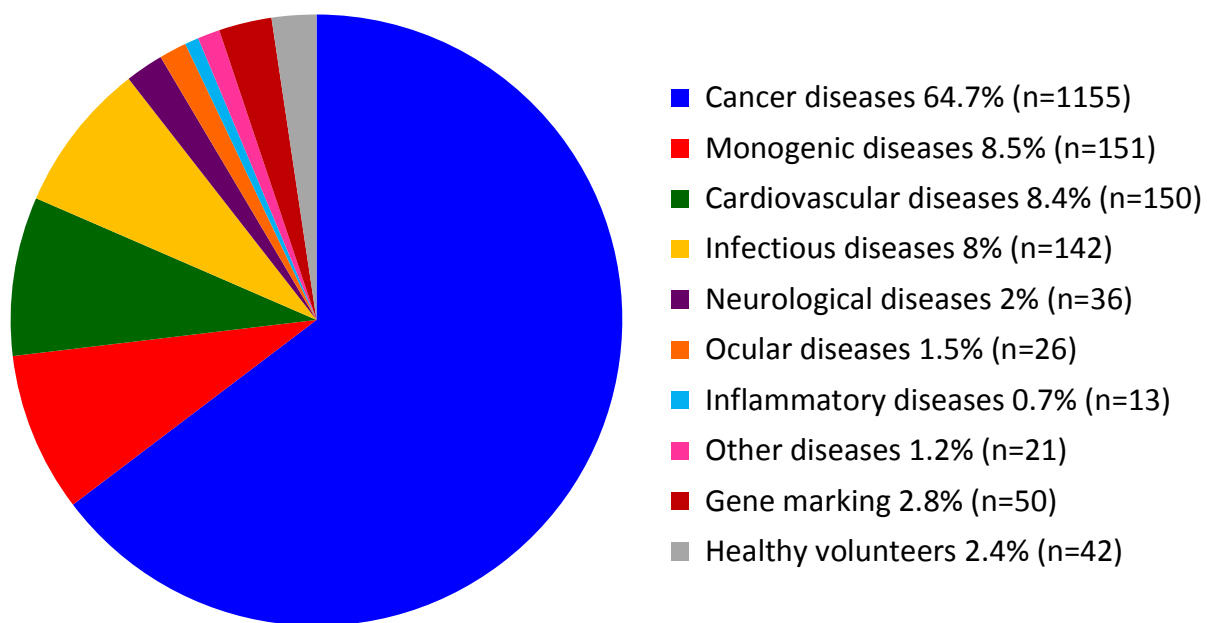


Fig. 1-6 Indications addressed by gene therapy clinical trials which were performed from 1989 to 2011 [74].

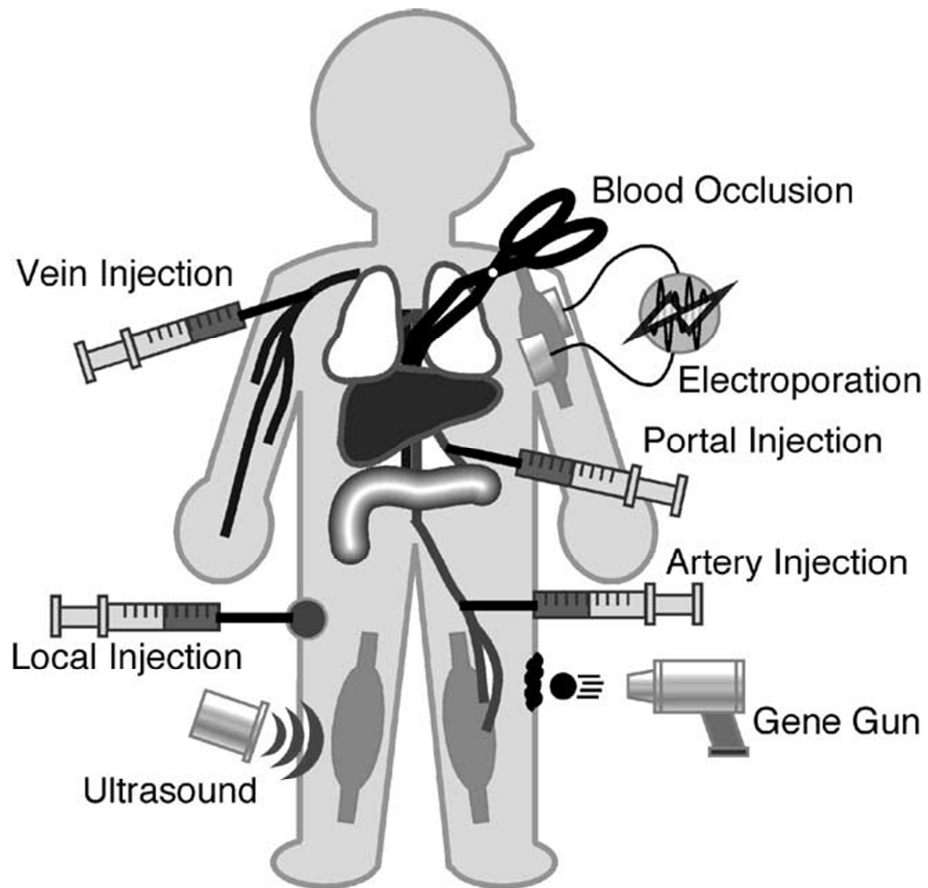


Fig. 1-7 Overview of nonviral gene delivery technologies [75]. Various injection routes of plasmid DNA solution and enhancing strategies for the efficient uptake are outlined.

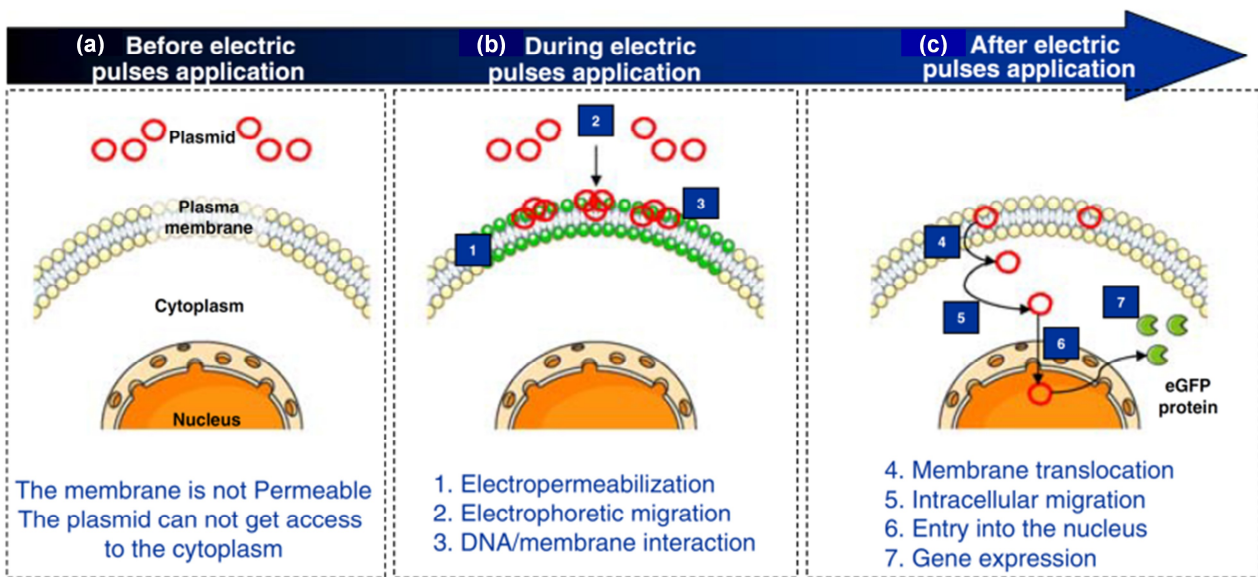


Fig. 1-8 Possible mechanism of gene transfection using electroporation [134]. (a) Before applying electric pulses, no natural permeabilization of DNA molecules on plasma membrane is observed. (b) During electric pulses application, DNA molecules undergo the electrophoretic migration to the plasma membrane and interact with the permeabilized membrane. (c) After electric pulses application, DNA translocation into the cytoplasm occurs several minutes after the electric pulses, and then plasmid DNA migrates into the cytoplasm.

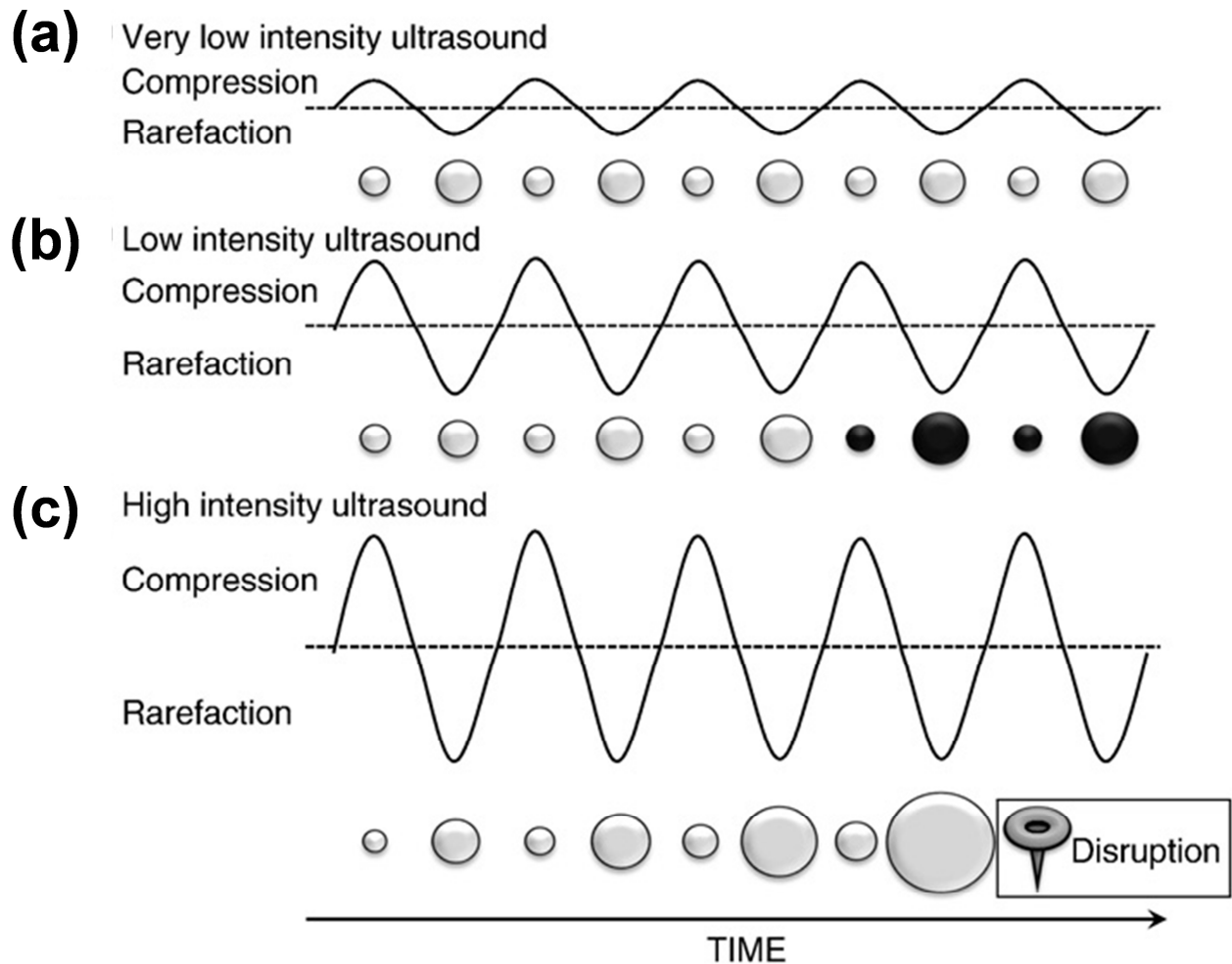
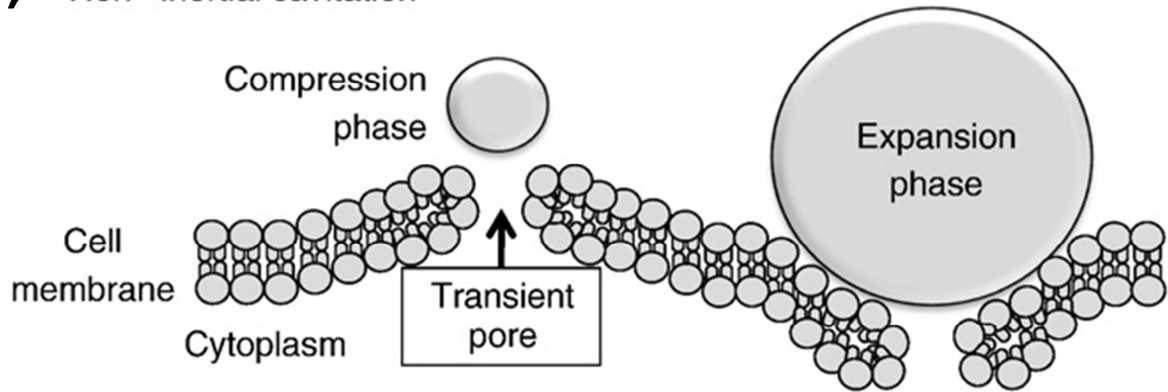
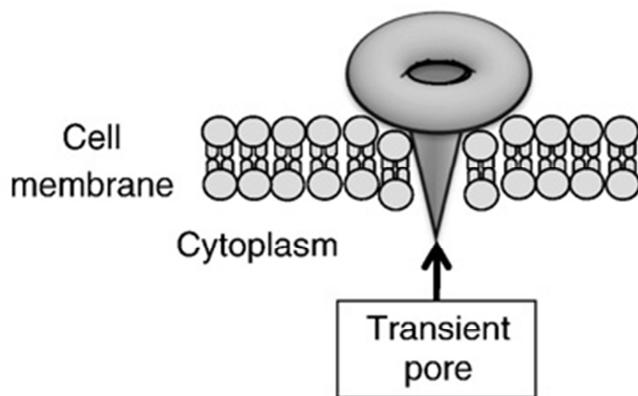


Fig. 1-9 Scheme showing microbubble behavior in acoustic fields [151]. (a) Very low intensity ultrasound induces linear oscillation of the microbubble. (b) Low intensity ultrasound induces oscillation of the microbubble with a gradual increase in microbubble diameter until it reaches a resonant diameter, at which point stable oscillation occurs (filled black circles). (c) High intensity ultrasound causes a rapid increase in the diameter of the microbubble for a few cycles, which induces bubble disruption.

(a) Non –inertial cavitation



(b) Inertial cavitation



(c)

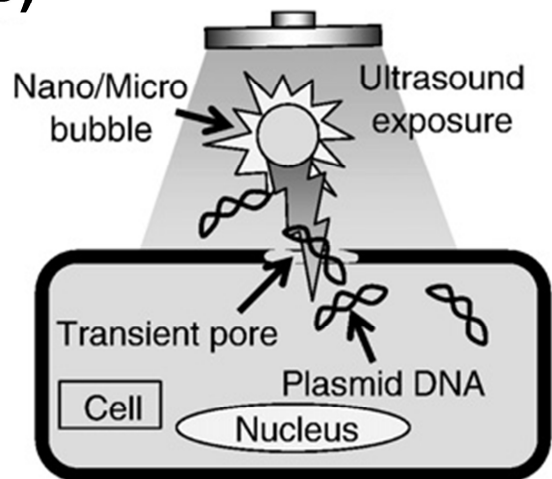


Fig. 1-10 Scheme showing the pore formation in the cell membrane by oscillating or disrupting microbubble [151]. (a) The pushing and pulling behavior (non-inertial cavitation) of the microbubble and (b) the collapse of microbubbles (inertial cavitation) cause rupture of the cell membrane creating pore allowing trans-membrane flux of fluid and macromolecules such as plasmid DNA and oligonucleotides (c).

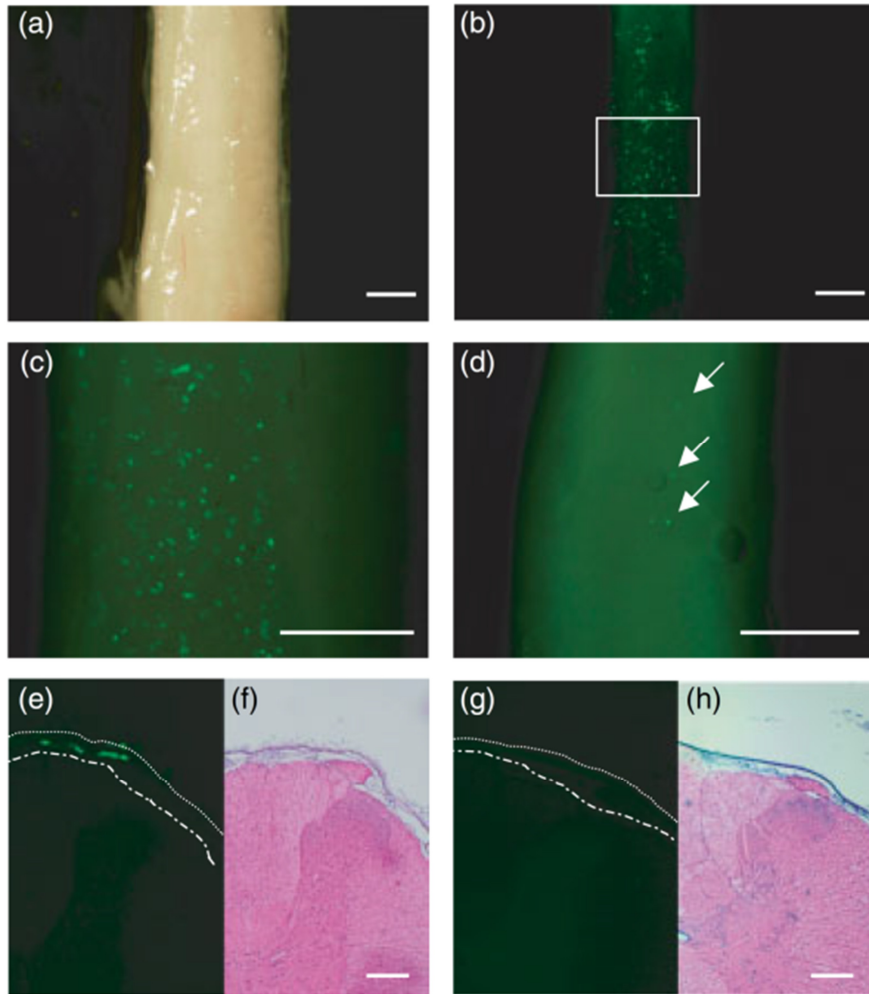
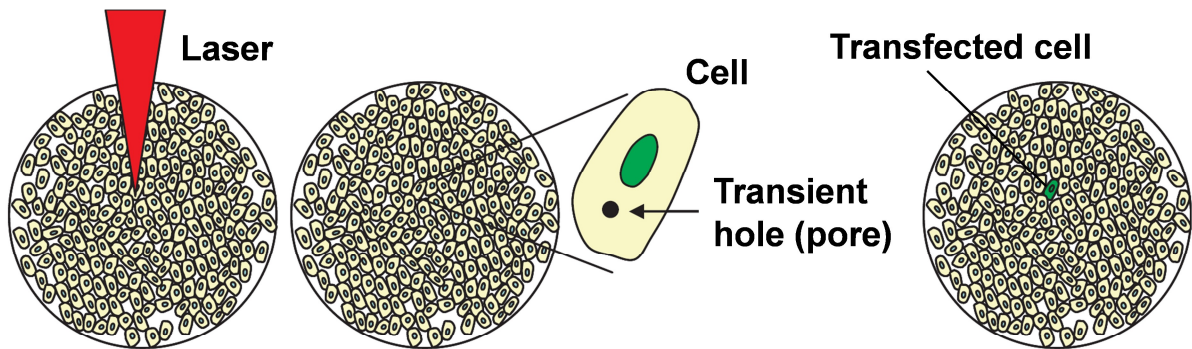


Fig. 1-11 Local gene expression in intact rat spinal cords using ultrasound-enhanced microbubbles [122]. Typical example of transfected cells at 3 days after Venus gene transfer using ultrasound-mediated microbubbles. (a) Stereomicroscopic view of dorsal part of thoracic spinal cord. (b) Fluorescent stereomicroscopic images after ultrasound microbubbles-mediated gene transfer. (c) Magnified image of rectangular region shown in (b). (d) Fluorescent stereomicroscopic image after injecting naked plasmid DNA alone. Arrows mean a small amount of transfected cells by naked plasmid DNA alone. (e-h) Coronal sections of thoracic spinal cord: Fluorescent image (e) and HE staining (f) after addition of ultrasound and microbubbles, fluorescent image (g) and HE staining (h) after injection of naked plasmid DNA alone. Upper dotted line in (e) and (g) is the outer layer of the dura mater, and lower dotted line shows the surface of the parenchyma. The ultrasound conditions were as follows: intensity 0.4 W/cm^2 , frequency 1 MHz , exposure time 5 s , and duty cycle 20%. (a-d: bar = 1 mm , e-h: bar = $200 \mu\text{m}$)

(a) Optoinjection



(b) Optoporation

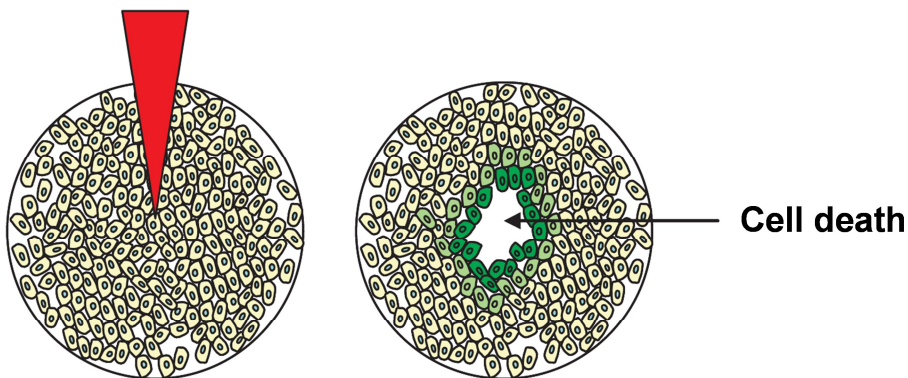


Fig. 1-12 Two different modes of gene transfection using direct laser irradiation [184].

(a) Optoinjection occurs when a tightly focused laser beam punctures a hole in the membrane of a single cell. Each cell must be individually processed. (b) With optoporation, a high-energy laser beam focused on the culture substrate causes a mechanical damage for cells that kills all the cells in the proximity of the laser spot. At some distance from the laser spot, the cells are transfected. This method causes a great deal of cell death and different degrees of cell loading based on the distance from the laser spot.

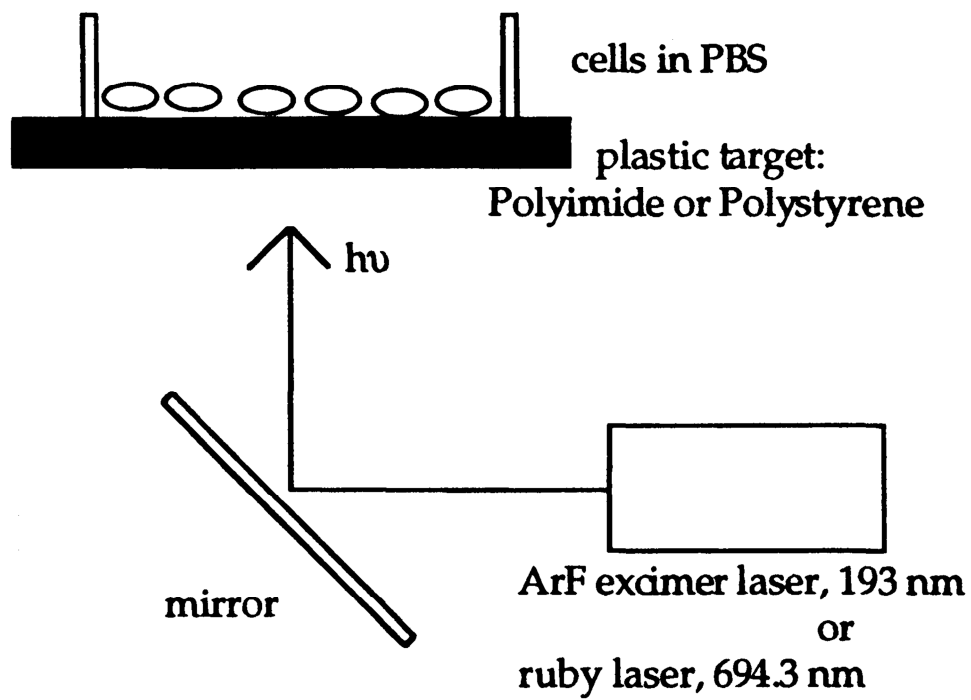


Fig. 1-13 Experimental diagram of molecular delivery using LISWs *in vitro* [228]. The irradiant spot diameter was arbitrarily controlled by adjusting the sample stage. The laser pulse was totally absorbed by the target so that the cultured cells were not exposed to the laser irradiation.

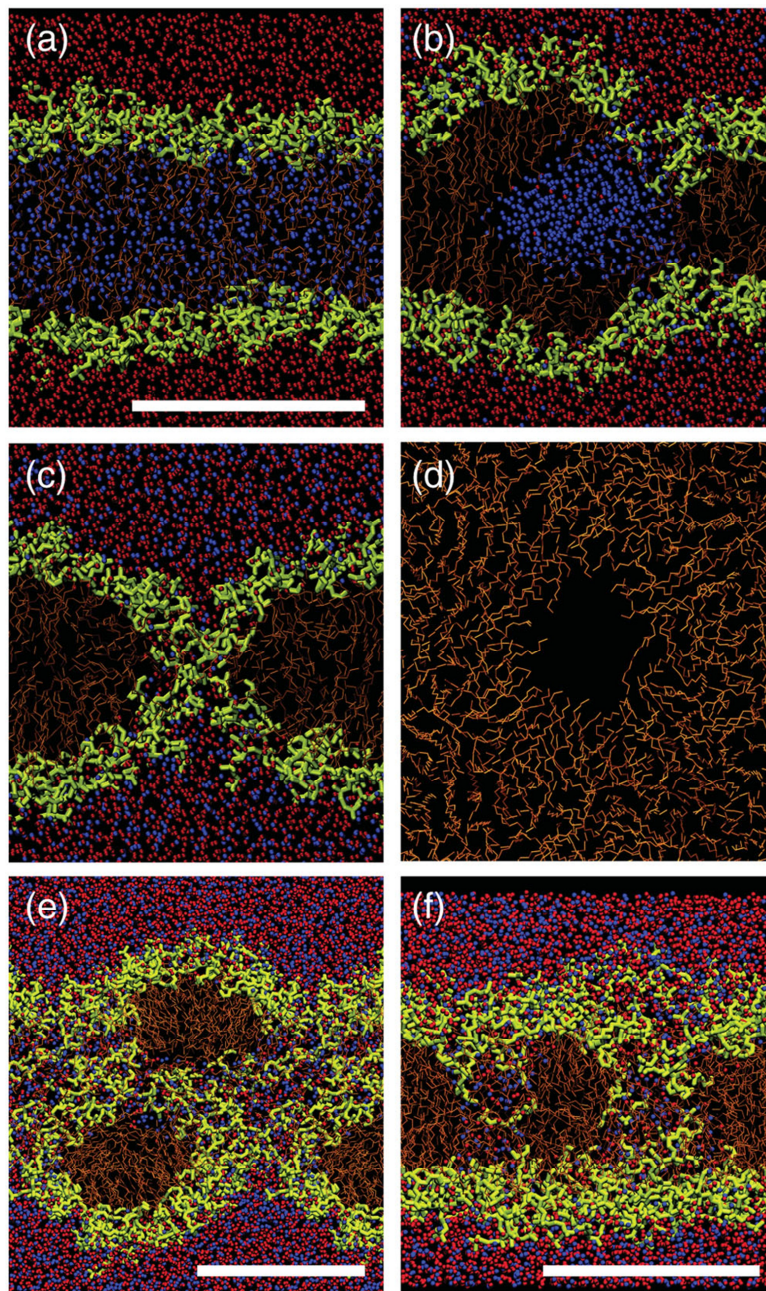


Fig. 1-14 Self-organization process of a stable pore structure in a phospholipid bilayer which was stimulated by stress wave radiation for the membrane permeabilization [240]. Typical processes of the spontaneous pore formation were observed: (a) $t = 0$ ps, (b) $t = 600$ ps, and (c) $t = 2000$ ps. (d) Top view of the pore and only chains. (e, f) Side views of micelle-like and multi-pore structures, respectively. The headgroups of lipids are shown in yellow bars, the hydrophobic chains in orange bars, water molecules initially outside the bilayer are shown in red spheres, and the water molecules inserted are shown in blue spheres. The white bar in (a), (e), and (f) corresponds to 4 nm.

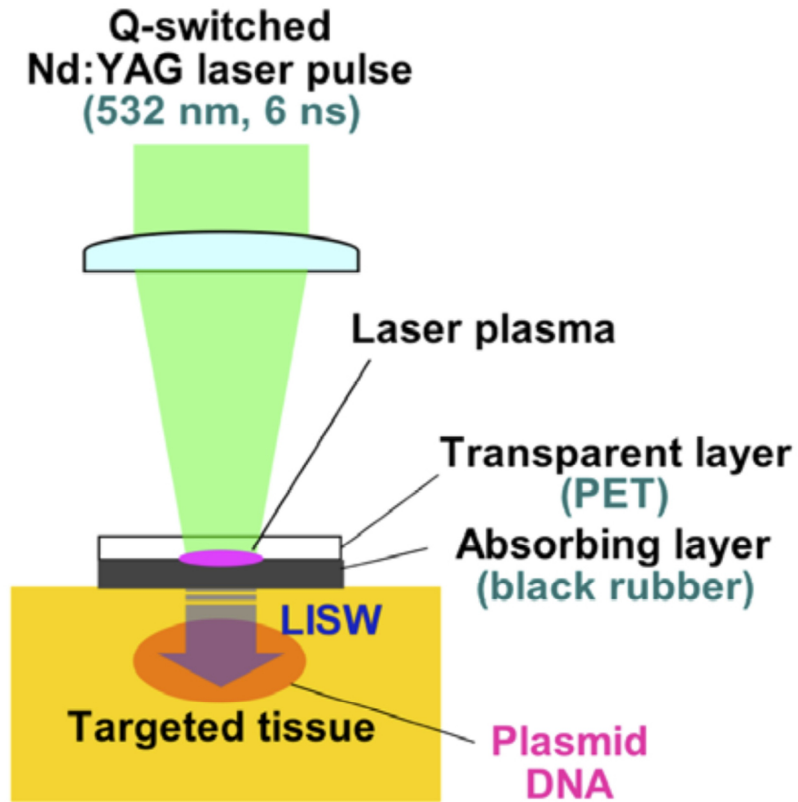


Fig. 1-15 Schematic of gene transfection using LISWs. Laser-induced plasma is confined by placing optically transparent material (polyethyleneterephthalate, PET) on a laser-absorbing target, resulting in an increase in the impulse of LISWs [246].

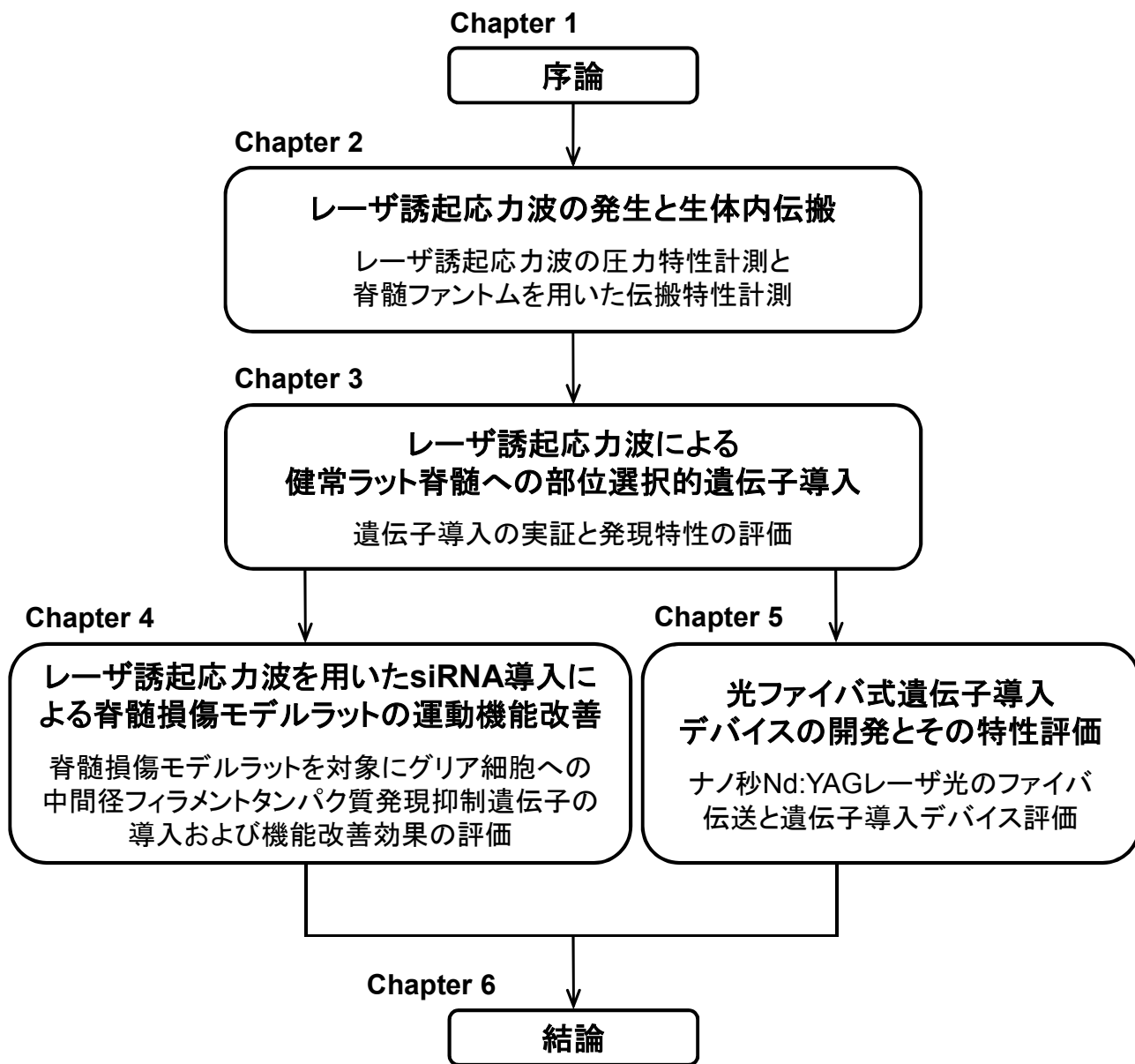


Fig. 1-16 Flow chart of this dissertation.

第 2 章

レーザ誘起応力波の発生と生体内伝搬

2.1 はじめに

LISW による遺伝子導入法は、レーザーの高い空間制御性と光ファイバを用いた経カテーテル的応用の潜在的な能力を備えるので、脊髄損傷の遺伝子治療に有望な技術の一つと考えられる。応力波による細胞内への分子送達の機序は完全には明らかになっていないが、圧力波パルス作用で細胞膜を構成する脂質二重層に“可逆的な”構造変化を起こすことが最近の研究で明らかになっている[1, 2]。LISW は生体内を伝搬する粗密波であることから、LISW の作用による脊髄組織の局所への遺伝子導入を達成するためには、その生体内伝搬の物理的特性を知ることが重要となる。特に、脊髄は管状の椎骨(vertebra)で囲まれた神経組織であり、椎骨の周囲は筋組織や脂肪などの軟組織が取り囲む構造になっているため (Fig. 2-1) [3, 4], 応力波パルス印加時の伝搬特性の調査は必要不可欠である。脊髄への LISW 適用方法として、臨床で頻繁に用いられている椎弓切除術を施した後の適用、またはより非侵襲的な方法として椎骨を介しての適用が考えられる。本章では、まず LISW の発生機構と生体内における LISW の伝搬理論を説明し、その後、この 2 通りの LISW の適用方法について、脊髄の音響特性を模擬したファントム中の伝搬特性について述べる。

2.2 レーザ誘起応力波の物理

パルスレーザー光を固体材料に照射すると、材料内に応力波が発生する。その特性は、レーザーの波長、パルス幅、フルエンス、光強度、および固体材料の光学的・機械的特性に依存する。レーザーアブレーションのフルエンス閾値以下では、レーザーエネルギーの吸収によって光侵達長内の一定体積が急激に熱膨張する。光侵達長は、光の減衰係数(吸収係数と散乱係数の和)の逆数で定義される実効的な光の到達距離である。熱膨張は照射材料を構成する分子が電子励起状態から緩和する過程で発生した熱によって生じるが、照射レーザーのパルス幅 τ_p よりも応力緩和時間 τ_{str} が短いと、熱弾性過程による応力波(熱弾性波)パルスが発生する[5, 6]。

$$\tau_p \ll \tau_{str} = \frac{1}{\mu_a c_0} \quad (2.1)$$

ここで、 μ_a は吸収係数、 c_0 は媒質内の音速である。レーザーフルエンスが材料のアブレーション閾値を越えると、アブレーション飛散物による反力が発生する。さらにレーザーフルエ

ンスが高くなると材料表面において光学的絶縁破壊(laser-induced optical breakdown)が生じ、プラズマの膨張に伴うより高圧の応力波が発生する。これらの応力波発生機構の境界は明確でなく、実際には複数の機構が同時に働いているが、支配的機構は照射レーザー強度が大きくなるにつれて熱弾性過程、アブレーションプルームの反力、およびプラズマ膨張と変化する[7] (Fig. 2-2). その変化とともに発生する圧力値は高くなる。

短パルスレーザーによる応力波の発生に関しては、1964年のCaromeらの報告以後[8]、現在に至るまでにその圧力特性に関する広範な研究が進められている[9-14]。レーザーパルスで誘起される応力波と生体の相互作用として、1990年代前半までは殺細胞効果または組織損傷の報告が中心であった。しかし、1995年以降、その殺傷閾値以下の圧力作用で細胞膜の透過性亢進作用があることが相次いで報告された[10-20]。これまでの数多くの研究成果から、ピーク圧力(peak pressure)、圧力上昇速度(stress gradient)、圧力積分値(impulse)の3つの物理量が細胞膜透過性の亢進に寄与することが実験的に示されている[21-28]。本研究では、これらの結果に基づき上記3つの物理量の増大に伴って遺伝子導入効率も上昇させることができると考え、最も効率的に高いピーク圧力と圧力上昇速度を得ることができるプラズマ膨張による機構が支配的となる応力波を用いることとした。固体材料表面に生じたプラズマの膨張を透明材料で閉じ込めることで圧力積分値を大きくすることも可能である[29]。例えば、Leeらの報告によれば、黒色ポリスチレン板(厚さ1 mm)へのQスイッチ・ルビーレーザー(パルス幅28 ns)照射で発生させた応力波と、その黒色ポリスチレン板に透明プラスチック板(厚さ~1 mm)を接着させ、プラズマ膨張を閉じ込めて発生させた応力波を比較すると、プラズマ閉じ込めによって、より低いフルエンス(7 J/cm^2 から 5 J/cm^2)でも同等のピーク圧力の応力波を発生でき、さらに応力波の半値全幅(full width at half maximum, FWHM)が110 ns から 490 ns まで約4.5倍に増大することを示している[29]。このとき、皮膚への薬剤送達の侵達長もまた50 μm から 400 μm まで8倍大きくなったと報告している。以下、本研究で用いるレーザー誘起プラズマによる応力波をLISWと表記する。

ここまで定性的に述べた、固体材料へのパルスレーザー照射で発生するプラズマの膨張に伴う応力波(LISW)の発生機構を、Fabbroらによる1次元モデルを用いて説明する[30-32]。Figure 2-3において、上方から照射されたレーザーエネルギーは上の透明層(optically transparent material)を通過し、下の光吸収固体材料(laser-absorbing material)で吸収される。このとき固体材料表面近くは加熱され、プラズマは透明材料により閉じ込められ、材料の境界における内圧が増大する。時刻 t において発生したプラズマの厚さ $L(t)$ は、

$$L(t) = \int_0^t [u_1(t) + u_2(t)] dt \quad (2.2)$$

と表される．ここで， u_i はプラズマの膨張速度であり，添え字 $i=1, 2$ はそれぞれ透明材料と固体材料を表す．このとき，レーザ生成プラズマがさらにレーザエネルギーを吸収することでその内部エネルギーは増大する．この過程はフェムト秒レーザでは生じない．プラズマによるレーザの吸収過程は逆制動放射，すなわちレーザによるプラズマ中の電子のエネルギー吸収(加速)であるため，その吸収係数は以下の式で表される[33-35]．

$$\alpha_{\text{Plasma}} \approx \frac{e^2 \tau / (m \varepsilon_0 c n)}{1 + (\omega \tau)^2} \times \frac{\int I(t) \rho_e(t) dt}{\int I(t) dt} \quad (2.3)$$

ここで， e は電子の電荷， τ は電子とイオンの衝突時間， m は電子の質量， ε_0 は真空の誘電率， c は光速， n はプラズマの屈折率， ω はレーザの角周波数， I はレーザ光強度， t は時間， ρ_e は電子密度を表す．プラズマ周波数 $\omega_p = \sqrt{\rho_e e^2 / m \varepsilon_0}$ を用いれば，プラズマの誘電率を ε として， $n^2 = \varepsilon / \varepsilon_0 = 1 - (\omega_p / \omega)^2$ の関係を持つ．(2.3)式から，ある一定時間で光強度が一定となる矩形のレーザパルス($I(t) = I_0$)であれば，プラズマによるレーザの吸収は電子密度 ρ_e に依存することがわかる．電子密度 ρ_e は次のようなレート方程式で表される[14]．

$$\frac{d\rho_e}{dt} = \left(\frac{d\rho_e}{dt} \right)_{\text{mp}} + \eta_{\text{aval}} \rho_e - \eta_{\text{diff}} \rho_e - \eta_{\text{rec}} \rho_e^2 \quad (2.4)$$

ここで，右辺第1項は多光子吸収による光電離，第2項はアバランシェ電離，第3項は電子の拡散，第4項は電子の再結合を示す． η はそれぞれの割合を示す係数である．

光吸収体の表面付近で発生したプラズマの膨張速度は次式で表される．

$$P = \rho_i V_i u_i = Z_i u_i \quad (2.5)$$

ここで， P は応力波の圧力， ρ は媒質の密度， V は応力波の伝搬速度， Z は音響インピーダンスを表す．上の透明層が理想気体(プラズマ膨張型)のときには，

$$V_i = \sqrt{\frac{\gamma+1}{2} \frac{P}{\rho_i}} \quad (2.6)$$

が成り立つ。ここで、 γ は定圧モル比熱と定積モル比熱の比である。(2.2)式, (2.5)式, (2.6)式より時刻 t における固体材料表面での応力波の圧力 $P(t)$ は,

$$P(t) = K \left(\frac{dL(t)}{dt} \right)^2 \quad (2.7)$$

となる。ここで、 $K = (\gamma+1)\rho_0/8$, $2/\rho_0^{1/2} = 1/\rho_1^{1/2} + 1/\rho_2^{1/2}$ である。また、上の透明層が固体材料(プラズマ閉じ込め型)のときには、音響インピーダンス $Z_i = \rho_i \cdot V_i$ は一定と仮定することができるので、(2.2)式と(2.5)式から次式が得られる。

$$P(t) = \frac{Z}{2} \frac{dL(t)}{dt} \quad (2.8)$$

ここで、 $2/Z = 1/Z_1 + 1/Z_2$ である。

固体材料およびプラズマに吸収されたレーザエネルギーは、プラズマ膨張と内部エネルギーの増加に使われる。微小時間 Δt の間にプラズマの厚さは ΔL だけ増加し、レーザエネルギー $I(t)\Delta t$ により単位面積に与えられるエネルギーは、内部エネルギー $E_i(t)$ (単位体積あたりのエネルギー)の増加 $\Delta[E_i(t)L]$ と圧力のした仕事 $P(t)\Delta L$ に分配される。

$$I(t) = P(t) \frac{dL}{dt} + \frac{d[E_i(t)L]}{dt} \quad (2.9)$$

内部エネルギー $E_i(t)$ が熱エネルギー $E_T(t)$ に変化する割合を α とすれば、 $(1-\alpha)$ は気体のイオン化に使われる。理想気体では、圧力 P と熱エネルギー E_T の間に

$$P(t) = \frac{2}{3} E_T(t) = \frac{2}{3} \alpha E_i(t) \quad (2.10)$$

の関係が成り立つ。この式から(2.9)式は次式のようになる。

$$I(t) = P(t) \frac{dL(t)}{dt} + \frac{3}{2\alpha} \frac{d}{dt} [P(t)L(t)] \quad (2.11)$$

レーザパルスをレーザ強度 I_0 、パルス幅 τ の方形波、プラズマの厚さを $L(0) = 0$ と仮定すると、パルスレーザ照射間の圧力は一定となる。よって、(2.7)式と(2.11)式を用いると、プラズマ膨張型の場合には、圧力 P とプラズマの厚さ L は

$$P = \left(\frac{2\alpha}{2\alpha + 3} \right)^{2/3} \times K^{1/3} \times I_0^{2/3} \quad (2.12)$$

$$L(\tau) = P^{1/2} \times K^{-1/2} \times \tau \quad (2.13)$$

と表される。これより、発生する LISW の圧力はレーザ光強度の $2/3$ 乗に比例することがわかる。一方、(2.8)式と(2.11)式を用いると、プラズマ閉じ込め型の場合には

$$P = \left(\frac{\alpha}{2\alpha + 3} \right)^{1/2} \times Z^{1/2} \times I_0^{1/2} \quad (2.14)$$

$$L(\tau) = 2 \times Z^{-1} \times P \times \tau \quad (2.15)$$

と表される。したがって、発生する LISW の圧力はレーザ強度の $1/2$ 乗に比例する。また、時刻 $t = \tau$ においてレーザ照射が終了し、プラズマが断熱変化で冷却するとき、 $t \geq \tau$ における圧力は以下の式で表される。

$$P(t) = P(\tau) \left(\frac{L(\tau)}{L(t)} \right)^\gamma \quad (2.16)$$

この式はプラズマ膨張型、プラズマ閉じ込め型のいずれにも適用できる。よって、プラズマを閉じ込めることで $L(t)$ の増大が制限され、プラズマ膨張型に比べてレーザ照射後の圧力も高くなる。

2.3 レーザ誘起応力波の伝搬

応力(stress)は、荷重によって固体内部に作用する単位面積あたりの力で定義される。単位面積あたりの力であるため、広義には圧力の一種である。LISW を生体に作用させたとき、生体内の媒質粒子は時間的に変動し、その変動は生体組織中を伝搬する。このとき媒質粒子の振動方向と振動の伝搬方向は一致しているため、それは音波(acoustic wave)と同様に縦波である。媒質の粗密が時間的に移動するので、LISW 自体の伝搬速度は媒質粒子の振動速度とは異なる。以下の式で示す圧力 p は、媒質中の粗密、すなわち圧力が上下する分の実効値を指しており[36]、粒子速度 u と圧力 p の比が音響インピーダンス $Z = p/u$ に相当する。

LISW の伝搬は、媒質粒子の振動状態が伝わっていくことであるため、振動のエネルギーが伝搬していることになる。そこで、媒質中において LISW の伝搬方向と垂直な面を単位面積あたり、単位時間あたりに通過するエネルギー量を応力波の強さ I_{ac} として、

$$I_{ac} = \frac{p^2}{\rho_0 c_0} \quad (2.17)$$

と表すことができる。ここで、 ρ_0 は媒質の密度、 c_0 は媒質内の音速である。また、波源から単位時間あたりに放射される応力波の全エネルギー量を P_{ac} とし、微小波源から全ての方向に対して一様に応力波が拡散(球面波として伝搬)するのであれば、波源からの距離を r として

$$I_{ac} = \frac{P_{ac}}{4\pi r^2} \quad (2.18)$$

と表すこともできる。(2.17)式と(2.18)式から、応力波のエネルギー E は

$$E = \frac{4\pi r^2}{\rho_0 c_0} \int p^2 dt \quad (2.19)$$

と表せる[37]。

有限の面積(波源)に加えられた外力により生じた応力波は、音波と同様に平面波として

伝搬した後で $z = z_f$ を境に球面波状に伝搬する[10] (Fig. 2-4). 波源を $z = 0$ とした場合, $z < z_f$ は near field (Fresnel zone), $z > z_f$ は far field (Fraunhofer zone)である. 波源の直径を D , 波長を λ_{ac} , 周波数を f_{ac} としたとき, $D/2 > \lambda_{ac}$ が満たされるならば, 波源から near field と far field の境までの距離 z_f は,

$$z_f = \frac{D^2}{4\lambda_{ac}} = \frac{D^2 f_{ac}}{4c_0} \quad (2.20)$$

と表される. これより, 平面波として伝搬する距離は周波数 f_{ac} に応じて変化することがわかる. また, Figure 2-4 に示すように, 球面波の幾何学的な拡散角 θ [rad]は

$$\theta = \arcsin\left(\frac{D}{2z_f}\right) \quad (2.21)$$

と表される.

応力波の伝搬とともに圧力が減衰していく原因として, 上述の幾何学的な「拡散」(距離減衰)の他に, 媒質の粒子運動に対する粘性による「吸収減衰」と媒質の音響的な不均一性による「散乱減衰」がある. 一般に, 生体中の応力波の圧力 p は, 媒質の散乱減衰と吸収減衰によって

$$p(z) = p_0 \exp(-\alpha z) \quad (2.22)$$

と表せる[38]. ここで, p_0 は圧力の発生初期値, α は減衰係数, z は発生源からの伝搬距離を表す. 媒質が音響的に均一で散乱減衰が無視できる場合には, α は吸収係数と同一と見なせる. 具体的には, 皮膚, 筋肉といった生体軟組織では, 実験的に MHz 帯の周波数範囲で吸収が周波数 f に比例する($\alpha = \alpha_0 \cdot f$)と仮定されることが多く, その係数 α_0 の値は 0.3 ~ 2 dB/cm/MHz となる[39].

2.4 レーザ誘起応力波の伝搬特性計測

2.4.1 レーザ誘起応力波の発生

LISW の発生に用いるレーザおよび固体材料について述べる。Vogel らの解析によると、パルス幅がピコ秒オーダー以下のレーザを固体材料に照射した場合にはアバランシェ電離が時間的に追従できず、ナノ秒レーザを固体材料に照射した場合と比べて電子密度は低くなる[40-42]。そのため、(2.3)式と(2.4)式からレーザエネルギーを効率的にプラズマに吸収させるためにはナノ秒レーザの利用が適している。一方、Mulholland らの報告によれば、細胞膜の透過性を亢進するためには LISW の圧力上昇時間を短くすることが有効である[21]。Zweig らにより、LISW の立ち上がり時間は、レーザ照射固体材料中の光侵達長が短い方が短くなることが実験的に確かめられている[43]。このため、使用するレーザの吸収係数が大きい固体材料を選ぶ必要がある。これらに加え、効率的に LISW を固体材料から生体内へと伝搬させるためには、固体材料と生体の音響インピーダンスをほぼ同じにし、両者の界面における反射を抑える必要がある。生体軟組織の音響インピーダンスは水のそれとほぼ一致し、約 $1.5 \times 10^6 \text{ Ns/m}^3$ である[38]。この点を踏まえ、本研究では固体材料として音響インピーダンス $1.5 \times 10^6 \text{ Ns/m}^3$ [38]の黒色天然ゴムを使用した。波長 500 ~ 900 nm の白色光を用いてこの黒色天然ゴムの吸収係数を計測すると、計測波長範囲内で光侵達長 5 μm 以下、すなわち吸収係数 $\alpha = 2000 \text{ cm}^{-1}$ 以上と大きいことから、この波長域でナノ秒パルス発振が可能な Q スイッチ・Nd:YAG レーザの第 2 高調波(波長 532 nm)を選定した。

以上に基づき、実験では光吸収体として厚さ 0.5 mm の黒色天然ゴム板を使用した。また、より高圧力で半値全幅の長い LISW を発生させるため、同ゴム板にプラズマ閉じ込め用の透明ポリエチレンテレフタレート(厚さ 1.0 mm)をアクリル樹脂用接着剤で接着した(Fig. 2-5 (a))。以下これら 2 層構造の光吸収体を「ターゲット」と表記する。そして、Q スイッチ・Nd:YAG レーザ(Brilliant b, Quantel)の第 2 高調波(波長 532 nm, パルス幅 6 ns)を平凸レンズ($f = 200 \text{ mm}$)で集光し、透明材料側からターゲットに照射することでプラズマ閉じ込め型の LISW を発生させた。これに対し、透明材料を用いず、レーザ光を空気中で直接光吸収体に照射するとプラズマ膨張型の LISW が発生する。Figure 2-5 (b)に示すように、ターゲットの黒色天然ゴムとポリエチレンテレフタレートは 1 パルスのレーザ照射で剥離し、2 パルス目以降ではプラズマ閉じ込め効果が減少するため、ターゲットは 1 パルス毎に交換し、圧力特性の再現性が高い LISW を発生させた。

2.4.2 レーザ誘起プラズマの計測

2.2 節で述べた通り、本研究ではプラズマ膨張を伴う、高圧力で圧力上昇速度の高い LISW を遺伝子導入に用いる。そこで、レーザ誘起プラズマの発生を検証するため以下の実験を

行った。Figure 2-6 にプラズマを観測するための実験装置図を示す。透明材料は用いず、空气中で波長 532 nm, パルス幅 6 ns の Q スイッチ・Nd:YAG レーザ光を黒色天然ゴム(厚さ 0.5 mm)に照射した際のプラズマ発光を, 高速ゲートシャッター内臓の CCD カメラ (C10054-22, 浜松ホトニクス)で撮影した。ゲート時間は 6 ns とし, パルス遅延器(DG535, 東京インスツルメンツ)を用いてレーザ照射からゲートまでの時間を遅延させ, 経時的なプラズマ発光の変化を撮影した。このとき, ターゲット上で反射した波長 532 nm の光を遮断するため, 検出部前方にホログラフィックノッチフィルタを設置した。また, ポリクロメータ(PMA-11, 浜松ホトニクス)を用いて波長 300 ~ 800 nm における発光スペクトルを計測した。ポリクロメータの露光時間は 1 μ s とし, レーザ照射直後の発光を検出した。照射レーザスポット径は全て 3 mm で一定とした。

2.4.3 レーザ誘起応力波の圧力測定

Figure 2-7 に LISW の圧力時間特性を測定するための実験装置図を示す。最初に, ハイドロフォンの検出面に超音波ゼリー(Echo Jelly, アロカ)を介して上述のターゲットを設置し, 透明材料側よりレーザを照射して LISW を発生させた(Fig. 2-7 (a))。ハイドロフォン (HNR-1000, Onda)の圧電素子はチタン酸ジルコン酸鉛(lead zirconium titanate, PZT)で, 素子部直径は 1.0 mm である。このハイドロフォンの応答周波数(± 6 dB)は 0.2 ~ 10 MHz, 指向角(-6 dB at 5 MHz)は 15° である。ターゲットの黒色ゴム表面におけるレーザスポット径は 3 mm とした。次に, 脊髄内における LISW の伝搬特性を調べるため, 脊髄の音響特性を模擬した厚さの異なるファントム(2, 4, 6 mm)を, ターゲットとハイドロフォンの間に挿入して LISW の圧力時間特性を計測した(Fig. 2-7 (b))。ここで用いた脊髄ファントムは, 超音波診断あるいは衝撃波結石破碎の研究で軟組織ファントムとして用いられるポリアクリルアミドゲル(polyacrylamide gel, 水分含有量 70%)[44]である。このゲルの音響インピーダンスや音波の減衰係数などの音響特性と弾性特性は, 脊髄とほぼ同等であることが実験的に確かめられている[44-47]。例えば, 音速は実際の脊髄組織(37.2°C)とファントム(20°C)でそれぞれ 1542 ± 3.3 m/s と 1605 ± 15 m/s, 密度は 1038 kg/m³ と 1073 ± 10 kg/m³ である[44, 45]。弾性波に対する周波数特性は, 周波数 1 ~ 10 MHz の範囲の減衰係数が脊髄とファントムでどちらも 0.1 ~ 1 dB/cm である[46, 48-50]。同様に, 脊髄に対する椎骨を介しての LISW 適用を模擬するため, 摘出したラット椎骨(厚さ 2 ~ 3 mm)を用いてその伝搬前後の LISW の圧力波形を計測した(Fig. 2-7 (c))。ここで用いた椎骨は, 第 3 章で述べる遺伝子導入実験で用いた Sprague-Dawley ラット(日本エスエルシー, メス, 体重 140 ~ 260 g)の第 10 胸椎である。

ハイドロフォンの出力信号は帯域 1 GHz のオシロスコープ(TDS680B, Tektronix)を用いて記録した。圧力計測は各計測で 3 回ずつ行い、LISW の圧力特性の指標となるピーク圧力、圧力上昇速度、圧力積分値の平均値±標準偏差を求めた。ここで、ピーク圧力の 10%から 90%に圧力値が変化するまでの時間を立ち上がり時間(rise time)とし、その間の圧力上昇分を立ち上がり時間で割った値を圧力上昇速度とした。圧力積分値 I_p は、次式で示す通り、正の圧力が持続する時間(duration of the first positive cycle, t_+)の積算圧力で定義される[22, 28].

$$I_p = \int_0^{t_+} p(t) dt \quad (2.23)$$

また、計測した LISW の周波数成分を解析するため、MATLAB (The MathWorks Inc.)を用いて圧力時間波形のフーリエ変換を行った。

2.4.4 レーザ誘起応力波伝搬の可視化

脊髄実質の太さは、ヒトの場合は約 10~15 mm, ラットの場合でもおよそ 3~4 mm である。脊髄表面から LISW を適用した場合、部位選択的な遺伝子発現を得るためには、標的部位に対して一定の指向性を有しながら伝搬することが重要となる。そこで、光学的可視化法の一つであるシャドウグラフ法を用いて脊髄内における LISW の伝搬を可視化した。シャドウグラフ法(shadowgraphy)は、流体の密度変化すなわち屈折率変化による光の明暗を観察する方法である。観測する流体が $0 \leq z \leq z_1$ にあると仮定して、その流体の密度 ρ が x , y 方向に変化する場合、 z 軸上の点光源($z < 0$)から投射された光は流体の密度変化によって屈折する。このとき、同じく z 軸上($z > z_1$)に設置されたスクリーン上(撮像面)での明るさの変化 ΔI は

$$\Delta I \propto \frac{\partial^2 \rho}{\partial x^2} + \frac{\partial^2 \rho}{\partial y^2} \quad (2.24)$$

となり、媒体密度の二次微分と比例関係にある[51]。この関係式から、シャドウグラフ法による可視化で密度勾配の変化に比例したコントラストが得られることがわかる。また、媒質中における圧力伝搬を考えると、圧力と密度が断熱的に変化する場合、圧力の変化量

Δp は密度変化 $\Delta\rho$ の関数として

$$\Delta p = A \left(\frac{\Delta\rho}{\rho_0} \right) + \frac{B}{2} \left(\frac{\Delta\rho}{\rho_0} \right)^2 \quad (2.25)$$

と表される[38]. ここで, 第1項の係数 A は, 一定質量の体積変化に対する圧力変化を表す体積弾性率であり, 媒質中の音速 c_0 と密度 ρ_0 によって $A = \rho_0 c_0^2$ と与えられる. 第2項は, 媒質中でおおよそ1気圧($\approx 10^5$ Pa)を越える音圧を考える上で必要となる非線形現象を表す項である. (2.24)式と(2.25)式から, LISWの可視化によって現れるコントラストは圧力変化に依存することがわかる.

LISW伝搬の可視化実験の装置図をFigure 2-8に示す. ここで脊髄ファントムには25°Cの純水(音響インピーダンス 1.5×10^6 Ns/m³ [41]), 椎骨ファントムにはアクリル樹脂製の円形チューブ(音響インピーダンス $2 \sim 3 \times 10^6$ Ns/m³ [41])を用いた. 椎骨の音響インピーダンスは約 2.5×10^6 Ns/m³であることから[44], このファントムは応力波の伝搬(反射)特性を調べる上では適切と判断できる. LISWの波面を十分なコントラストで可視化するため, 第3章の遺伝子導入実験で対象とするラット脊髄の約2倍のスケールで脊髄の構造を模擬した. アクリル樹脂チューブの内径は14 mm, 外径は18 mm, その一部に穴を開け, ターゲットを設置して脊髄ファントム(純水)にLISWを伝搬させた(Fig. 2-8 (a)). LISWは, Qスイッチ・Nd:YAGレーザー(HOYA Continuum, Surelite I)の第2高調波(波長532 nm, パルス幅6 ns)を平凸レンズ($f = 200$ mm)で集光し, 透明材料側からターゲットに照射することで発生させた. レーザフルエンスは 0.3 J/cm², 照射レーザースポット径は6 mmとした. 照明用の光源には, ロードミン6GにQスイッチ・Nd:YAGレーザー(Brilliant b, Quantel)の第2高調波(波長532 nm, パルス幅6 ns)を平凸レンズ($f = 20$ mm)で集光照射して発生させた点光源を用いた. 点光源からの光を平凸レンズ($f = 150$ mm)によって平行光にした後, 脊髄ファントムと椎骨ファントムからなる脊髄モデルを設置した外寸法10 cm×10 cm×10 cm(壁厚2 mm)のアクリル製水槽内を透過させ, さらに平凸レンズ($f = 150$ mm)で集光し, CCDカメラ(XC-7500, Sony)にて撮影した. パルス遅延器(DG535, 東京インストルメンツ)によってLISW発生のためのレーザーと照明用レーザーにパルス遅延を発生させることで, LISWが伝搬する様子を2 μ s間隔で撮影した(Fig. 2-8 (b)).

2.5 実験結果

2.5.1 レーザ誘起プラズマ

レーザー誘起プラズマの発光はフルエンス 0.3 J/cm^2 以上で観察された。フルエンス 0.3 J/cm^2 のとき、プラズマ発光の経時変化を撮影した結果を Figure 2-9 に示す。レーザー照射からおおよそ 25 ns 後まで、プラズマの発光強度の増大が確認された。その強度の減少は増大時に比べると緩やかに進み、レーザー照射から $240 \mu\text{s}$ 後に発光はほぼ消失していた。このときのプラズマ発光スペクトルを Figure 2-10 に示す。波長 405 nm , 587 nm , 617 nm , 765 nm , 767 nm 付近にそれぞれ O (II), S (IV), O (IV), O (IV), S (IV)由来[52]と考えられる発光スペクトルが観測された。このうち酸素原子由来のスペクトルは、黒色天然ゴムの組成物がイオン化することで生成された自由電子が、周囲の原子および分子と衝突してイオン化するのに必要なエネルギーを有している、あるいは、光電界によって加速されてそのエネルギーに達することで、空気中の酸素がイオン化されたためだと考えられる。また、黒色天然ゴムは加硫プロセスにおいて硫黄が加えられているため、硫黄由来の原子発光スペクトルが得られたと考えられる。

2.5.2 レーザ誘起応力波の圧力測定

Figure 2-11 はレーザーフルエンスと発生した LISW のピーク圧力の関係を示したものである。計算値は、プラズマ膨張型とプラズマ閉じ込め型でそれぞれ(2.12)式と(2.14)式に基づき算出した。ここでは、空気の密度 $\rho_1 = 1.3 \text{ kg/m}^3$ 、天然ゴムの密度 $\rho_2 = 970 \text{ kg/m}^3$ 、天然ゴムの音響インピーダンス $Z_1 = 1.5 \times 10^6 \text{ Ns/m}^3$ 、ポリエチレンテレフタレータの音響インピーダンス $Z_2 = 1.8 \times 10^6 \text{ Ns/m}^3$ 、熱エネルギーへの変換率 $\alpha = 0.2$ 、二原子分子のモル比熱比 $\gamma = 1.4$ を用いた[30-32, 38, 53]。プラズマ膨張型の場合、実験で得られたピーク圧力と計算値はよく一致しているが、プラズマ閉じ込め型では実験値が計算値の $1/3 \sim 1/8$ 倍になった。これは、本実験で用いたターゲットの天然ゴムとポリエチレンテレフタレータが 1 パルスのレーザー照射で剥離してしまうことから、プラズマ閉じ込め効果が計算で仮定した状態ほど完全ではないためと考えられる。また、ターゲットの天然ゴムはプラズマ膨張による応力によって変形するため、媒質の圧縮が計算モデルで想定しているよりも実際の実験では弱くなることが影響している可能性も考えられる。

以下の実験では、プラズマ閉じ込め型の LISW を用いた。レーザーフルエンスが 0.3 J/cm^2 と 0.9 J/cm^2 のときの、厚さ $0, 2, 4, 6 \text{ mm}$ の脊髄ファントム(ポリアクリルアミドゲル)を

伝搬させて測定した LISW の圧力時間波形をそれぞれ Figure 2-12 と Figure 2-13 に示す．伝搬距離 0 mm はターゲットの直下(ファントムなし)で計測した圧力時間波形である．ターゲットにおいて発生した直後であるこの LISW の波形(Fig. 2-12 (a), Fig. 2-13 (a))を見ると，生成したレーザ誘起プラズマが急激に膨張したときに生じる鋭い圧力上昇が見られる．レーザフルエンス 0.3 J/cm^2 と 0.9 J/cm^2 でそれぞれ立ち上がり時間の平均は 53 ns と 40 ns であり，その後続く正圧の持続時間は平均 583 ns と 747 ns であった．正負の圧力が一定の周期で繰り返される超音波とは異なり，LISW は正圧主体の弾性波パルスであることがわかる．遺伝子導入法として使用される超音波のピーク圧力，周波数，作用時間はそれぞれ 1 MPa 未満，1～5 MHz，数分間であり，LISW が超音波とは大きく異なる圧力特性を有することがわかる．LISW の正圧は，レーザ照射によりプラズマ状態となった黒色天然ゴムの内圧を表していると考えられ，このとき生じた気体が時間の経過とともに収縮し，それに応じて圧力も減衰したと考えられる．

Table 2-1 と Figure 2-14 および Figure 2-15 に，LISW の脊髄ファントム内伝搬に伴う圧力特性の変化をまとめた．伝搬距離に伴うピーク圧力の減衰は，幾何学的な拡散減衰(伝搬距離に応じた拡がり減衰)と媒質による散乱および吸収減衰(物質と応力波の相互作用による減衰)を考えると，(2.18)式と(2.22)式から次式で近似される．

$$P = P_0 \times \exp(-\alpha d) \times d^{-\gamma} \quad (2.26)$$

ここで， P_0 はターゲット直下におけるピーク圧力， d は伝搬距離， α は媒質の減衰係数である．脊髄ファントム(ポリアクリルアミドゲル)の，周波数 1～10 MHz の弾性波に対する減衰係数は $\alpha = 0.1 \sim 1 \text{ dB/cm}$ であるとの報告があり[46, 48-50]，仮に $\alpha = 1 \text{ dB/cm}$ とした場合でも，レーザフルエンスが 0.3 J/cm^2 と 0.9 J/cm^2 のときそれぞれ $\gamma = 0.30$ ， $\gamma = 0.34$ と求められる(1 Neper/cm = 8.686 dB/cm，Neper は無次元で計算時にはこれを用いた)．ここでは，Table 2-1 に示した実測値と(2.26)式から，最小二乗法(Microsoft Excel のソルバーを使用)によって係数 γ を求めた．

ラット椎骨を伝搬させて測定した LISW の圧力時間波形を Figure 2-16 に示す．椎骨の伝搬前後における圧力特性の平均値の変化は Table 2-2 にまとめた．ここで，ターゲット直下の圧力特性は，Figure 2-12 (a) と Figure 2-13 (a) で示した伝搬距離 0 mm のときの圧力時間波形より求めた．椎骨を伝搬させたことで LISW のエネルギーの吸収，散乱，反射などが生じ，ピーク圧力，圧力積分値，および圧力上昇速度が減少していることがわかる．例としてピーク圧力の平均値に着目すると，椎骨の伝搬後には，レーザフルエンスが 0.3 J/cm^2 と

0.9 J/cm² のときでそれぞれ 6.5%, 11.3%にまで減少していた。

Figure 2-12, Figure 2-13, Figure 2-16 に示した LISW の圧力時間波形をフーリエ変換した結果を Figure 2-17 に示す。ターゲット直下で計測した LISW の周波数成分を見ると、LISW は低周波数成分(特に数 MHz 以内)を主とする広帯域の周波数成分を含むことがわかる。ハイドロフォンからの電気信号のベースラインを同様にフーリエ変換した結果から、おおよそ -50 dB 以下の信号は圧力波形に寄与しないノイズと判断できる。レーザフルエンスが 0.3 J/cm² のとき、椎骨を伝搬した後の LISW ではほとんど有効な周波数成分が見られない。レーザフルエンスが 0.9 J/cm² のときの、ターゲット直下と椎骨伝搬後で計測した圧力波形の周波数分布を比較すると、椎骨伝搬後では特に 5~10 MHz の高周波数成分が減少していることがわかる。ただし、ハイドロフォンの応答周波数(0.2~10 MHz)の範囲外における周波数成分が検出されているかは不明である。フルエンスによって椎骨伝搬前後で周波数特性の変化に違いが見られる理由は、レーザフルエンスが 0.3 J/cm² のときは圧力値が小さく、ノイズによって周波数成分の分布が広がり、相対的に各周波数の強度が小さくなっているためと考えられる。(2.20)式と(2.21)式からは、周波数が高い成分ほどその拡散角が小さく、指向性よく生体内を伝搬すると考えられる。にもかかわらず高周波数成分の減衰が大きくなっているのは、(2.22)式で示したように、椎骨の伝搬において散乱、吸収によるエネルギーの減少が脊髄ファントム(ポリアクリルアミドゲル)の伝搬よりも大きくなっているためと考えられる。

2.5.3 レーザ誘起応力波伝搬の可視化

脊髄の構造を模擬して LISW の波面を経時的に観測した結果を Figure 2-18 に示す。環状の影は椎骨を模擬したアクリル樹脂製の円筒チューブ断面であり、その上部で発生した LISW が、脊髄ファントムとして用いた純水の中を伝搬していく様子がわかる。画像のコントラストがあるところに圧力変化が存在し、波面の先端が圧力の立ち上がりに相当する。照射レーザスポット径 6 mm でターゲットから発生した LISW が、平面状の波面をほぼ保ったままで内径 14 mm の脊髄ファントム内を伝搬していることがわかる。ターゲット下面から LISW の尖頭部分までの距離を画像(Fig. 2-18 (a)-(d))から計測し、プロットしたものを Figure 2-19 に示す。これより、LISW の伝搬速度は 1450 m/s と求めることができる。これは、25°C の水中における音速 1497 m/s [38] と近い値である。また、この平面状の波面は椎骨ファントムで一部が反射されて、その曲率に従って集束している様子が確認された(Fig. 2-18 (f))。

2.6 考察

脊髄は椎骨の内部にある神経組織であり，その周囲は筋組織を中心とした軟組織が取り囲んでいる(Fig. 2-1)．脊髄に対して LISW を適用する際には，(i)椎弓切除をした上での直接適用，または，(ii)椎骨を介しての間接適用の 2 通りが考えられる．これらの脊髄に対する LISW の適用方法を考慮に入れ，LISW の伝搬に伴う圧力減衰について考察する．

2.6.1 脊髄実質に対する LISW 直接適用の検討

生体内における応力波の伝搬では，「媒質の散乱・吸収」と「幾何学的な拡がり」によってそのエネルギーが減衰する．脊髄ファントム(ポリアクリルアミドゲル)を用いて計測した LISW の伝搬距離に伴う圧力減衰は，2.5.2 項で述べた計算に基づけば，(2.26)式においてレーザフルエンスが 0.3 J/cm^2 と 0.9 J/cm^2 のときでそれぞれ $\gamma = 0.30$ ， $\gamma = 0.34$ であった．一方，応力波のエネルギーの時間的な散逸(媒質の吸収，散乱)がないと仮定したとき(P_{ac} ：一定)には，空間的な拡がりによってのみ圧力は減衰する．このとき，(2.17)式と(2.18)式から，応力源が点源のときに圧力は伝搬距離に反比例して減衰する．すなわち，(2.26)式において $\gamma = 1$ である．以上のように，伝搬媒質による吸収，散乱がないと仮定したときでさえも $\gamma = 1$ であることを勘案すると，実験で得られた LISW の圧力減衰は非常に小さくなっていることがわかる．

これは，単純には平面波源によって幾何学的な拡がりが抑えられているためと考えられる．実際，シャドウグラフ法による LISW の波面の可視化結果から，その伝搬に伴う拡がりが小さく指向性よく生体内を伝搬していることがわかる(Fig. 2-18)．さらに，Figure 2-17 に示す周波数成分解析の結果からわかるように，LISW が生体内で指向性よく伝搬する数 MHz 以上の高周波数成分を含むこともその一因であると考えられる(ただし，高周波数成分の場合，媒質による吸収，散乱減衰は大きい)．(2.20)式によると，直径 3 mm の波源から周波数 1 ~ 10 MHz の応力波(Fig. 2-17 を参照して仮定)が伝搬すると，平面波としての伝搬距離 z_f は 1.6 ~ 16 mm となる．この計算において，LISW の伝搬速度は 2.5.3 項の可視化結果から実測値 1450 m/s を用いた．先にも述べたが，脊髄実質の太さは，ヒトの場合は約 10 ~ 15 mm，ラットの場合で約 3 ~ 4 mm である．こうして，レーザスポット径 3 mm で発生させた LISW を直接適用した場合には，脊髄の深さ方向に対して指向性よく伝搬し，脊髄深部への部位選択的な作用ができると考えられる．

点波源発生の研究事例が多いものの[37, 54-58], 水中でレーザを集光させたときの光学的絶縁破壊または微小爆薬によって発生させた応力波でも, 発生源を面状にすれば応力波伝搬の高指向性が得られると考えられる. ただし, 例えば水中レーザブレイクダウンに見られる焦点ごく近傍($\sim 500 \mu\text{m}$ [37])の圧力伝搬では $P \propto d^{-2}$ の関係が知られており[37, 54, 55], 発生したプラズマの膨張が超音速から音速に減衰する過程で, 衝撃波とそれに伴うキャビテーションが発生する(非線形現象). キャビテーションは微小気泡の圧壊現象であり, 容易に組織損傷を誘起する恐れがある. 本実験では, 光吸収体として厚さ 0.5 mm の黒色天然ゴムを用いたこと, 圧力計測実験で立ち上がり時間の急峻化が見られないこと(Table 2-1), さらにシャドウグラフ法による LISW 伝搬の可視化実験の結果(Fig. 2-18 と Fig. 2-19)からキャビテーションおよび超音速の伝搬が確認されていないことから, 脊髓組織内ではそのような非線形現象は生じていないと考えられる.

平面波源の LISW 発生によって, 指向性よく脊髓組織に応力波を空間選択的に作用させることが可能である一方, 安全性の観点では椎骨における LISW の反射を考慮する必要がある. 脊髓ファントムと椎骨ファントムのように, 音響インピーダンスの違いが大きいところでは応力波の反射が起こる. Figure 2-18 で示した伝搬形状の可視化結果からも LISW の一部が反射する様子がわかった. こうした圧力波パルスのエネルギーの集束は, 生体深部で副作用(組織損傷)を招く恐れがあるため注意が必要である. しかし, 詳細は第 3 章で述べるが, 本実験において, 遺伝子発現が効率的に得られるレーザパラメータでの LISW 適用による組織損傷と運動機能の低下は観察されておらず, 遺伝子導入条件で反射波による影響はないと推察される. これは, 脊髓組織を取り囲む椎骨の形状が, 実際の動物ではより複雑で単純な円筒にならないためと考えられる.

2.6.2 椎骨を介した脊髓への LISW 間接適用の検討

Table 2-1 と Figure 2-14 および Figure 2-15 で示したように, 椎骨を介して計測した LISW の圧力特性を見るとピーク圧力, 圧力積分値, 圧力上昇速度が全て 20%未満まで減衰していることがわかる. Figure 2-17 に示した LISW の周波数成分解析の結果からは, 圧力上昇速度と正の相関がある高周波数成分の減衰が低周波数成分と比べて大きくなっていることがわかる. これは, (2.22)式に示すように媒質の吸収ないし散乱による減衰が高い周波数ほど大きくなるのが原因と考えられる.

脊髓に対して椎骨を介して LISW を適用する場合は, 椎骨内でのこれらの圧力特性の減衰を考慮してレーザパラメータを選ぶ必要がある. 第 3 章で詳細を述べるが, 健常ラット

脊髄への遺伝子導入実験では、ピーク圧力が 44 MPa となるレーザフルエンス 0.3 J/cm^2 の LISW を脊髄組織に直接適用したときに効率的な遺伝子導入が達成されている。レーザフルエンス 0.3 J/cm^2 の場合には、椎骨伝搬後でピーク圧力は 2.9 MPa にまで減衰している (Table 2-2)。この圧力減衰率(-93.5%)を考慮すると、椎骨上から LISW を適用して椎骨下で 44 MPa のピーク圧力を達成するためには、レーザフルエンス 4.6 J/cm^2 で LISW を発生する必要があることになる。一方で、本実験では観察されなかったものの、圧力減衰率を考えると椎骨によるエネルギーの吸収、散乱が大きく、骨組織の損傷(破砕)が懸念される。さらに、椎骨を介して LISW を脊髄実質に作用させる際には、椎骨と脊髄実質の音響インピーダンスの違い(音響インピーダンスはそれぞれ $2.5 \times 10^6 \text{ Ns/m}^3$ [44]と $1.5 \times 10^6 \text{ Ns/m}^3$ [41])から、LISW の反射が大きくなることも予想される。ヒトの場合には、生体組織が大きいことからより高エネルギーの LISW 照射が必要と考えられるが、照射フルエンスに限度がある。これらのことから、椎骨を完全に残した状態での LISW 適用は実用上難しく、最低でも椎骨の一部を切削した上で先述の圧力減衰特性を考慮し、椎骨を介して LISW を適用することが実用的と考えられる。

2.7 まとめ

本章では、脊髄を模擬したモデルを用いて LISW の伝搬特性を調べた。脊髄ファントム内での伝搬特性計測から、椎弓切除をした上での直接適用では、面波源で発生させた LISW は指向性よく脊髄内を伝搬し、部位選択的に圧力が作用できることを示した。脊髄に対して椎骨を介して LISW を適用する場合は、椎骨内での吸収と散乱によるエネルギー減衰を考慮してレーザパラメータを選ぶ必要があるが、そのパラメータ選定時に必要な圧力の減衰特性を提示した。ただし、得られた減衰特性からは、椎骨の一部を切削した上で椎骨を介して LISW を適用することが実用的と考えられた。椎弓切除をしない場合でも、レーザの利点を活かせば椎骨の一部だけを开窗して経カテーテル的に LISW を適用する方法も考えられる。次章では、本章で計測した伝搬特性を基に、未だ実証例のない LISW を用いた健常ラット脊髄への部位選択的遺伝子導入およびその遺伝子発現特性を調査した実験について述べる。

参考文献 第2章

- [1] K. Koshiyama, T. Kodama, T. Yano, S. Fujikawa, "Structural change in lipid bilayers and water penetration induced by shock waves: molecular dynamics simulations," *Biophys. J.* **91**(6), pp. 2198-2205 (2006).
- [2] K. Koshiyama, T. Yano, T. Kodama, "Self-organization of a stable pore structure in a phospholipid bilayer," *Phys. Rev. Lett.* **105**(1), pp. 018105/1-4 (2010).
- [3] N. R. Carlson, *Physiology of Behavior (10th Edition)* (Allyn & Bacon, 2009)
- [4] A. Siegel, H. N. Saprú, *Essential Neuroscience* (Lippincott Williams & Wilkins, 2006).
- [5] A. A. Oraevsky, R. O. Esenaliev, V. S. Letokhov, "Temporal characteristics and mechanism of atherosclerotic tissue ablation by nanosecond and picosecond laser pulses," *Lasers Life Sci.* **5**(1-2), pp. 75-93 (1992).
- [6] R. O. Esenaliev, A. A. Oraevsky, V. S. Letokhov, A. A. Karabutov, T. V. Malinsky, "Studies of acoustical and shock waves in the pulsed laser ablation of biotissue," *Lasers Surg. Med.* **113**(4), pp. 470-484 (1993).
- [7] A. G. Doukas, T. J. Flotte, "Physical characteristics and biological effects of laser-induced stress waves," *Ultrasound Med. Biol.* **22**(2), pp. 151-164 (1996).
- [8] E. F. Carome, N. A. Clark, C. E. Moeller, "Generation of acoustic signals in liquids by ruby laser-induced thermal stress transients," *Appl. Phys. Lett.* **4**, pp. 95-97 (1964).
- [9] M. W. Sigrist, F. K. Kneubühl, "Laser-generated stress waves in liquids," *J. Acoust. Soc. Am.* **64**(6), pp. 1652-1663 (1978).
- [10] M. W. Sigrist, "Laser generation of acoustic waves in liquids and gases," *J. Appl. Phys.* **60**(7), p. R83-R121 (1986).
- [11] M. I. Khan, T. Sun, G. J. Diebold, "Photoacoustic waves generated by absorption of laser radiation in optically thin layers," *J. Acoust. Soc. Am.* **93**(3), pp. 1417-1425 (1993).
- [12] A. A. Oraevsky, S. L. Jacques, F. K. Tittel, "Measurement of tissue optical properties by time-resolved detection of laser-induced transient stress," *Appl. Opt.* **36**(1), pp. 402-415 (1997).
- [13] G. Paltauf, P. E. Dyer, "Photomechanical processes and effects in ablation," *Chem. Rev.* **103**(2), pp. 487-518 (2003).
- [14] A. Vogel, V. Venugopalan, "Mechanisms of pulsed laser ablation of biological tissues," *Chem. Rev.* **103**(2), pp. 577-644 (2003).
- [15] T. J. Flotte, S. Lee, H. Zhang, D. McAuliffe, T. Douki, A. G. Doukas, "Laser-induced stress

- transients: applications for molecular delivery,” Proc. SPIE **2391**(1), pp. 202-207 (1995).
- [16] S. Lee, T. Anderson, H. Zhang, T. J. Flotte, A. G. Doukas, “Alteration of cell membrane by stress waves *in vitro*,” Ultrasound Med. Biol. **22**(9), pp. 1285-1293 (1996).
- [17] D. J. McAuliffe, S. Lee, T. J. Flotte, A. G. Doukas, “Stress-wave-assisted transport through the plasma membrane *in vitro*,” Lasers Surg. Med. **20**(2), pp. 216-222 (1997).
- [18] S. Lee, D. J. McAuliffe, T. J. Flotte, N. Kollias, A. G. Doukas, “Photomechanical transcutaneous delivery of macromolecules,” J. Invest. Dermatol. **111**(6), pp. 925-929 (1998).
- [19] S. Lee, A. G. Doukas, “Laser-generated stress waves and their effects on the cell membrane,” IEEE J. Selected Topics Quant. Electron. **5**(4), pp. 997-1003 (1999).
- [20] S. Lee, N. Kollias, D. J. McAuliffe, T. J. Flotte, A. G. Doukas, “Topical drug delivery in humans with a single photomechanical wave,” Pharm. Res. **16**(11), pp. 1717-1721 (1999).
- [21] S. E. Mulholland, S. Lee, D. J. McAuliffe, A. G. Doukas, “Cell loading with laser-generated stress waves: the role of the stress gradient,” Pharm. Res. **16**(4), pp. 514-518 (1999).
- [22] T. Kodama, M. R. Hamblin, A. G. Doukas, “Cytoplasmic molecular delivery with shock waves: importance of impulse,” Biophys. J. **79**(4), pp. 1821-1832 (2000).
- [23] T. Y. Lin, D. J. McAuliffe, N. Michaud, H. Zhang, S. Lee, A. G. Doukas, T. J. Flotte, “Nuclear transport by laser-induced pressure transients,” Pharm. Res. **20**(6), pp. 879-883 (2003).
- [24] A. G. Doukas, N. Kollias, “Transdermal drug delivery with a pressure wave,” Adv. Drug Deliv. Rev. **56**(5), pp. 559-579 (2004).
- [25] M. Ogura, S. Sato, K. Nakanishi, M. Uenoyama, T. Kiyozumi, D. Saito, T. Ikeda, H. Ashida, M. Obara, “*In vivo* targeted gene transfer in skin by the use of laser-induced stress waves,” Lasers Surg. Med. **34**(3), pp. 242-248 (2004).
- [26] M. Terakawa, S. Sato, H. Ashida, K. Aizawa, M. Uenoyama, Y. Masaki, M. Obara, “*In vitro* gene transfer to mammalian cells by the use of laser-induced stress waves: effects of stress wave parameters, ambient temperature, and cell type,” J. Biomed. Opt. **11**(1), pp. 014026/1-7 (2006).
- [27] M. Terakawa, S. Sato, D. Saitoh, H. Tsuda, H. Ashida, H. Okano, M. Obara, “Enhanced angiogenesis in grafted skins by laser-induced stress wave-assisted gene transfer of hepatocyte growth factor,” J. Biomed. Opt. **12**(3), pp. 034031/1-8 (2007).
- [28] S. Takano, S. Sato, M. Terakawa, H. Asida, H. Okano, M. Obara, “Enhanced transfection efficiency in laser-induced stress wave-assisted gene transfer at low laser fluence by increasing pressure impulse,” Appl. Phys. Express **1**, pp. 038001/1-3 (2008).

- [29] S. Lee, D. J. McAuliffe, T. J. Flotte, N. Kollias, A. G. Doukas, "Photomechanical transdermal delivery: the effect of laser confinement," *Lasers Surg. Med.* **28**(4), pp. 344-347 (2001).
- [30] R. Fabbro, J. Fournier, P. Ballard, D. Devaux, J. Virmont, "Physical study of laser-produced plasma in confined geometry," *J. Appl. Phys.* **68**(2), pp. 775-784 (1990).
- [31] D. Devaux, R. Fabbro, L. Tollier, E. Bartnicki, "Generation of shock waves by laser-induced plasma in confined geometry," *J. Appl. Phys.* **74**(4), pp. 2268-2273 (1993).
- [32] L. Berthe, R. Fabbro, P. Peyre, L. Tollier, E. Bartnicki, "Shock waves from a water-confined laser-generated plasma," *J. Appl. Phys.* **82**(6), pp. 2826-2832 (1997).
- [33] P. K. Kennedy, D. X. Hammer, B. A. Rockwell, "Laser-induced breakdown in aqueous media," *Prog. Quantum Electron.* **21**(3), pp. 155-248 (1997).
- [34] Q. Feng, J. V. Moloney, A. C. Newell, E. M. Wright, K. Cook, P. K. Kennedy, D. X. Hammer, B. A. Rockwell, C. R. Thompson, "Theory and simulation on the threshold of water breakdown induced by focused ultrashort laser pulses," *IEEE J. Quantum Electron.* **33**(2), pp. 127-137 (1997).
- [35] J. Noack, A. Vogel, "Laser-induced plasma formation in water at nanosecond to femtosecond time scales: calculation of thresholds, absorption coefficients, and energy density," *IEEE J. Quantum Electron.* **35**(8), pp. 1156-1167 (1999).
- [36] 西山静男, 池谷和夫, 山口善司, 奥島基良, 音響振動工学 (コロナ社, 2003).
- [37] A. Vogel, S. Busch, U. Parlitz, "Shock wave emission and cavitation bubble generation by picosecond and nanosecond optical breakdown in water," *J. Acoust. Soc. Am.* **100**(1), pp. 148-165 (1996).
- [38] 超音波便覧編集委員会, 超音波便覧 (丸善, 1999).
- [39] 日本電子機械工業会, 医用超音波機器ハンドブック (コロナ社, 1983).
- [40] A. Vogel, K. Nahen, D. Theisen, J. Noack, "Plasma formation in water by picosecond and nanosecond Nd:YAG laser pulses - part I: optical breakdown at threshold superthreshold irradiance," *IEEE J. Sel. Topics Quantum. Electron.* **2**(4), pp. 847-860 (1996).
- [41] A. Vogel, J. Noack, K. Nahen, D. Theisen, S. Busch, U. Parlitz, D. X. Hammer, G. D. Noojin, B. A. Rockwell, R. Birngruber, "Energy balance of optical breakdown in water at nanosecond to femtosecond time scales," *Appl. Phys. B* **68**(2), pp. 271-280 (1999).
- [42] C. H. Fan, J. Sun, J. P. Longtin, "Breakdown threshold and localized electron density in water induced by ultrashort laser pulses," *J. Appl. Phys.* **91**(4), pp. 2530-2536 (2002).
- [43] A. D. Zweig, V. Venugopalan, T. F. Deutsch, "Stress generated in polyimide by excimer-laser

- irradiation,” *J. Appl. Phys.* **74**(6), pp. 4181-4189 (1993).
- [44] E. A. Brujan, A. Vogel, “Stress wave emission and cavitation bubble dynamics by nanosecond optical breakdown in a tissue phantom,” *J. Fluid Mech.* **558**, pp. 281-308 (2006).
- [45] F. A. Duck, “Physical Properties of Tissue: A Comprehensive Reference Book,” Academic Press, (1990).
- [46] K. Zell, J. I. Sperl, M. W. Vogel, R. Niessner, C. Haisch, “Acoustical properties of selected tissue phantom materials for ultrasound imaging,” *Phys. Med. Biol.* **52**(20), N475-N484 (2007).
- [47] T. Klinkosz, C. J. Lewa, J. Paczkowski, “Propagation velocity and attenuation of a shear wave pulse measured by ultrasound detection in agarose and polyacrylamide gels,” *Ultrasound Med. Biol.* **34**(2), pp. 265-275 (2008).
- [48] A. F. Prokop, S. Vaezy, M. L. Noble, P. J. Kaczkowski, R. W. Martin, L. A. Crum, “Polyacrylamide gel as an acoustic coupling medium for focused ultrasound therapy,” *Ultrasound Med. Biol.* **29**(9), pp. 1351-1358 (2003).
- [49] K. Takegami, Y. Kaneko, T. Watanabe, T. Maruyama, Y. Matsumoto, H. Nagawa H, “Polyacrylamide gel containing egg white as new model for irradiation experiments using focused ultrasound,” *Ultrasound Med. Biol.* **30**(10), pp. 1419-1422 (2004).
- [50] C. Lafon, V. Zderic, M. L. Noble, J. C. Yuen, P. J. Kaczkowski, O. A. Sapozhnikov, F. Chavrier, L. A. Crum, S. Vaezy, “Gel phantom for use in high-intensity focused ultrasound dosimetry,” *Ultrasound Med. Biol.* **31**(10), pp. 1383-1389 (2005).
- [51] 流れの可視化学会, 流れの可視化ハンドブック (朝倉書店, 1986).
- [52] The NIST Atomic Spectra Database; <http://www.nist.gov/pml/data/asd.cfm/>
- [53] Y. Sano, N. Mukai, K. Okazaki, M. Obata, “Residual stress improvement in metal surface by underwater laser irradiation,” *Nucl. Instrum. Methods Phys. Res. B* **121**(1-4), pp. 432-436 (1997).
- [54] H. Schoeffmann, H. Schmidt-Kloiber, E. Reichel, “Time-resolved investigations of laser-induced shock waves in water by use of polyvinylidene fluoride hydrophones,” *J. Appl. Phys.* **63**(1), pp. 46-51 (1987).
- [55] A. G. Doukas, A. D. Zweig, J. K. Frisoli, R. Birngruber, T. F. Deutsch, “Non-invasive determination of shock wave pressure generated by optical breakdown,” *Appl. Phys. B* **53**(4), pp. 237-245 (1991).

- [56]J. Noack, A. Vogel, “Single-shot spatially resolved characterization of laser-induced shock waves in water,” *Appl. Opt.* **37**(19), pp. 4092-4099 (1998).
- [57]J. Noack, D. X. Hammer, G. D. Noojin, B. A. Rockwell, A. Vogel, “Influence of pulse duration on mechanical effects after laser-induced breakdown in water,” *J. Appl. Phys.* **83**(12), pp. 7488-7495 (1998).
- [58]T. Saito, M. Marumoto, H. Yamashita, S. H. R. Hosseini, A. Nakagawa, T. Hirano, K. Takayama, “Experimental and numerical studies of underwater shock wave attenuation,” *Shock Waves* **13**(2), pp. 139-148 (2003).

Table 2-1 Pressure characteristics of LISWs as a function of propagation distance
(means \pm SD, n = 3). Laser spot diameter on the target was 3 mm.

(a) Laser fluence 0.3 J/cm²

Propagation distance (mm)	0	2	4	6
Peak pressure (MPa)	44.3 \pm 1.5	25.9 \pm 1.5	24.5 \pm 0.8	18.0 \pm 0.5
Impulse (Pa·s)	8.4 \pm 1.1	3.1 \pm 0.5	2.7 \pm 0.2	1.9 \pm 0.0
Stress gradient (MPa/ns)	0.80 \pm 0.12	0.54 \pm 0.09	0.35 \pm 0.05	0.24 \pm 0.06
Duration of the first positive cycle (ns)	583 \pm 6	270 \pm 36	237 \pm 6	207 \pm 6

(b) Laser fluence 0.9 J/cm²

Propagation distance (mm)	0	2	4	6
Peak pressure (MPa)	130.7 \pm 6.3	100.4 \pm 2.2	55.1 \pm 1.8	37.2 \pm 1.0
Impulse (Pa·s)	30.4 \pm 3.1	14.6 \pm 0.6	8.4 \pm 0.2	5.1 \pm 0.1
Stress gradient (MPa/ns)	2.86 \pm 0.39	1.61 \pm 0.05	1.00 \pm 0.25	0.67 \pm 0.05
Duration of the first positive cycle (ns)	747 \pm 215	380 \pm 66	337 \pm 15	287 \pm 6

Table 2-2 Pressure characteristics of LISWs before and after propagation through the rat vertebra (means \pm SD, n = 3). Laser spot diameter on the target was 3 mm.

(a) Laser fluence 0.3 J/cm²

Measurement position	Under the laser target	After propagation through the vertebra
Peak pressure (MPa)	44.3 \pm 1.5	2.9 \pm 0.4
Impulse (Pa·s)	8.4 \pm 1.1	0.5 \pm 0.1
Stress gradient (MPa/ns)	0.80 \pm 0.12	0.01 \pm 0.00
Duration of the first positive cycle (ns)	583 \pm 6	173 \pm 47

(b) Laser fluence 0.9 J/cm²

Measurement position	Under the laser target	After propagation through the vertebra
Peak pressure (MPa)	130.7 \pm 6.3	14.8 \pm 2.1
Impulse (Pa·s)	30.4 \pm 3.1	2.8 \pm 0.3
Stress gradient (MPa/ns)	2.86 \pm 0.39	0.06 \pm 0.02
Duration of the first positive cycle (ns)	747 \pm 215	230 \pm 20

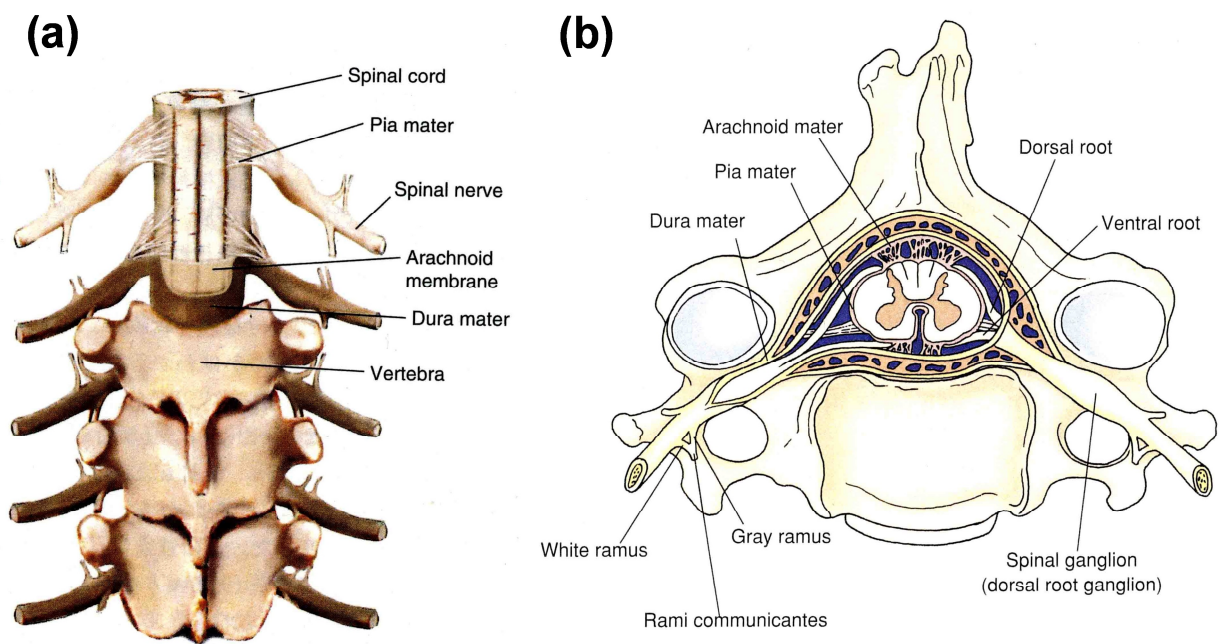


Fig. 2-1 Anatomical structures of the spinal cord and the surrounding components [3, 4]. (a) The spinal cord within the vertebral column and (b) the cross-sectional anatomy and spinal nerves.

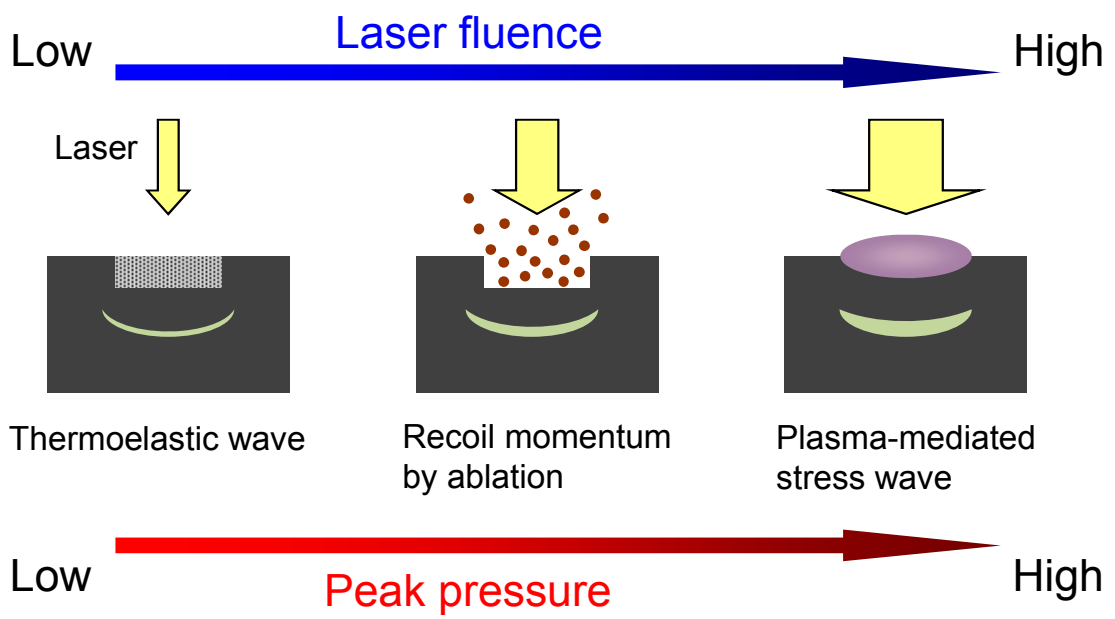


Fig. 2-2 Generation of laser-induced pressure waves.

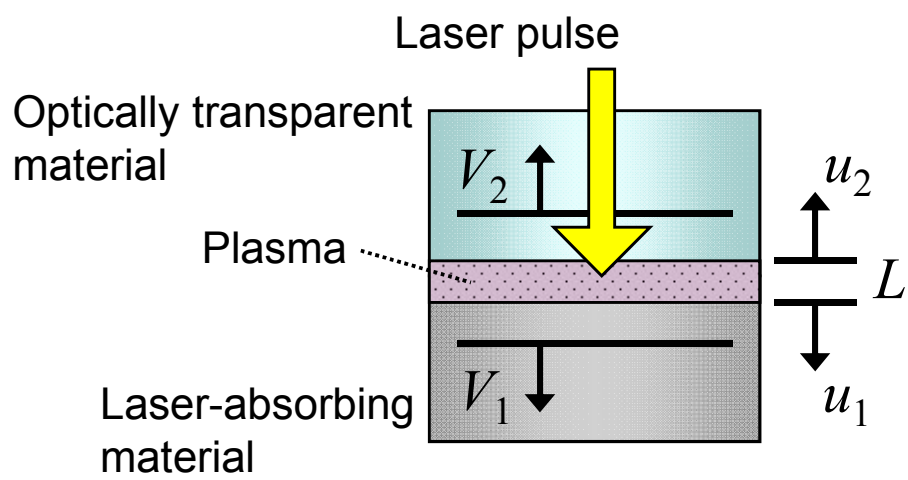


Fig. 2-3 Geometry of the target assembly in confined laser ablation [30].

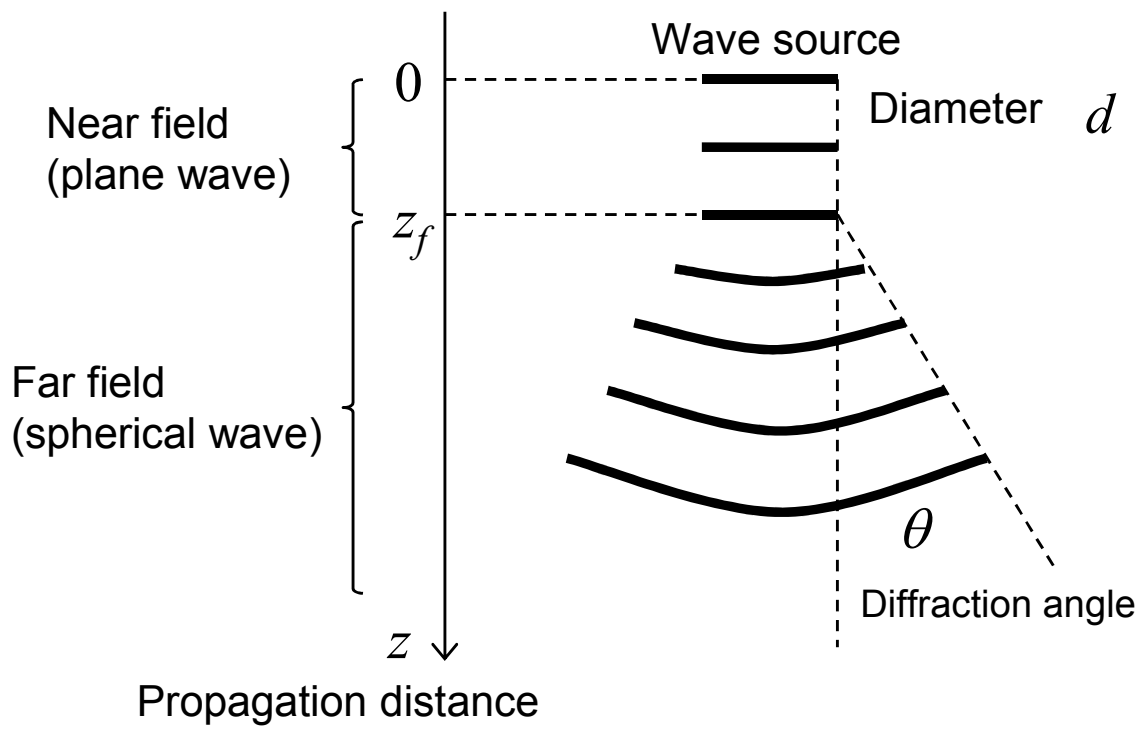
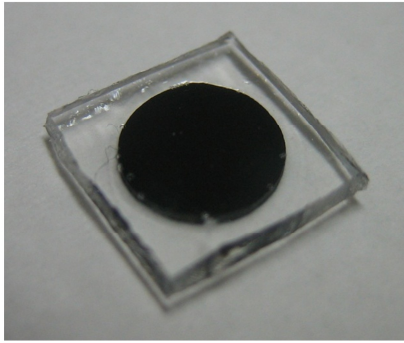


Fig. 2-4 Propagation of acoustic wave [10].

(a)



(b)

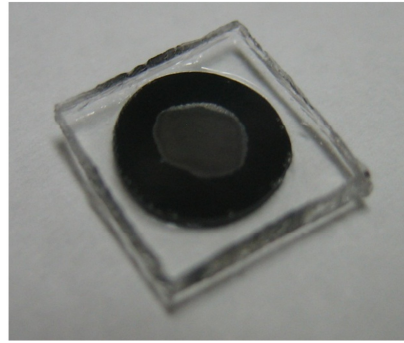


Fig. 2-5 Photographs of the laser target (a 5-mm black natural rubber disk bonded with a PET sheet). (a) Before laser irradiation and (b) after irradiation with a single shot of Q-switched Nd:YAG laser at a fluence of 0.3 J/cm^2 with a 3-mm spot diameter. A space created in the boundary is observed.

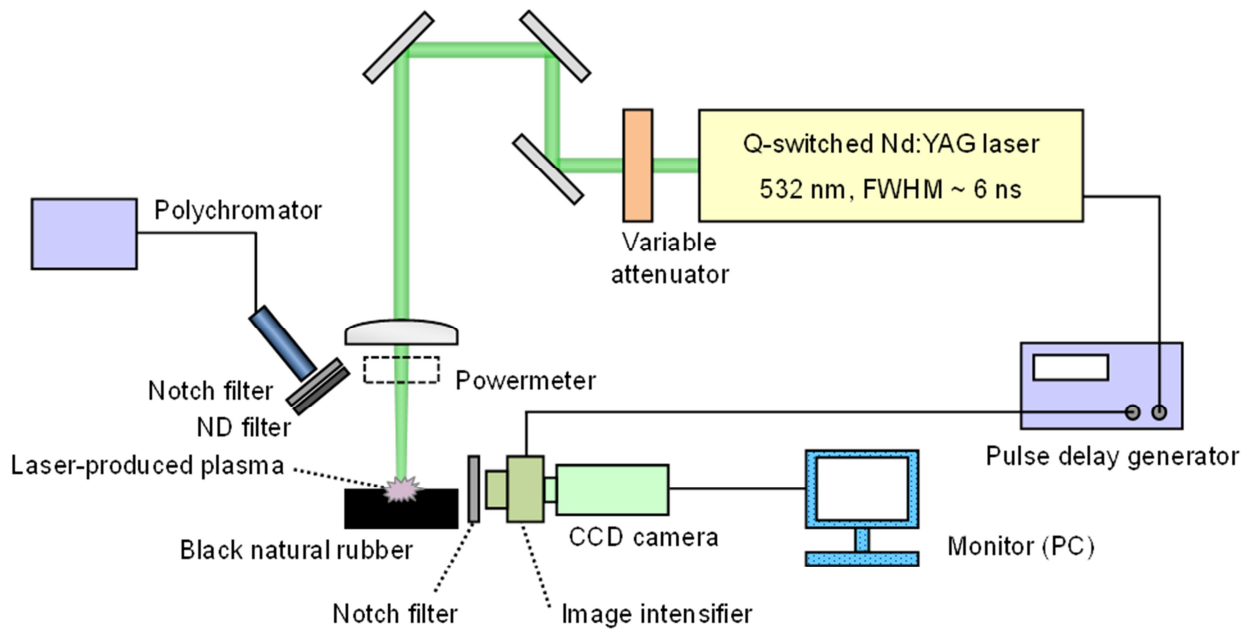


Fig. 2-6 Diagram of the experimental setup for imaging laser-induced plasma and optical emissions.

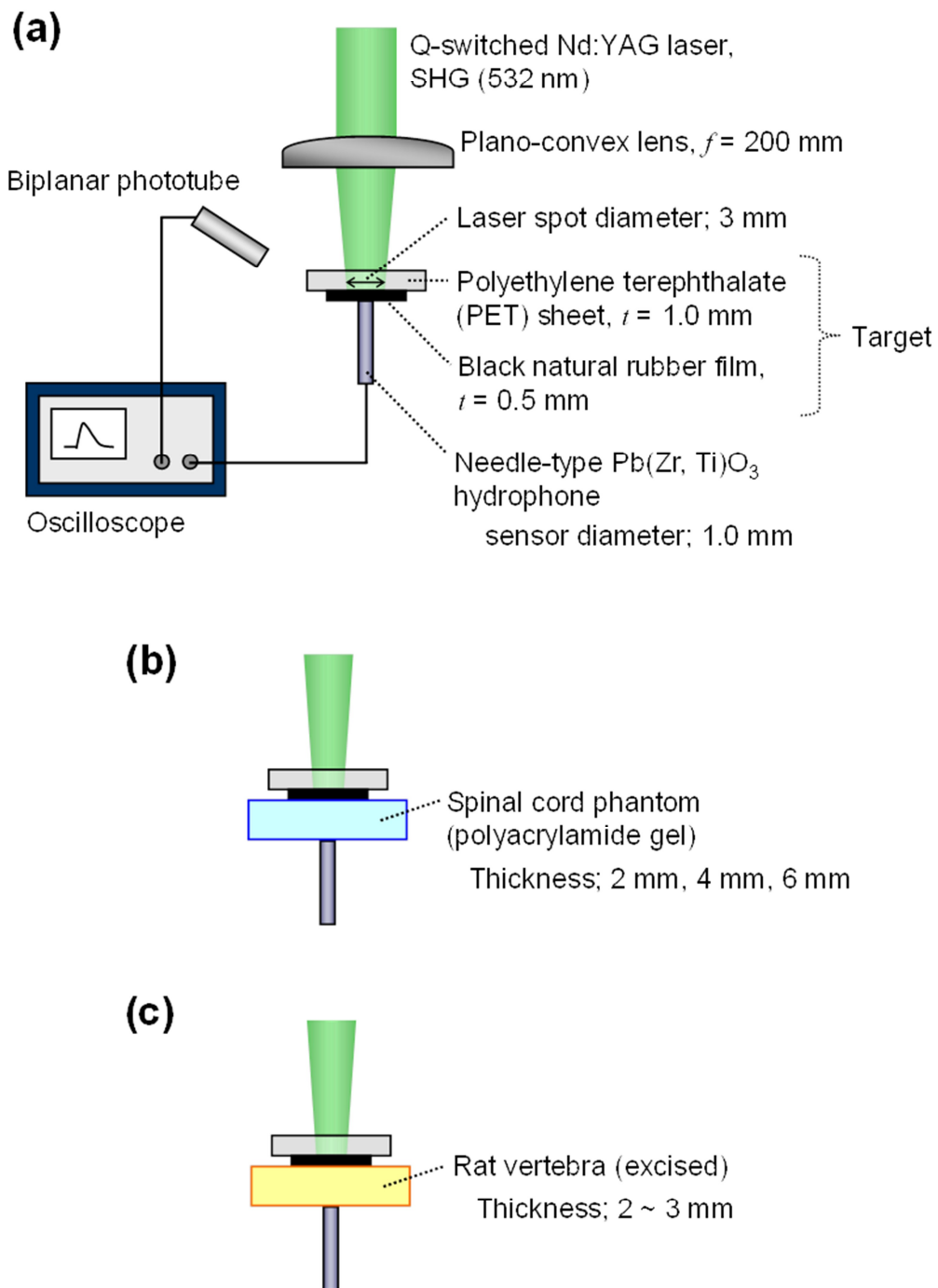


Fig. 2-7 (a) Experimental setup for measurement of temporal pressure profiles of LISWs. The generated pressures of LISWs were measured under (b) spinal tissue phantoms of different thicknesses and (c) an excised rat vertebra.

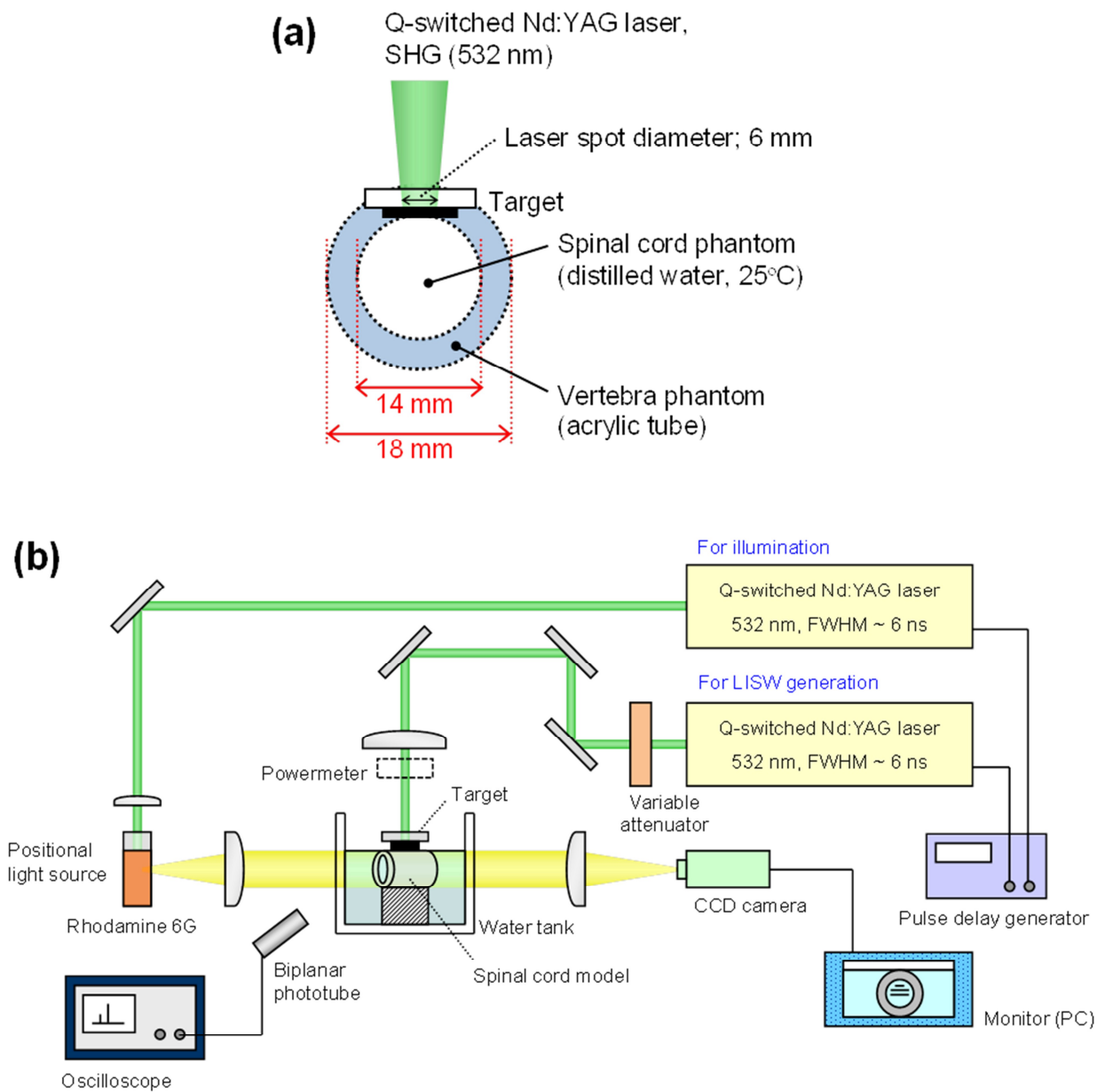


Fig. 2-8 Experimental setup for visualization of LISW propagation through a spinal cord phantom.

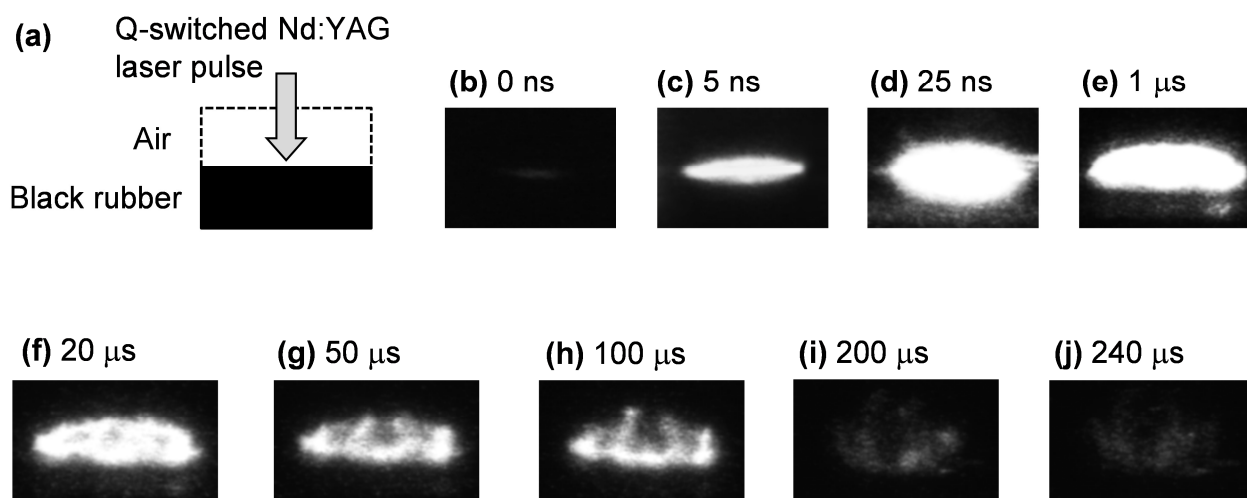


Fig. 2-9 Photographs of laser-induced plasma. A pulse from the Q-switched Nd:YAG laser was impinged on a black natural rubber piece in air.

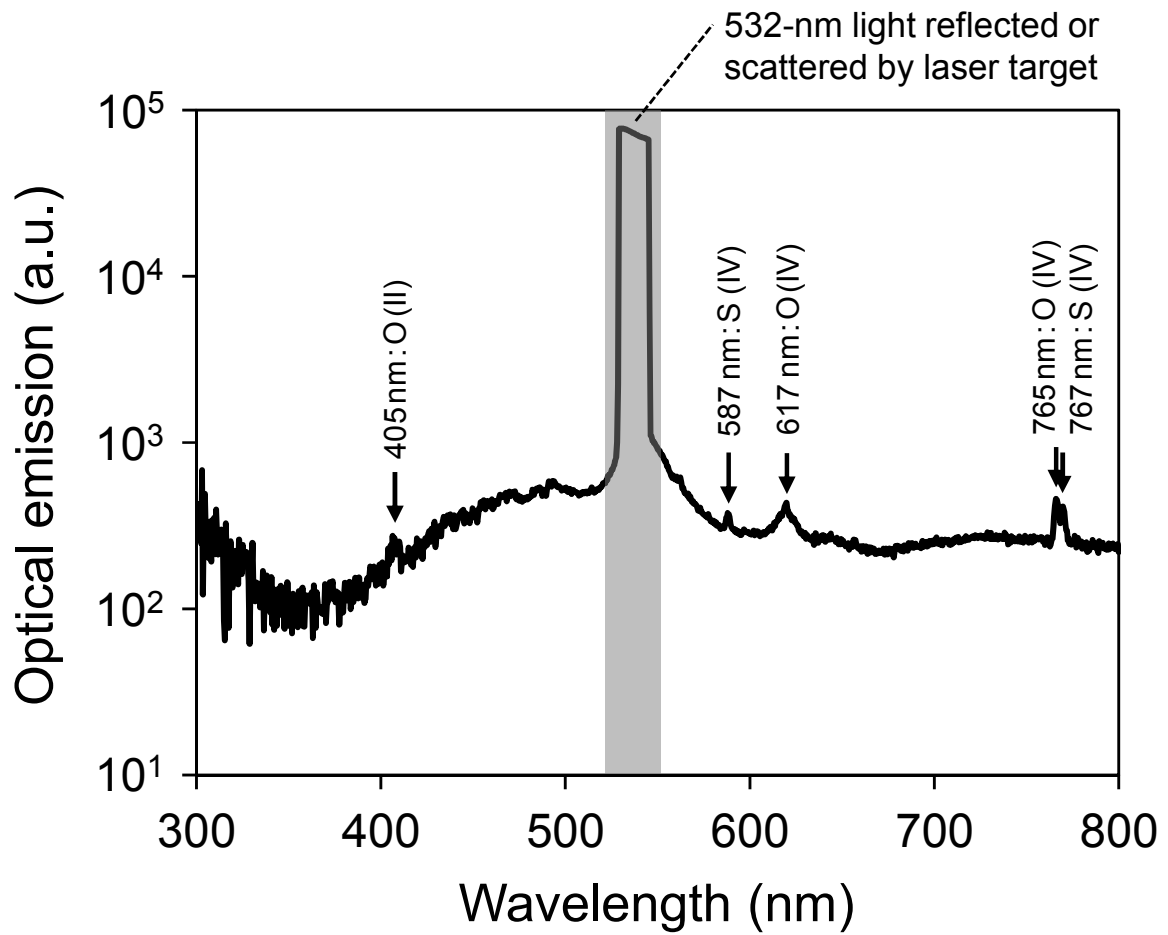


Fig. 2-10 Spectra of the time-integrated optical emission of plasma induced by laser ablation of a black natural rubber. A notch filter was used to block the scattered 532-nm laser light.

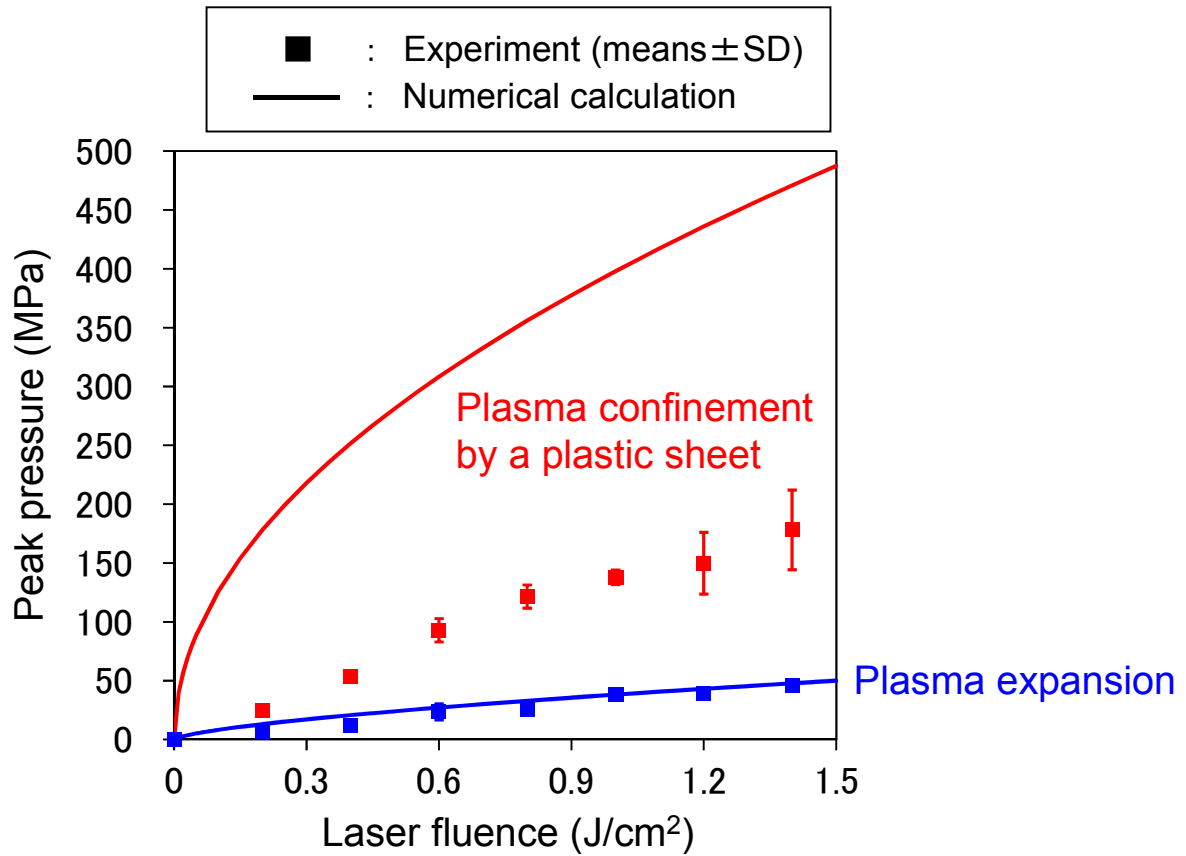


Fig. 2-11 Dependence of peak pressure of LISWs generated on laser fluence.

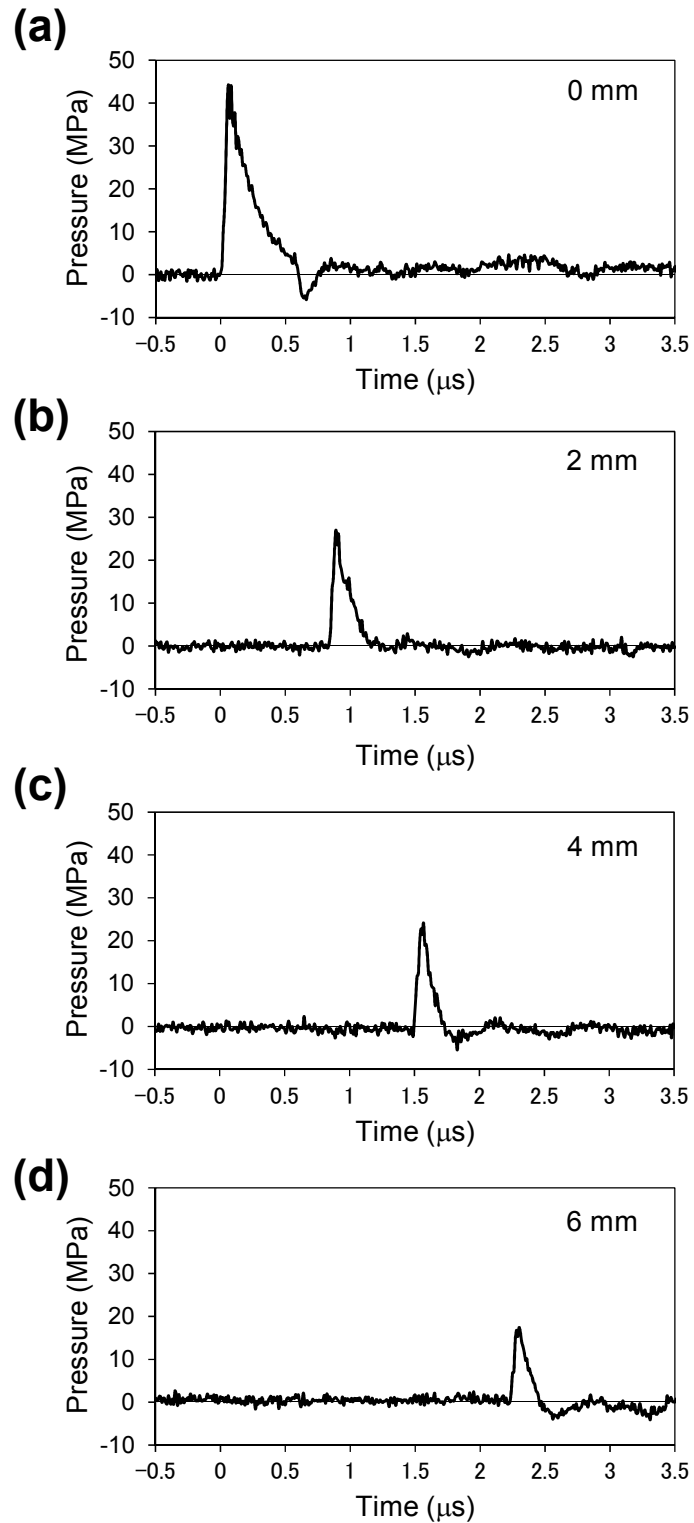


Fig. 2-12 Temporal pressure profiles of LISWs before and after propagation through the spinal phantoms at a laser fluence of 0.3 J/cm^2 with a 3-mm spot diameter. The thicknesses of the polyacrylamide gels were (a) 0 mm, (b) 2 mm, (c) 4 mm, and (d) 6 mm.

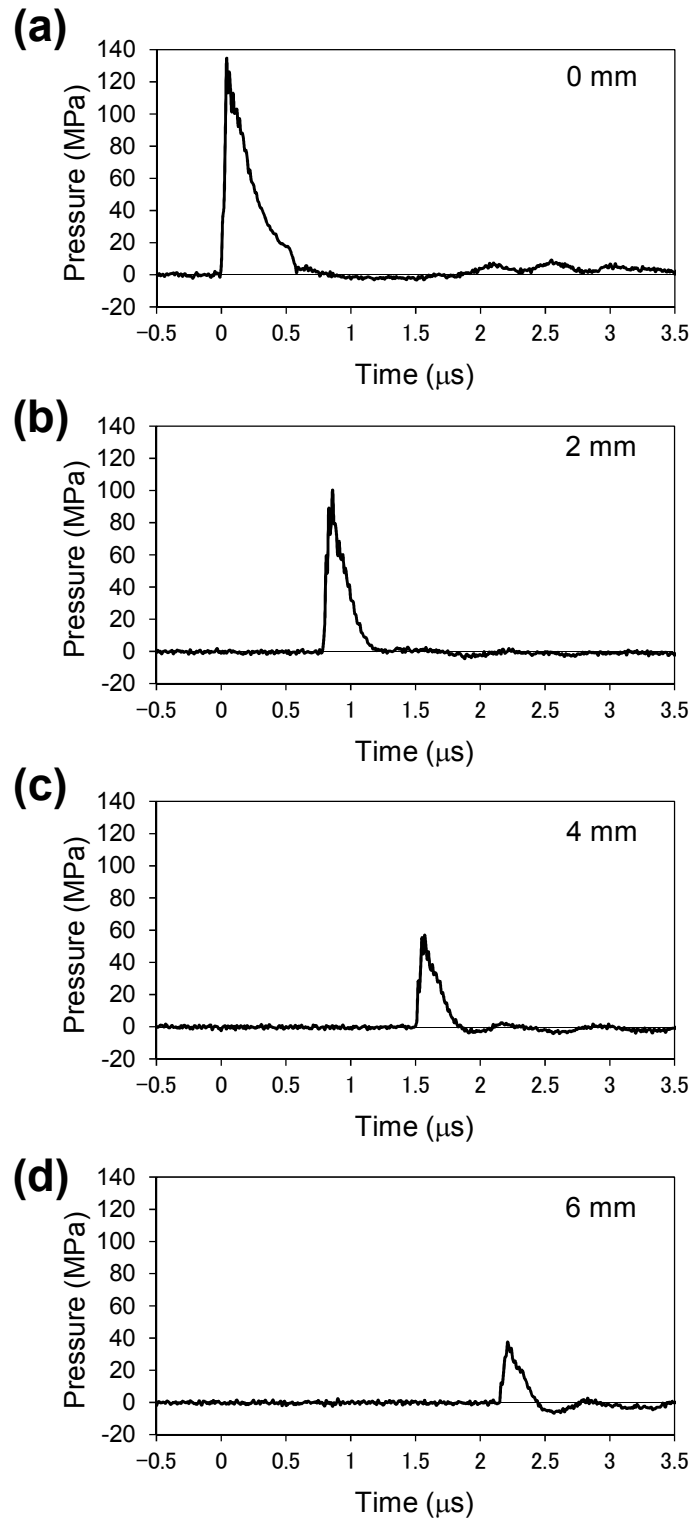


Fig. 2-13 Temporal pressure profiles of LISWs before and after propagation through the spinal phantoms at a laser fluence of 0.9 J/cm^2 with a 3-mm spot diameter. The thicknesses of the polyacrylamide gels were (a) 0 mm, (b) 2 mm, (c) 4 mm, and (d) 6 mm.

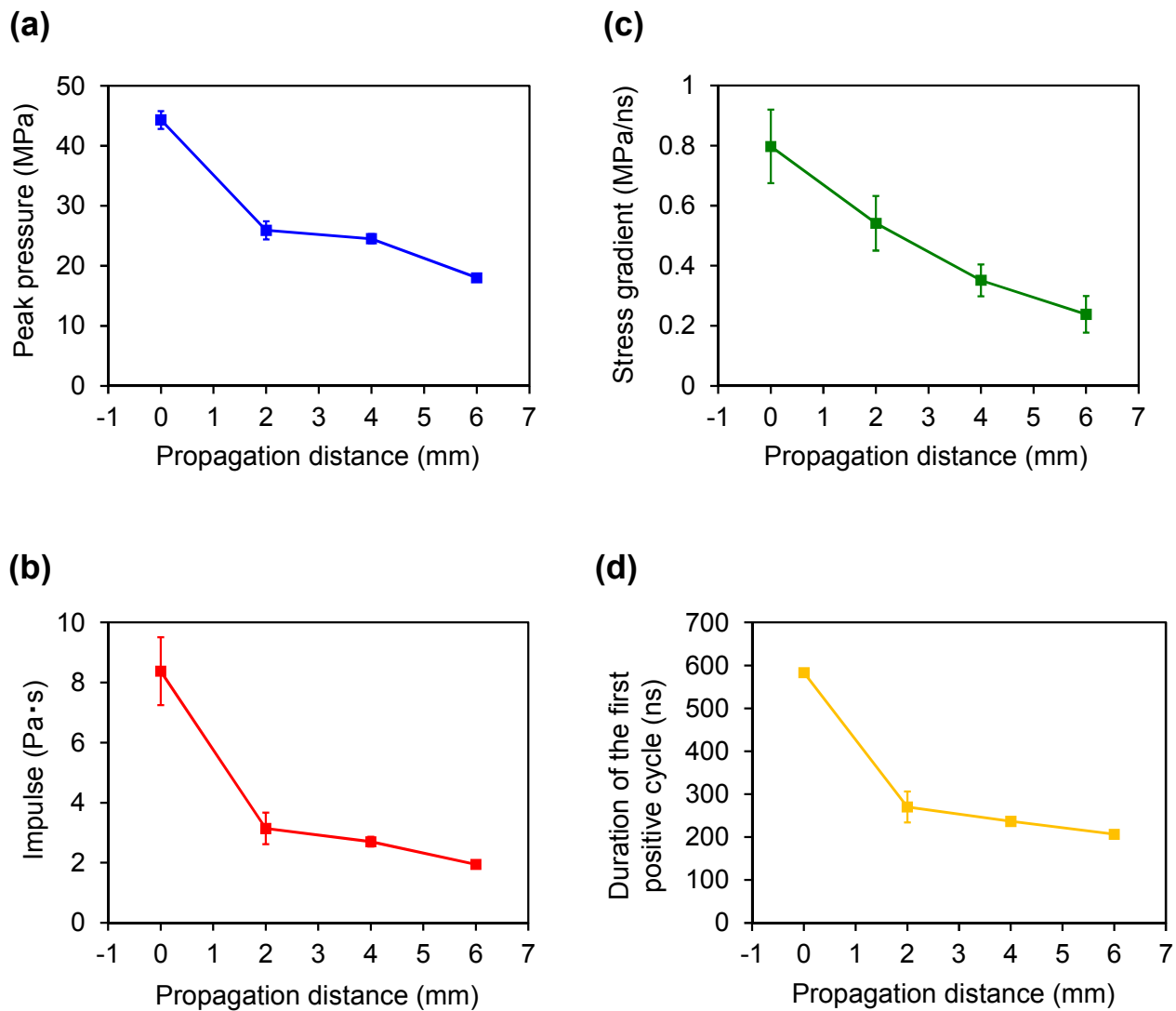


Fig. 2-14 Pressure characteristics of LISWs at a laser fluence of 0.3 J/cm^2 with a 3-mm spot diameter as a function of propagation distance (means \pm SD, $n = 3$).

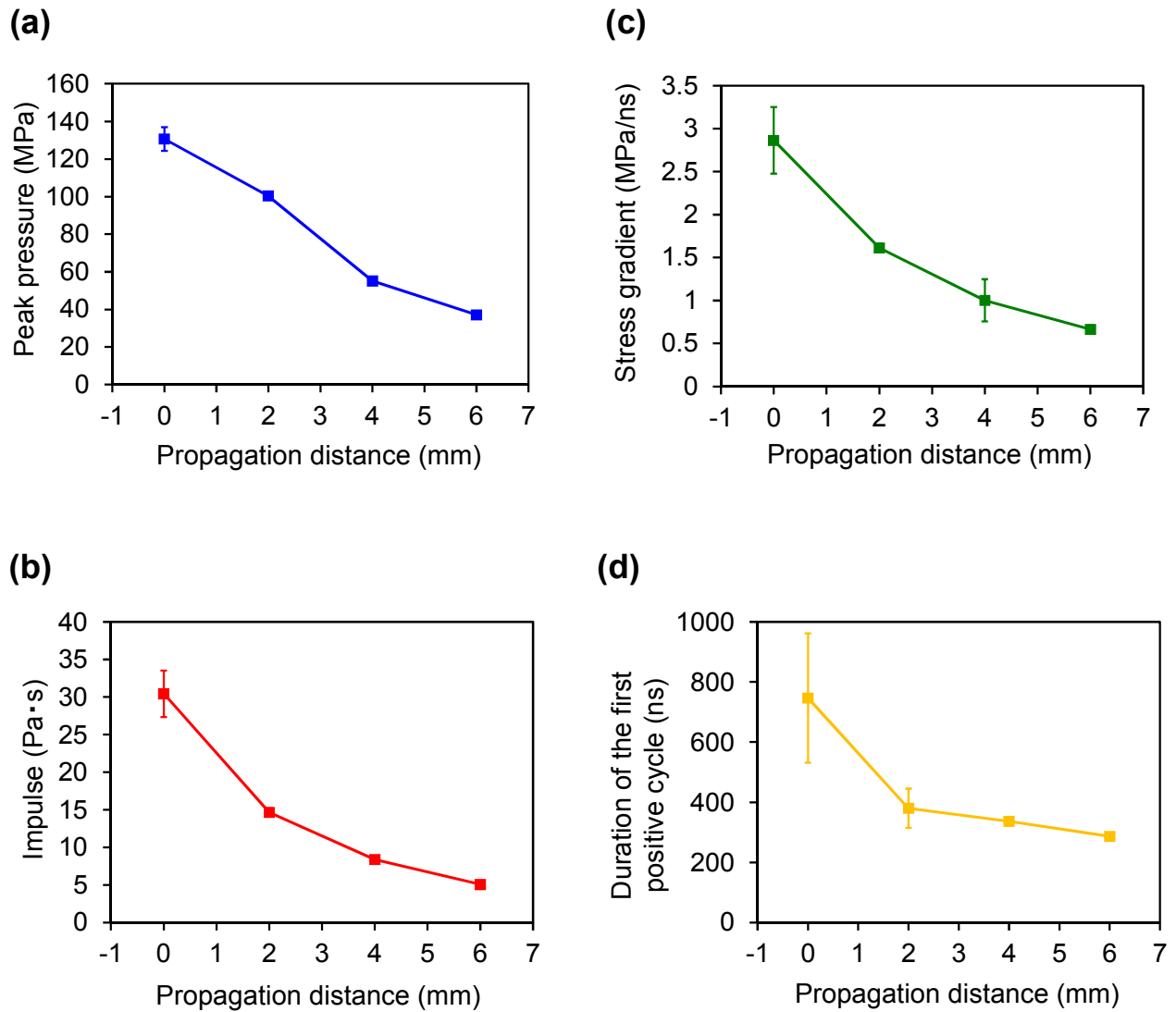
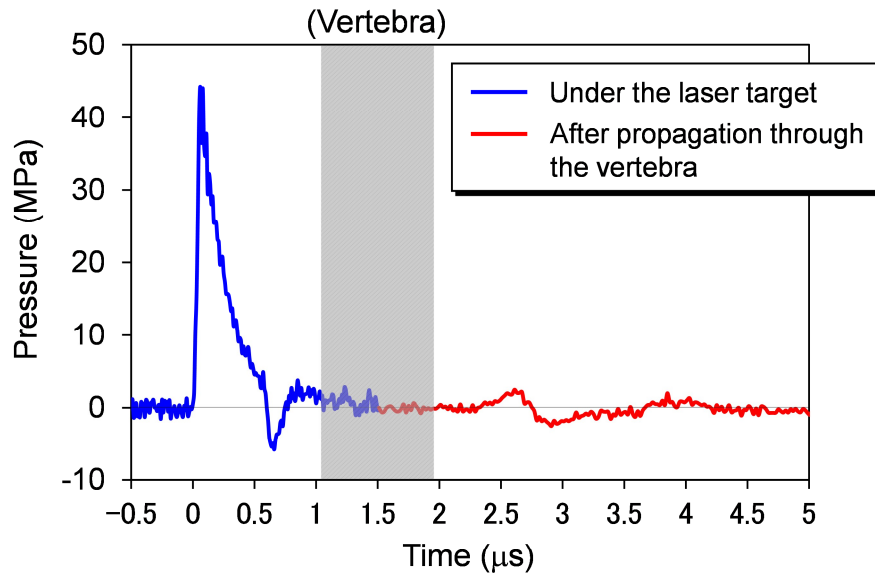


Fig. 2-15 Pressure characteristics of LISWs at a laser fluence of 0.9 J/cm^2 with a 3-mm spot diameter as a function of propagation distance (means \pm SD, $n = 3$).

(a) Laser fluence 0.3 J/cm^2



(b) Laser fluence 0.9 J/cm^2

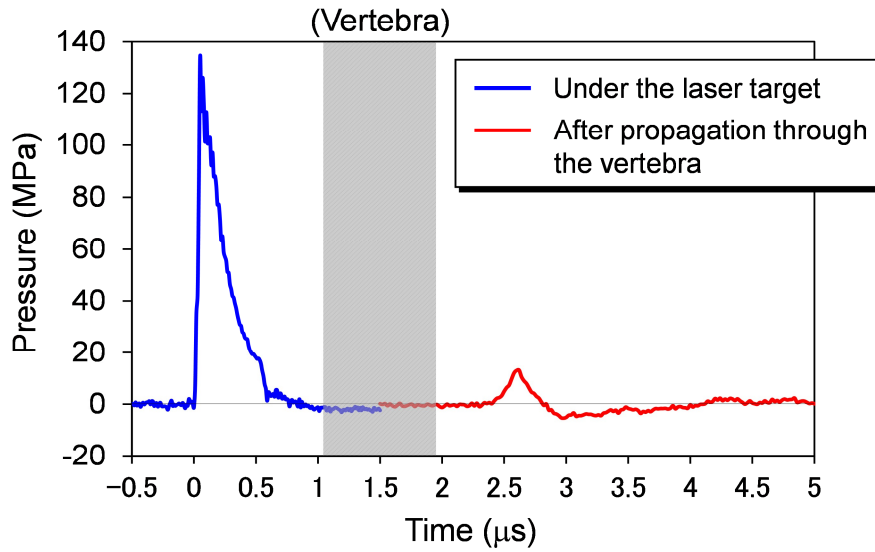
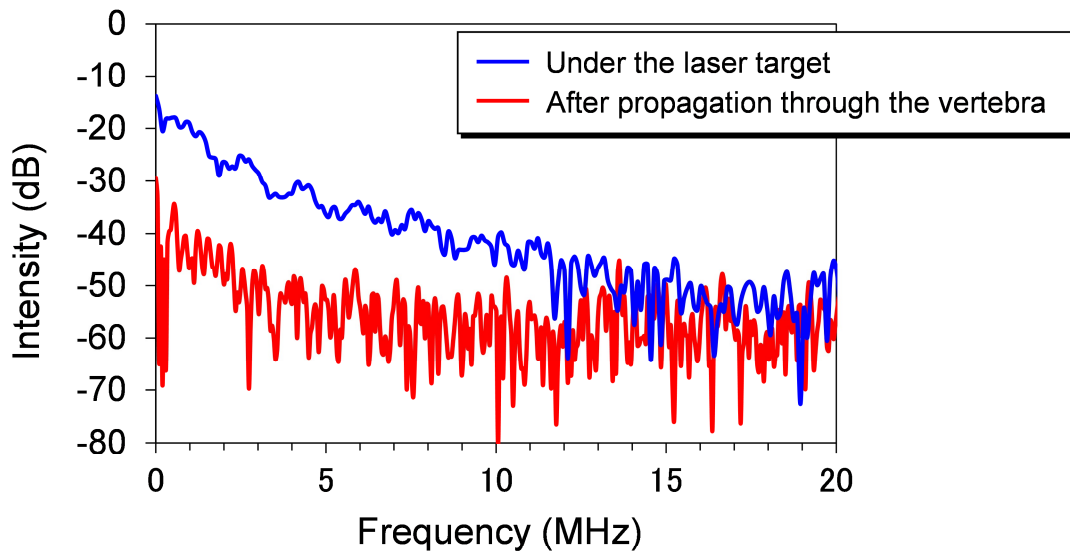


Fig. 2-16 Pressure profiles of the LISWs before and after propagation through the rat vertebra at a laser fluence of (a) 0.3 J/cm^2 and (b) 0.9 J/cm^2 with a 3-mm spot diameter. The thickness of the vertebra was approximately 2.5 mm.

(a) Laser fluence 0.3 J/cm^2



(b) Laser fluence 0.9 J/cm^2

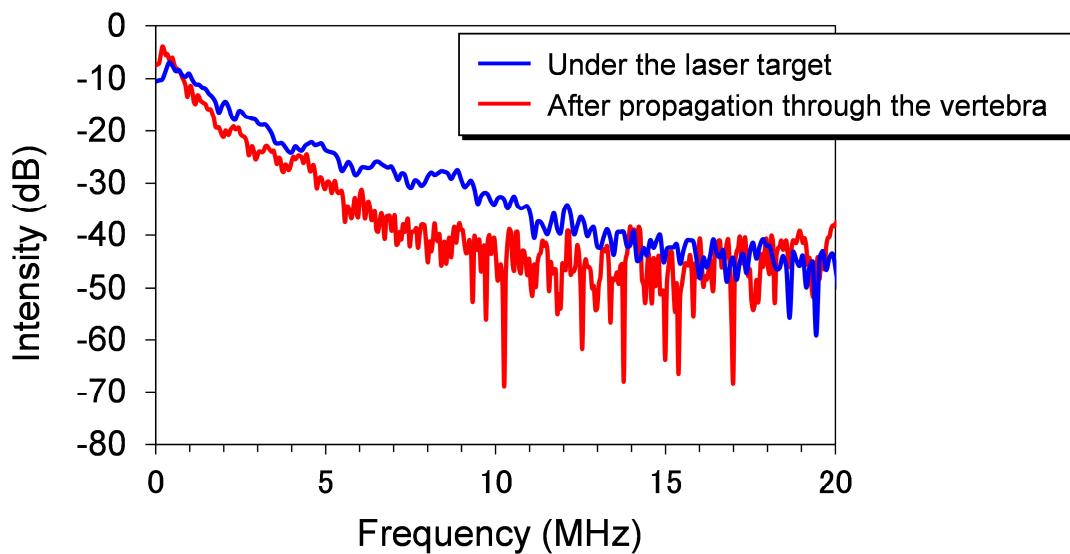


Fig. 2-17 Frequency spectrum of LISWs before and after propagation through the rat vertebra at a laser fluence of (a) 0.3 J/cm^2 and (b) 0.9 J/cm^2 with a 3-mm spot diameter.

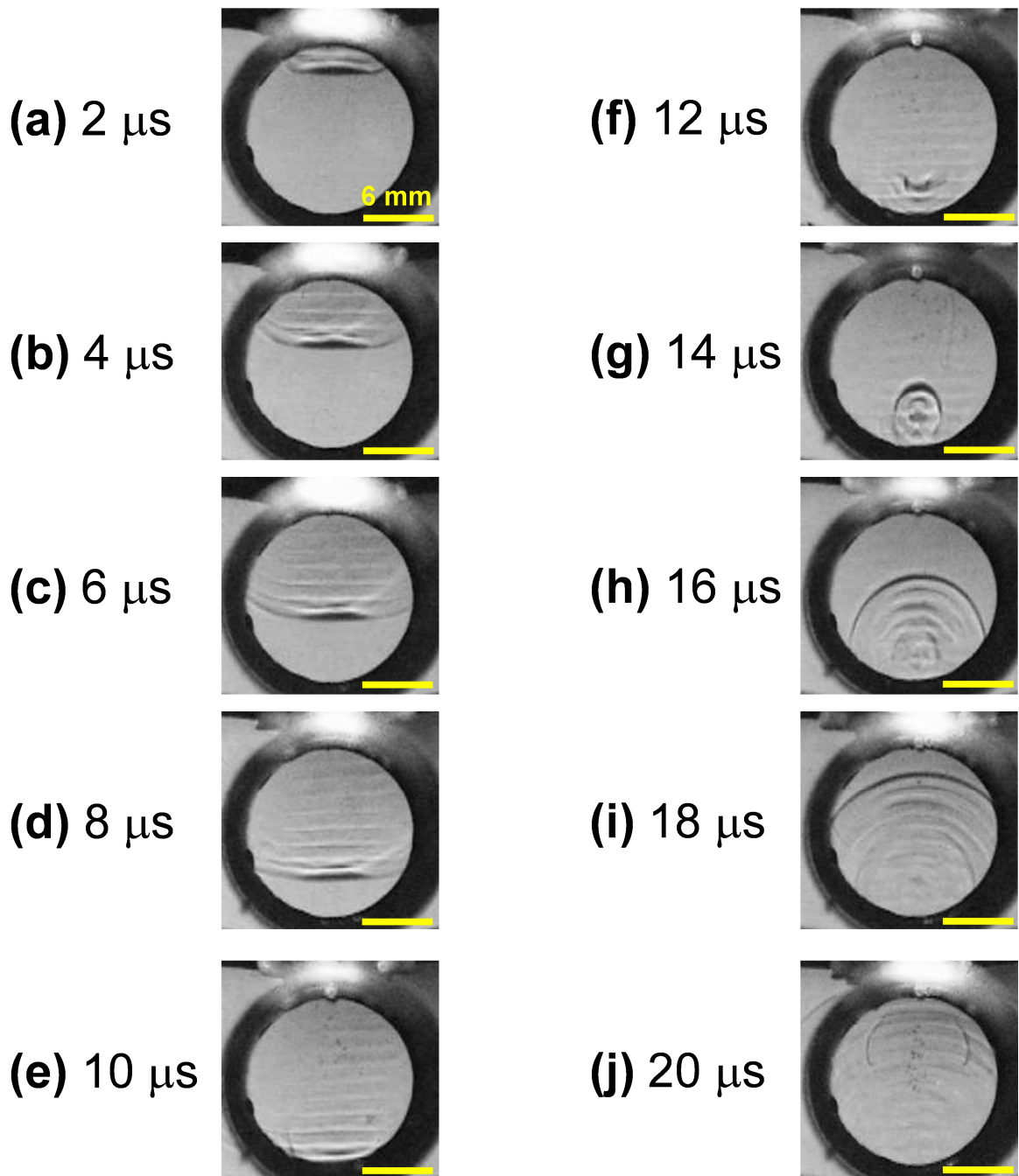


Fig. 2-18 Shadowgraphs of LISWs propagating through a spinal cord phantom.

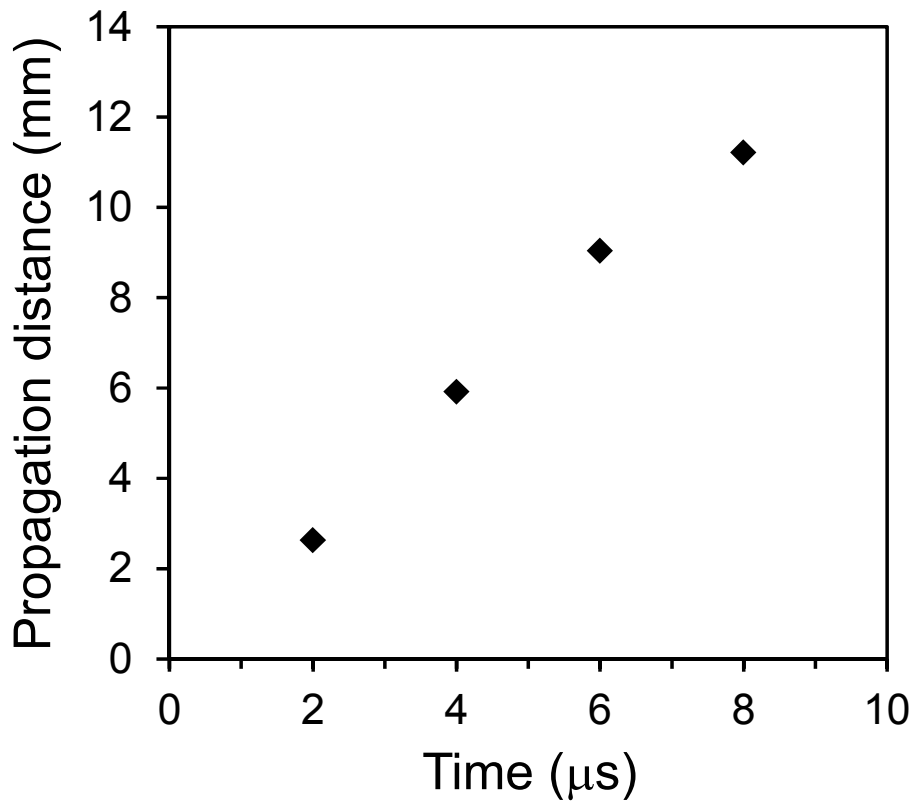


Fig. 2-19 Propagation distances from the bottom of the target as a function of time, which were measured from the shadowgraphs of LISWs (Fig. 2-18).

第3章

レーザー誘起応力波による健常ラット脊髄への 部位選択的遺伝子導入

3.1 はじめに

脊髄損傷が起こると、軸索の離断によって神経シグナルの伝達が阻害される。近年の研究によれば、もともと白質に多く存在するミエリン由来タンパク質(Nogo-A)やミエリン関連糖タンパク質(MAG)、または軸索周囲の細胞が産生するグリア瘢痕形成因子が軸索再生を阻害し、神経再生を妨げていることがわかっている[1-6]。そのため、損傷脊髄内のアストロサイトに対してグリア瘢痕形成に寄与するタンパク質の生成を抑制する因子を発現させることができれば効果的な神経再生が期待できる[11-14]。現在までにウイルスを用いた方法をはじめ、様々な遺伝子導入法が研究されているが、特に中枢神経系の遺伝子治療では、健常組織に影響のない、損傷部位およびその周辺における部位選択的な遺伝子発現が求められる。それに加えて、脊髄は管状の椎骨で囲まれた神経組織であるために、生体深部まで治療遺伝子を導入できる技術が必要である。

LISW による遺伝子導入技術は、レーザーの空間制御性と応力波が備える深部侵達性から、部位選択的な脊髄損傷の遺伝子治療を実現するための有効な手段となり得る。しかし、これまでに報告されている LISW を用いた *in vivo* での遺伝子導入対象は、ラットの皮膚、顔面筋、およびマウス脳に限られ[15-20]、脊髄組織への遺伝子導入は未だ実証されていない。一般に、神経組織の脆弱性と血液脳脊髄液関門に代表される防御機能から、中枢神経系に対する遺伝子導入は困難である[7]。LISW を用いたマウス脳への遺伝子導入でも、プラスミド DNA をカチオン性試薬により化学的修飾して細胞内取り込みと核内への移行を促進している[16]。

本章では、最初に中枢神経系の構成細胞を概説し、続いてそれら細胞の膜透過性亢進に寄与する LISW の力学的作用を説明する。次に、第 2 章で述べた LISW の圧力伝搬特性に基づき、健常ラット脊髄に対してプラスミド DNA を注入後、LISW を直接適用して標的部位選択的な脊髄への遺伝子導入が可能であるかを実験により調査した。これにより、LISW 適用によって得られる遺伝子発現特性、ならびに脊髄の機能に対する LISW の影響を評価して本遺伝子導入法の安全性を検討する。

3.2 中枢神経系の構成

脊椎動物において、中枢神経系は脳と脊髄を指す。神経系の構成細胞は、感覚・統合・運動などの情報処理を基盤とした神経機能を直接担うニューロン(neuron, 神経細胞)と、ニューロンを保護しその恒常性を維持することで間接的に神経機能を担うグリア(glial cell,

神経膠細胞)とに大別される。ヒトの脳には100億から500億個のニューロンがあるとされているが、グリアの数はその2倍から5倍もあると言われている[21]。ニューロンとグリアはそれぞれ単独では神経機能を果たすことはできず、発生・分化・機能発現の各段階において相補的に作用している。

Figure 3-1 に示すように、ニューロンは神経回路形成と神経情報伝達に適するよう高度に分化した形態を有している[22]。樹状突起(dendrite)は神経情報の入力部となる領域で、他のニューロンの軸索からのシグナルを受け取る役割を担う。そのため、樹状突起棘と呼ばれる突出構造で表面積を増やし、多くの情報を得るのに適した構造を持つ。細胞体(neuronal cell body)は、核と核周囲部からなる。核周囲部は、タンパク質合成と分解に関わる細胞内小器官が多数集まっている。細胞体の特徴として、遊離または粗面小胞体に結合した多量のリボソームが存在していることが挙げられる。リボソームは、DNA を転写した mRNA (messenger RNA)を基にタンパク質の生成が行われる場である。軸索(axon)は、樹状突起と比べると細く長い細胞突起である。次第に先が細くなる樹状突起とは異なり、その径は全長に渡って一定で、神経信号を電気パルスとして伝導する。そのため、軸索の破断は神経路が担っている感覚機能、運動機能の喪失につながる。軸索はタンパク質合成を行う小器官を有さないため、必要とするタンパク質と酵素は細胞体からの軸索輸送に頼らざるを得ない。軸索の起始部は初節と呼ばれ、活動電位が最初に発生する部位である。活動電位は、細胞内外のイオン移動で生じる膜電位の一瞬の変動であり、それは神経情報の伝達のために軸索に沿って波動状に移動する。終末部(terminal)は、軸索の途中に形成される膨らみであり、活動電位が終末部に到達すると電位依存性 Ca^{2+} チャンネル(細胞膜に存在して受動的にイオンを透過させる膜貫通タンパク質)が活性化し、神経伝達物質の放出が起こる。ニューロンの細胞骨格は、神経細線維と呼ばれる微小管(microtubule)、ニューロフィラメント(neurofilament)、ミクロフィラメント(microfilament)の3要素からなり、これらが細胞の形を決める主因子となっている。

中枢神経系のグリアには、4種のグリアが存在する(Fig. 3-2)[23]。オリゴデントロサイト(oligodendrocyte, 希突起膠細胞)は、終末分岐以外の軸索を被覆するミエリン(myelin, 髄鞘)を形成するグリアである。ミエリンは約70%の脂質と約30%のタンパク質からなり、電気的な絶縁効果を示す。神経信号を電気インパルスとして伝導する軸索はこのミエリンで囲われており、生体中では銀白色の様相を呈すが、ミエリンが取り巻かれていない細胞体では鈍い灰色に見える。このことから、脳と脊髄で軸索が走行している部位は白質(white matter)、ミエリンのない細胞体が集まる部位は灰白質(gray matter)と呼ばれる[21]。これらの部位の位置関係を示すため、脊髄の構造を Figure 3-3 に示す[24]。脊髄実質の太さは、ヒ

トの場合は約 10~15 mm, ラットのケースはおよそ 3~4 mm である。アストロサイト(astrocyte, 星状膠細胞)は、その名の通り多極性の形態をとる場合が多く、ニューロンを機械的に支持する働きと局所的なニューロンの活動に伴い上昇する細胞外の K^+ イオンを緩衝する働きを有する。その特徴の一つは、細胞骨格タンパク質としてグリア線維酸性タンパク質(glial fibrillary acidic protein, GFAP)を大量に有していることである。このアストロサイトは、構造と機能によって原形質性と繊維性の 2 タイプに分類される[25]。原形質性アストロサイトは、細胞体と密接して灰白質に存在し、小さな枝分かれの多い短い突起を持っている。その密接性から、細胞の種類としては衛星細胞(satellite cell)とも見なされ、ニューロンの代謝の媒介体として機能する。繊維性アストロサイトは主に白質の神経線維間に認められる。いくつかの細くて長い滑らかな突起が細胞体から起こるが、これらの突起はほとんど枝分かれしない。繊維性アストロサイトは損傷した組織を修復するために機能し、この過程は癒痕形成を引き起こすと考えられている。上衣細胞(ependymocyte)は、脳脊髄液で満たされる脳室および脊髄の中心管(central canal)の内壁を構成するグリアで、単一層を形成する立方状あるいは円柱状の細胞である。ミクログリア(microglia, 小膠細胞)は、グリアの中で最も小さく、全グリア中では約 10%を占めている。末端が針状で短くて枝分かれする少数の突起を有し、ニューロンに損傷および変性が起きたときに活性化され貪食機能を果たす。

他の細胞と同様、中枢神経系に存在する以上の全ての細胞(ヒトの場合、概ね直径 10~20 μm 程度)も、リン脂質とタンパク質を主成分とする厚さ約 5~8 nm の細胞膜に包まれている[21]。さらに、一つの細胞内には核膜と呼ばれる脂質二重膜で囲まれた一つの核が存在し、その内部に遺伝子の実体である DNA が含まれる。遺伝子治療では、特定のタンパク質を発現する遺伝子を外部からこの核内まで導入しなければならず、細胞膜と核膜という 2 つの障壁を透過させる必要がある。遺伝子治療に用いられる一般的なプラスミド DNA は、幅はおよそ 2 nm, 全長は数 μm , 分子量は数 MDa の巨大分子($1 \text{ Da} = 1.661 \times 10^{-24} \text{ g}$)であり、その大きさだけを考えても細胞周囲に存在しているだけの状態では、細胞内および核内への移行は困難である。

3.3 LISW の物理特性と細胞への力学的作用

超音波の集束から衝撃波管、微小爆薬、LISW に至るまで、圧力パルスの発生には様々な方法がある。低圧力パルスであれば細胞膜の透過性亢進作用が顕著であり、高圧力パルスでは細胞障害作用が支配的である[26-33]。それらの作用が生ずる圧力の閾値に関しては多くの報告があるが、細胞膜の透過性亢進作用があるのは、典型的にはピーク圧力が 10

MPa から 100 MPa, 圧力パルス幅がナノ秒からマイクロ秒の応力波パルスとされている[34]. 細胞膜の透過性亢進と物理的な膜損傷の 2 つの作用を引き起こす機序としては, 応力波の作用による細胞膜の相対的変位, せん断歪み, 圧縮破壊, 引張り荷重などが考えられる[34]. これらのどれもが細胞膜の物質透過特性に影響を与える可能性があるものの, 最も単純には細胞膜を構成する脂質二重層の相対的変位と細胞膜全体のせん断歪みが主な原因と考えられている. 細胞膜が, 瞬間的な圧力作用による変位とせん断歪みで可逆的構造変化を起こすことは, 分子動態シミュレーションを用いた研究でも明らかになっている[35-38].

生体組織を構成する物質は多様である. ここでは簡単のため, 生体を非粘性の液体と見なすことで, 瞬間的な圧力(impulsive pressure)が作用したときに生じる細胞膜の変位と歪みについて考える. この仮定は, 血管内液と脳脊髄液の主成分が液体としての水であり, 細胞内と細胞間における存在も含めると, 生体重量の約 60 ~ 70%が水で構成されていることに基づくものである. 「液体」は, 外力に対して変形し, 流動する流体であるため, 圧縮性の有無にかかわらず次の流体の運動方程式(Euler's equation)で記述される[39].

$$\frac{D\mathbf{v}}{Dt} = \left(\frac{\partial}{\partial t} + \mathbf{v} \cdot \nabla \right) \mathbf{v} = \mathbf{F} - \frac{1}{\rho} \text{grad } p \quad (3.1)$$

ここで, \mathbf{v} は流れ場の速度, \mathbf{F} は流体の単位質量あたりに働く力(外力), ρ は流体の密度, p は圧力を表す. 速度ポテンシャル ϕ を $\mathbf{v} = \text{grad } \phi$ と定義し, 非圧縮性流体として密度 ρ が一定で, かつ, \mathbf{F} が空間的に変化しない(渦なし)と仮定すると, (3.1)式は速度ポテンシャル ϕ を使って次式に書き換えることができる.

$$\frac{\partial \phi}{\partial t} + \frac{(\nabla \phi)^2}{2} + \frac{p}{\rho} - \Omega = F(t) \quad (3.2)$$

重力のような外力のポテンシャルエネルギー Ω はないものとし, z 軸方向のみの一次元の変化($v = dz/dt$)で表すと(3.2)式は次のようになる.

$$\frac{p}{\rho} = -\frac{\partial \phi}{\partial t} - \frac{v^2}{2} + F(t) \quad (3.3)$$

位置 \mathbf{z} に存在する静止した流体中に有限の圧力パルスが作用したとき, その瞬間的な圧力

σ は(3.3)式を用いて次式のように表せる.

$$\sigma \equiv \lim_{\delta t \rightarrow 0} \int_0^{\delta t} p(\mathbf{z}, t) dt = -\rho \lim_{\delta t \rightarrow 0} \left[\int_0^{\delta t} \frac{\partial \phi}{\partial t} dt + \frac{1}{2} \int_0^{\delta t} v^2 dt - \int_0^{\delta t} F(t) dt \right] \quad (3.4)$$

静止した流体としているため, 時刻 $\delta t \rightarrow 0$ において速度ポテンシャル ϕ は有限値であるが速度 v はゼロとなる. また, ここでは定常的に流体に働く外力は存在せず, 圧力発生にも寄与がないため, 外力 $F(t)$ は無視できる. よって, 瞬間的な圧力 σ は速度ポテンシャルと密度のみで記述される.

$$\sigma = -\rho \phi \quad (3.5)$$

Figure 3-4 に生体モデルの模式図を示す. 以下, (3.14)式まで Kodama らの用いた流体力学的解析を基に, 瞬間的な圧力が作用した時の細胞膜(細胞内外の境界部)の変位について説明する. 細胞とその周囲の媒質(ともに液体)の密度をそれぞれ ρ_c , ρ_f とし, 細胞の体積分率を α としたとき, モデル全体の平均密度 ρ_m は次式で表される[29].

$$\rho_m = \alpha \rho_c + (1 - \alpha) \rho_f \quad (3.6)$$

z 軸方向に瞬間的な圧力 σ が作用した瞬間, 細胞内外の媒質は一体と見なされ, それぞれ速度 v_{c0} , v_{f0} で移動する. よって, (3.5)式と速度ポテンシャルの式($\mathbf{v} = \text{grad} \phi$)から,

$$\rho_c v_{c0} = \rho_f v_{f0} = -\text{grad} \sigma \quad (3.7)$$

となる. また, 速度ポテンシャル ϕ によって誘起される速度を, 細胞内と細胞外でそれぞれ v_c , v_f とすると, 体積分率はそれぞれ α , $1 - \alpha$ であるため,

$$\rho_c v_c = -\alpha \cdot \text{grad} \sigma, \quad \rho_f v_f = -(1 - \alpha) \cdot \text{grad} \sigma \quad (3.8)$$

で表される. (3.7)式と(3.8)式から, 速度に関して次式が求められる.

$$v_c = \alpha v_{c0}, \quad v_f = (1 - \alpha) v_{f0} \quad (3.9)$$

こうして細胞とそれを取り囲む液体の間に生じる相対的な流速は次式で表せる。

$$\begin{aligned}
 w &= v_c - v_f \\
 &= \left(\frac{1-\alpha}{\rho_f} - \frac{\alpha}{\rho_c} \right) \text{grad} \lim_{\delta t \rightarrow 0} \int_0^{\delta t} p(\mathbf{z}, t) dt \\
 &\approx \left(\frac{1-\alpha}{\rho_f} - \frac{\alpha}{\rho_c} \right) \frac{1}{\Delta z} \bar{p} \Delta t
 \end{aligned} \tag{3.10}$$

ここで、 Δt は微小時間、 \bar{p} はその微小時間内における圧力の時間平均値である。細胞外から細胞内に伝搬する瞬間的な圧力の伝搬速度を U_m としたとき、 $U_m = \Delta z / \Delta t$ となることから、細胞内外の密度比 $\beta = \rho_c / \rho_f$ を用いて、(3.10)式は次式で表すことができる。

$$w = \frac{\bar{p}}{\rho_m U_m} [\alpha(\beta - 1) + 1] \left[1 - \left(1 + \frac{1}{\beta} \right) \alpha \right] \tag{3.11}$$

(2.23)式より、正圧が持続する間(t_+)の積算で定義される圧力積分値 I_p を用いれば、

$$\bar{p} = \frac{1}{t_+} \int_0^{t_+} p(t) dt = \frac{I_p}{t_+} \tag{3.12}$$

で表される。また、伝搬速度 U_m はTaitの式を用いて、

$$U_m = \sqrt{\frac{n(\bar{p} + B)}{\rho_m}} \tag{3.13}$$

となることが知られている。これは実験的に求められた関係式であり、20°Cの水中では、 n と B はそれぞれ7.15、 3.047×10^8 Paと報告されている[40]。よって、細胞を含む非粘性の液体に対して、瞬間的な圧力が作用したときに生じる相対的変位 $d(=w \times t_+)$ (relative displacement)は次式によって記述される。

$$d = \left| \frac{I_p}{\rho_m U_m} [\alpha(\beta - 1) + 1] \left[1 - \left(1 + \frac{1}{\beta} \right) \alpha \right] \right| \quad (3.14)$$

一方、Lokhandwalla らの力学的解析[41, 42]と Sundaram らの実験的検証[34]では、瞬間的な圧力の伝搬(応力波)によって生じる細胞の表面積の歪みを調査している。応力波が作用する前の細胞表面積を A として、その変化(面歪み $\varepsilon = \Delta A/A$)は

$$\varepsilon \approx \left(\frac{\Delta p}{\Delta z} \right) \frac{\Delta \tau}{\rho_m U_m} \quad (3.15)$$

と表せる[34]。ここで、 $\Delta \tau$ は応力波の作用時間を表す。空間的に応力波が作用する距離を Δz 、伝搬速度 U_m が一定であるとしたとき、(3.15)式は次式のように書き換えられる。

$$\varepsilon \approx \left(\frac{\Delta p}{U_m \Delta t} \right) \frac{\Delta t}{\rho_m U_m} = \frac{\Delta p}{\rho_m U_m^2} \quad (3.16)$$

このとき、空間的な圧力上昇は圧力上昇速度と等価となり、歪み ε はピーク圧力に比例して増加することがわかる。

以上のように、生体に LISW を作用させたときに、細胞膜の変位は圧力積分値に比例し、細胞全体としての歪みはピーク圧力(伝搬速度が一定の場合は圧力上昇速度と等価)に比例すると考えられる。よって、細胞膜の変位と細胞全体としての歪みが影響を与えると考えられる、細胞膜の透過性亢進と物理的な膜損傷の 2 つの作用を引き起こす因子は、流体力学的に圧力積分値、ピーク圧力、および圧力上昇速度と考えられる。次の遺伝子導入実験においてもこれらの圧力特性と遺伝子導発現量または組織損傷の関係を調査していく。

3.4 健常ラット脊髄へのレポーター遺伝子導入実験

3.4.1 プラスミド DNA

プラスミド DNA は、細胞内に内在する染色体とは別に自律的に複製される DNA 分子である。遺伝子導入技術の有効性と遺伝子発現特性の調査には、これにレポーター遺伝子

をコードして用いられる[43, 44]. レポーター遺伝子が細胞中の核内で、その転写と翻訳の過程を経ると特定のタンパク質が発現し、それが染色性、蛍光、および化学発光を生じる。プラスミド DNA には直鎖状または環状のものが用いられる。一般に環状プラスミド DNA の方が細胞へ取り込まれやすく、細胞内での安定性が高く、遺伝子発現効率が高くなる[45, 46]. そこで、本実験ではベクターとして環状のプラスミド DNA を用いた。

遺伝子発現の空間分布を観察するためには、緑色蛍光タンパク質の変異体である EGFP (enhanced green fluorescent protein) を発現する遺伝子をコードしたプラスミド DNA を用いた (Fig. 3-5 (a))[47]. GFP はオワンクラゲに由来する分子量が約 27 kDa の蛍光タンパク質であり[48], 生体内の細胞および培養細胞での遺伝子発現のレポーター分子として広く用いられている。蛍光観察を行う際に他の基質を必要とせず、励起光のみで強い蛍光が得られる。2008 年には、この GFP の発見および分離精製で Shimomura らがノーベル化学賞を受賞しているが[49], 野生型 GFP は生体内での構造安定性が低いため、細胞生物学の領域では改変型 GFP が使用されることが多い。そこで、本実験は励起波長 480 nm 付近の光で 507 nm 近辺の緑色蛍光を発する EGFP を発現するレポーター遺伝子を用いることとした(pEGFP, Clontech). 一方、遺伝子発現レベルを定量的に評価するためには、ルシフェラーゼ(luciferase) を発現する遺伝子を組み込んだプラスミド DNA を用いた。ルシフェラーゼ発現遺伝子 (Promega) は、Figure 3-5 (b) で示す通り pcDNA (Invitrogen) に SV プロモーターが挿入されたものである[50]. ルシフェラーゼ発現遺伝子が細胞内に導入されて、転写と翻訳が行われると発光酵素のルシフェラーゼが生成される。発光基質のルシフェリンは、ルシフェラーゼと Mg^{2+} を触媒として ATP と酸化反応をして酸化ルシフェリンとなる。この酸化ルシフェリンは励起状態であり、基底状態に遷移する際に波長 560 nm の光を発するため、ルミノメータを用いてこの発光量を測定することで定量的な遺伝子発現レベルが得られる。また、遺伝子発現レベルのベースラインを計測するため、コントロールベクター(control vector) と呼ばれる、レポーター遺伝子をコードしていないプラスミド DNA を用いた。

プラスミド DNA を細胞内に取り込めるコンピテント細胞(competent cells, 形質転換受容性細胞)として大腸菌を用い、以上のプラスミド DNA それぞれについて、Qiagen Plasmid Giga Kit (Qiagen Inc.) を用いて DNA を増幅した。アルカリライシス法にて精製後、TE バッファーを用いてプラスミド DNA の濃度を 2.0 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ に調整した。

3.4.2 レーザ誘起応力波の適用

脊髄に対する LISW の適用方法は、臨床でよく用いられる椎弓切除術を施した後の適用、

またはより非侵襲な椎骨を介しての間接適用が考えられる。第2章で述べた脊髄ファントム内での伝搬特性計測によれば、直接適用の場合には、面波源の LISW は指向性よく脊髄内を伝搬するため標的部位選択的に圧力を作用させることができる。また、ラット椎骨を介した LISW の適用における圧力減衰率が大きいこと(伝搬前後のピーク圧力は 6.5%にまで減衰)を考えると、複数回の LISW 適用時には骨組織の損傷も懸念される。そのため、本実験では Figure 3-6 (a)に示すように、椎弓切除をした上で直接 LISW を脊髄に対して適用した。

遺伝子導入対象として、Sprague-Dawley ラット(日本エスエルシー、メス、体重 140~260 g)を用いた。ペントバルビタール 50 mg/kg の腹腔内投与による麻酔下に、第 10 胸椎の椎弓切除を施し、胸髄硬膜を露出させた。そして固定台を用いて、胸髄硬膜を露出したラットおよび 27 ゲージの注射針を装着したマイクロシリンジの位置を固定した。マイクロシリンジは、ラット前頭面に対して垂直な方向から、下位の脊髄が走行する方向に対して 10° 傾斜させ、正中からの左に距離 1 mm、硬膜からの深さ 2 mm の脊髄実質(灰白質)に刺入し、プラスミド DNA 溶液(Sham 群の場合は生理食塩水)を 10 μ l 注入した。健常ラット脊髄であることから、髄内への直接投与による組織損傷は少ないと考えて本投与方法を選択した。また、注入部位を白質でなく灰白質としたのは、白質に多く存在する軸索損傷を防ぐ目的と、より広範囲にプラスミド DNA 溶液を拡散させる目的からである。注入速度は、髄内の液圧(動圧)が過度に上昇するのを防ぐために 5 μ l/min 未満とした。LISW の発生方法は第2章で述べた実験と同様で、プラスミド DNA 溶液を注入した胸髄の硬膜上にターゲットを設置し、Q スイッチ・Nd:YAG レーザ(Brilliant b, Quantel)の第2高調波(波長 532 nm, パルス幅 6 ns)を平凸レンズ($f=200$ mm)で集光してターゲットに照射した(Fig. 3-6 (b))。このとき、ターゲットから発生した LISW を効率的に伝搬させるため、黒色天然ゴムと胸髄硬膜の間には音響結合剤として超音波ゼリー(Echo Jelly, アロカ)を塗布した。第2章で述べた実験において測定した LISW の圧力特性と遺伝子発現特性の関係を調べるために、レーザの照射条件は伝搬特性計測実験と同じ照射スポット径 3 mm, フルエンス 0.3 J/cm² または 0.9 J/cm² とした。第2章で述べた実験と同様に、ターゲットの黒色天然ゴムとポリエチレンテフタレートは 1 パルスのレーザ照射で剥離し、2 パルス目以降ではプラズマ閉じ込め効果が減少するため、ターゲットは 1 パルス毎に交換し、圧力特性の再現性が高い LISW を発生させた。そのため、LISW のパルス間隔はおよそ 10 秒であった。

3.4.3 遺伝子発現の評価

EGFP 発現遺伝子の導入実験では、遺伝子導入から 48 時間後、ペントバルビタール 50 mg/kg の腹腔内投与による麻酔下に、4%パラホルムアルデヒドリン酸緩衝溶液(200 ml)による灌流固定を行った。この遺伝子発現の評価時間は、脊髄に対する電気パルスあるいは超音波を用いた物理的遺伝子導入法の先行研究を参考に決定した[51-55]。灌流固定後、椎弓切除部分(遺伝子導入の標的部位である第 10 胸椎下)の組織を中心に長さ約 10 mm の脊髄を切り出し、灌流固定時と同じ組織固定液で後固定を約 16 時間行った。20%スクロース入りのリン酸緩衝生理食塩水(4℃)で洗浄した後、液体窒素を用いて OCT (optimal cutting temperature)コンパウンド(4583, Tissue-Tek)中に組織を包埋し、マイクロトームにて一定の厚さ 10 μ m で薄切した(矢状断)。EGFP の発現(蛍光)は、蛍光顕微鏡(Axiovert 200, Carl Zeiss)を用い、波長 465 ~ 505 nm で励起し、波長 515 ~ 565 nm のバンドパスフィルタを挿入して観察した。レーザの各照射条件でラット 4 匹を対象に実験を行った。

脊髄の白質(軸索が多く存在する部位)、灰白質(神経細胞体が集まっている部位)における EGFP の発現量を半定量的に評価するため、それぞれの部位で緑色蛍光画像の任意の 400 \times 400 ピクセルの関心領域(region of interest, ROI)から、EGFP 由来と考えられる特定の強度以上のピクセル数をカウントした。照射レーザの各条件、部位ごとの同ピクセル数に関してクラスカル・ウォリス(Kruskal-Wallis)検定による比較を行い、多重比較にはシェッフエ(Scheffe)の方法を用いた。 $P < 0.05$ を統計学的に有意であるとした。この結果に基づき、脊髄への効率的遺伝子導入が可能な LISW のレーザパラメータ(フルエンスとパルス数)を決定した。次に、ルシフェラーゼ発現遺伝子の導入実験にはこれらレーザパラメータを用いた。

ルシフェラーゼ発現遺伝子の導入実験では、最初に導入 48 時間後の遺伝子発現レベルの部位選択性を調査し、続いて遺伝子発現レベルの経時的変化を調査した。遺伝子発現レベルの定量評価にはルシフェラーゼアッセイキット(E1500, Promega)を用いた。髄節単位の遺伝子発現分布について調べるため、ペントバルビタール 50 mg/kg の腹腔内投与による麻酔下に、椎弓切除部分(遺伝子導入の標的部位である第 10 胸椎)の上下それぞれ 2 椎弓(第 8, 9, 11, 12 胸椎)を切除し、それら椎弓下にある脊髄組織を切り出し、髄節ごとに 1.5 ml チューブに入れ分けた。このチューブにそれぞれ細胞溶解液 500 μ l を入れて脊髄を浸し、剪刀によって細かく切断、均一化した。同サンプルを遠心(150 \times 100 rpm, 15 分)した後、上澄み 20 μ l を 5 ml ラウンドチューブに移し、100 μ l のルシフェリンを滴下した。攪拌後、ルミノメータにてルシフェラーゼ活性を測定した(単位は relative light units (RLU))。ルシフェラーゼ活性として一般的に用いられる 10 秒間[44, 56]の化学発光量を、ルミノメータにより計測して積算した値をルシフェラーゼ活性値とした。切り出した組織の大きさにばら

つきがあることから、タンパク質濃度計測キット(500-0116, BioRad)を用いて胸髄節ごとのタンパク質量を求め、単位タンパク質量あたりのルシフェラーゼ活性(RLU/mg protein)を算出した。

次に、遺伝子発現レベルの経時的変化を調べるため、遺伝子導入前(0日目)、遺伝子導入から1日後、2日後、5日後、および10日後の単位タンパク質量あたりのルシフェラーゼ活性を求めた。この実験では、LISWを適用した胸髄と上下1胸椎の髄節(第9~11胸髄)におけるルシフェラーゼ活性、およびタンパク質量を合算して単位タンパク質量あたりのルシフェラーゼ活性を算出した。ここで、上下1胸髄を合算する理由については、実験結果の項で述べる。プラスミドDNA注入のみ(Control群)とLISW適用群の2条件につきラット5~10匹を対象に実験を行い、データの統計解析を行った。各日ごとの2条件につきマン・ホイットニー(Mann-Whitney)検定を行い、 $P < 0.05$ を統計学的に有意であるとした。

3.4.4 遺伝子発現細胞の同定

遺伝子発現細胞の同定には、細胞に存在する特異抗原(タンパク質)を酵素反応により検出する免疫染色が一般に用いられる。先述したEGFP発現遺伝子の導入実験において、作製した組織スライスにこの免疫染色を施すことで蛍光タンパク質が発現した細胞の同定が可能である。そこで、ニューロンの細胞体の同定として、神経細胞核の特異的な抗原を染色するNeuN (Neuronal nuclei)染色を、アストロサイト(グリア)の同定にはGFAP染色を用いた。3.4.3項で作製したEGFPを発現している凍結スライスに対し、NeuN染色とGFAP染色でそれぞれ抗NeuN・マウスモノクローナル抗体(希釈率1:1000, MAB377, Chemicon), 抗GFA・ウサギポリクローナル抗体(希釈率1:3, N1506, Dako)を一次抗体として用いた。二次抗体には、前者はRhodamine標識抗マウスIgG(希釈率1:100, AP181R, Chemicon), 後者はTRITC (Tetramethyl-rhodamine-isothiocyanate)標識抗ウサギIgG(希釈率1:40, R0156, Dako)を用いた。インキュベーションの時間は一次抗体が室温25°Cで2時間、二次抗体が室温25°Cで1時間(NeuN染色)ないし2時間(GFAP染色)である。RhodamineとTRITCは蛍光分子であり、波長540nm付近の励起光で波長580nm近辺の橙色の蛍光を発する。組織スライスの封入には、蛍光染色用マウンティングメディウム(S3023, Dako)を用いた。蛍光顕微鏡(Axiovert 200, Carl Zeiss)による観察で、緑色蛍光を発するEGFPと赤色蛍光を発するNeuN, GFAPの蛍光画像をそれぞれ重ね合わせて遺伝子発現細胞を同定した。赤色蛍光分子の蛍光は、波長534~558nmで励起し、波長590nm以上の透過フィルタを挿入して観察した。

3.4.5 運動機能評価

脊髄に対する LISW の安全性を調査するため、実験動物の運動機能の評価方法として汎用的に用いられている Basso-Beattie-Bresnahan (BBB)スコアによる評価を行った[57, 58]. これは、オープンフィールドで実験動物を歩行させ、複数の観察者がその下肢の動きを見て運動機能を 0 点から 21 点までの点数で評価する方法である(Table 3-1). 全く下肢に動きが見られないときを 0 点とし、健全な動きを 21 点とする.

EGFP 発現遺伝子の導入実験において、LISW の適用(遺伝子導入)から 24 時間後に 45 cm × 90 cm のオープンフィールドで 3 分間、歩行の様子を観察した. 左右の下肢でそれぞれ BBB スコアによる運動機能評価を行い、その平均スコアを算出した. EGFP 発現遺伝子の導入実験に合わせたレーザーの各条件(フルエンスとパルス数が(i) 0.3 J/cm², 3 パルス, (ii) 0.3 J/cm², 10 パルス, および(iii) 0.9 J/cm², 1 パルスの 3 条件)と、プラスミド DNA 注入のみ(Control), 生理食塩水注入のみ(Sham)を含めた 5 条件でラット 4~6 匹を対象に実験を行った. 各条件間でクラスカル・ウォリス(Kruskal-Wallis)検定による比較を行い、多重比較には Sham 群を対照群としたスティー爾(Steel)の方法を用いた. $P < 0.05$ を統計学的に有意であるとした.

3.5 実験結果

3.5.1 EGFP 発現遺伝子の導入

レーザーパラメータ(フルエンスとパルス数)を変化させたときの EGFP 発現遺伝子の導入実験結果(LISW の適用から 48 時間後)を Figure 3-7 に示す. 頭部を画像左側、背部を画像上側とした矢状断面のラット脊髄組織であり、緑色の蛍光が EGFP の発現を示す. 蛍光画像の上方が白質、下方が灰白質であり、破線はその境界を示している. 生理食塩水を注入したのみ(Sham)の群では、同じ強度の励起光で緑色蛍光は見られなかった. (b)は灰白質を中心とする脊髄実質内にプラスミド DNA を注入したのみで、LISW を適用していない場合の蛍光画像である. (c), (d), および(e)はプラスミド DNA の注入後に LISW を適用したときの蛍光画像であり、レーザーフルエンスとパルス数がそれぞれ(c)0.3 J/cm², 3 パルス, (d)0.3 J/cm², 10 パルス, および(e)0.9 J/cm², 1 パルスである. 第 2 章で述べた圧力計測実験から、脊髄表層(胸髄硬膜)に作用するピーク圧力はレーザーフルエンスが 0.3 J/cm², 0.9 J/cm² のとき、

それぞれ約 44 MPa, 131 MPa であった。LISW 適用の有無にかかわらず、灰白質では EGFP の発現が観察される。これは、プラスミド DNA 溶液を灰白質内に直接注入しているためと考えられ、注射針による細胞内への注入および貪食細胞(ミクログリアとマクロファージ)によるプラスミド DNA の貪食過程で EGFP が産生しているものと考えられる。

Figure 3-7 の蛍光画像において、プラスミド DNA 注入のみのラット脊髄の蛍光画像と比較して、LISW 適用時には白質部分の EGFP 発現が多くなっているように見える。白質と灰白質それぞれにおける EGFP の発現量を緑色蛍光ピクセル数として半定量化した結果を Figure 3-8 に示す。プラスミド DNA 注入のみの群と比較すると、レーザーフルエンス 0.3 J/cm^2 、3 パルスの LISW 適用群で、白質における緑色蛍光ピクセル数(遺伝子発現)が有意に高くなっていることがわかる。一方、灰白質における緑色蛍光ピクセル数に統計学的な有意差はなかった。ただ、この蛍光画像解析からは遺伝子発現が得られている細胞種は不明であり、細胞レベルでの発現評価については後述する(3.5.3 項を参照)。

Figure 3-8 に示すグラフでレーザーパラメータによる遺伝子発現の違いを比較すると、白質、および灰白質のいずれにおいても、フルエンス 0.3 J/cm^2 、10 パルスの LISW を適用した場合に、遺伝子発現レベルが最も高いことがわかる。フルエンス 0.3 J/cm^2 を 3 パルス適用した群とフルエンス 0.9 J/cm^2 を 1 パルス適用した群では、灰白質の緑色蛍光ピクセル数では前者、白質では後者が高い値を示すが、その合算値に大きな差は見られなかった。

3.5.2 ルシフェラーゼ発現遺伝子の導入

LISW の適用から 48 時間後に計測した、胸髄節ごとの単位タンパク質量あたりのルシフェラーゼ活性を Figure 3-9 に示す。コントロールベクターはルシフェラーゼを発現する遺伝子が組み込まれていないプラスミド DNA であり、その注入によるルシフェラーゼ活性値は遺伝子発現レベルのベースライン(バックグラウンド)を示す。適用した LISW のレーザーパラメータは、EGFP 発現遺伝子の導入実験結果で最も高い遺伝子発現が得られたフルエンス 0.3 J/cm^2 、10 パルスの条件である。プラスミド DNA を注入後に LISW を適用したのは第 10 胸椎下の脊髄(Th 10)であり、その部位ではプラスミド DNA 注入のみでも一定の遺伝子発現レベルが得られている(コントロールベクター注入群に比して約 6.1 倍)。一方 LISW 適用群では、Th 10 においてプラスミド DNA 注入のみに対して有意に高い遺伝子発現レベルを示していることがわかる(プラスミド DNA 注入のみの群に比して約 18 倍)。Th 10 前後における遺伝子発現レベルは、Th 9, Th 11 のいずれにおいても、プラスミド注入のみに比べて高い遺伝子発現レベルが得られており、特に脳脊髄液の流れの下流に位置す

る Th 11 では平均値で約 20 倍も高くなっている。これは、発現したルシフェラーゼが脳脊髄液中に流出するためと考えられる。血清に比べると脳脊髄液中のタンパク質濃度は 10% 程度であるが、脳脊髄液が代謝物を取り除く機能を備えることから[23]、遺伝子導入による産生タンパク質が流れる可能性は十分にあり得る。脳脊髄液は、脳内で産生された後、小脳延髄槽(頭部後方に位置)から脊髄の背側に存在するクモ膜下腔に向かって下方に流れ、脊髄の腹側面に沿って脳の底部まで上昇する[23]。プラスミド DNA の注入と LISW の適用はいずれも脊髄の背側(後索部)から行っているため、下流への流れが主体となり、下位の胸髄(Th 11)で特に高いタンパク質発現レベルを示したと推察される。

経時的な遺伝子発現レベルの変化を Figure 3-10 に示す。ここでは上記の結果から、LISW を適用した胸髄の前後にも髄液の流れの影響と考えられる発現タンパク質が観測されたことを勘案し、Th 9~Th 11 における単位タンパク質量あたりのルシフェラーゼ活性を合算して示した。遺伝子導入前の遺伝子発現レベルは、いずれの処置も施していない状態で計測したものである。プラスミド DNA 注入のみの群でも、注入から 1 日後には高い遺伝子発現レベルを示しているが、5 日後までに遺伝子導入前と同レベルまで低下している。これは、先述の EGFP 発現遺伝子の導入実験と同様に、注射針による細胞内注入と、ミクログリアあるいはマクロファージによるプラスミド DNA の貪食過程で発現したルシフェラーゼが、注入後早期に存在するためと考えられる。プラスミド DNA 注入のみの群と比較すると、LISW 適用群では遺伝子導入から 2 日後および 5 日後に、有意に高い遺伝子発現レベルを示した。上述のとおり、1 日後では LISW の効果が小さいのではなく、実質内へのプラスミド注入による貪食細胞での発現からバックグラウンドとしての発現レベルが高いため統計学的有意差が見られないと考えられる。10 日後の遺伝子発現レベルは遺伝子導入前と同等で、LISW 適用の有無にかかわらず導入前と 10 日目の遺伝子発現レベルの間に統計学的有意差はなかった。

3.5.3 遺伝子発現細胞の同定

蛍光免疫染色による遺伝子発現細胞の同定の実験結果を Figure 3-11 に示す。Figure 3-7 と同様、緑色蛍光は EGFP の発現を示している。ニューロンの細胞体の存在は NeuN (神経細胞核に特異的に存在するタンパク質)を標識する赤色蛍光分子から、また、グリアの一つであるアストロサイトの存在は GFAP を標識する赤色蛍光分子から確認できる。これらの蛍光画像は、遺伝子導入によって発現した EGFP の緑色蛍光と、NeuN または GFAP を標識した赤色蛍光を重ね合わせたもので、緑色と赤色が重なったときに呈する黄色の部分が遺

伝子発現した部位を示す。

Figure 3-11 (a)の NeuN 染色の結果からは、蛍光の重なりは確認されなかった。このことはニューロンの細胞体に対して遺伝子導入がなされていないことを示している。これは、ニューロンを取り囲む免疫系の働きによって外来遺伝子は分解され、核内までの移行が起らずに、ニューロンの細胞体での遺伝子発現が得られなかったためと考えられる。一方、Figure 3-11 (b)と(c)に示す GFAP 染色からは一部で蛍光の重なりが確認された。これは、3.5.1項で示した LISW の適用による EGFP の発現が、アストロサイトで生じていることを示す結果である。

3.5.4 運動機能評価

LISW の適用から 24 時間後の、BBB スコアによる運動機能評価の結果を Figure 3-12 に示す。比較として行った生理食塩水注入のみ(Sham)、プラスミド DNA 注入のみ(Control)の平均スコアは、それぞれ 20.9 と 20.3 であり、健常時のスコアである 21 点とほぼ同じであることから、椎弓切除と髄腔内投与による運動機能への影響はないと言える。これに対して、EGFP 発現遺伝子の導入実験で用いたレーザ照射条件で LISW を適用した 3 群については、フルエンス 0.9 J/cm^2 で発生させた LISW を 1 パルス適用した群において対照群(Sham)に対して有意に運動機能が低下した(平均スコア 12.6)。フルエンス 0.3 J/cm^2 を 3 パルス適用した群、または 10 パルス適用した群では運動機能の低下は見られなかった。それぞれの平均スコアは 20.0, 20.1 であった。

3.6 考察

3.6.1 LISW の物理特性と細胞への力学的作用

第 2 章で述べた通り、脊髄表面に作用させた LISW は組織内を伝搬する。このとき、圧力波パルスのエネルギーは媒質の散乱, 吸収, および幾何学的な拡散によって減衰するが、細胞スケールで見たときには、伝搬過程において生じる細胞への力学的作用(構成分子の変位や細胞全体の歪みなど)が細胞膜の分子透過性を亢進すると考えられている[29]。

Table 2-1 に示した LISW の物理特性に基づき、LISW が作用した時の細胞膜(細胞内外の境界部)の変位を(3.14)式から計算した結果を Figure 3-13 に示す。(3.14)式から、細胞膜の変位は圧力積分値に比例し、瞬間的な圧力が伝搬する流体中の細胞の体積分率 α の関数とな

る．ここで，細胞とそれを取り囲む液体の密度比 $\beta(= \rho_c / \rho_m)$ は 1.1 とし[59]，媒質全体の平均密度 ρ_m は水の密度 $1.0 \times 10^3 \text{ kg/m}^3$ を用いた．LISW の伝搬速度 U_m は，第 2 章の圧力特性計測で得られた値から，(3.12)式と(3.13)式を用いて U_m を算出した．例えば，レーザフルエンス 0.3 J/cm^2 (ターゲット直下)の圧力特性から $I_p = 8.4 \text{ Pa} \cdot \text{s}$ ， $t_+ = 583 \text{ ns}$ を用いて $U_m = 1511 \text{ m/s}$ と計算される．Figure 3-13 を見ると，細胞膜の相対的変位は $\alpha = 0.53$ のとき最小となり， $\alpha = 0$ または $\alpha = 1$ に近づくにつれてその値は増加する．瞬間的な圧力が誘起する速度ポテンシャル ϕ によって流速が変化するが，(3.5)式と(3.10)式から，細胞内外の密度比 β の値によっては，細胞内外で流速差 ($w = v_c - v_f$) が生じずに変位も生じなくなる．これが $\alpha = 0.53$ のときに特異点が見られる理由である．ただし，実際には流体の粘性および密度の空間的不均一性があるため，特異点が生じる，すなわち流速差がなくなる可能性は少ないと考えられる．中枢神経系の一つである脳における細胞の体積分率は，健常状態では $\alpha = 0.8$ 程度であることが知られている[60-63]．細胞膜の変位量を概算するため，Figure 3-13 において $\alpha = 0.8$ のときを考えると，レーザフルエンスが 0.3 J/cm^2 の場合，細胞膜の変位量 d は脊髄ファントムの伝搬距離 0 mm，2 mm，4 mm，および 6 mm で，それぞれ $3.2 \mu\text{m}$ ， $1.2 \mu\text{m}$ ， $1.0 \mu\text{m}$ ， $0.7 \mu\text{m}$ であった．一方，レーザフルエンスが 0.9 J/cm^2 の場合には同じ伝搬距離でそれぞれ $11.0 \mu\text{m}$ ， $5.3 \mu\text{m}$ ， $3.1 \mu\text{m}$ ， $1.9 \mu\text{m}$ であった．応力波の作用で生じる細胞の歪み ε は，(3.15)式によればピーク圧力に比例するため，レーザフルエンス 0.3 J/cm^2 (ターゲット直下でのピーク圧力は 44 MPa) に比べて 0.9 J/cm^2 の場合(同位置でのピーク圧力は 131 MPa) には，脊髄表層部分(後索)に存在する細胞に約 3 倍の歪みが生じていると見積もれる．フルエンス 0.9 J/cm^2 のときには，1 パルスの適用でも運動機能の低下が見られているため(Fig. 3-12)，これら細胞膜の変位 d と細胞全体の歪み ε が神経細胞の損傷閾値を越えていたと推察される．レーザフルエンス 0.3 J/cm^2 の場合には機能学的な損傷が見られずに遺伝子発現が得られていることから，細胞膜透過性の亢進に必要とされ，かつ細胞障害を引き起こさない細胞膜の変位量 d と歪み ε は $d = 0.7 \sim 3.2 \mu\text{m}$ ， $\varepsilon = 0.02$ であると考えられる．ここで歪みの値は，(3.16)式を用いて $\Delta p = 44 \text{ MPa}$ ， $\rho_m = 1.0 \times 10^3 \text{ kg/m}^3$ ， $U_m = 1500 \text{ m/s}$ として算出した．培養細胞と生体組織において細胞を取り囲む環境は大きく異なるものの，*in vitro* 実験では，Kodama らおよび Sundaram らのそれぞれの検証した結果で， $d > 1 \mu\text{m}$ または $0.01 \leq \varepsilon \leq 0.03$ の範囲で細胞膜透過性の亢進が起きているとしている[29, 34]．より複雑な生体モデルでの検討が必要と考えられるが，細胞の膜透過性亢進を引き起こすとされる細胞膜のおおよその変位と歪みが，本遺伝子導入実験で達成されていると推察される．

レーザフルエンスおよびパルス数と遺伝子発現特性の関係(Fig. 3-8)の結果を見ると，パルス依存性があることがわかる．LISW による遺伝子導入法では，*in vitro* と *in vivo* によら

ず他の報告でも同様に遺伝子発現レベルのパルス数依存性が見られている[15, 32]. (3.10)式によれば, 瞬間的な圧力の作用は液体中に流速を生じる. 例えば, レーザフルエンスが 0.3 J/cm^2 (ターゲット直下)の圧力特性($I_p = 8.4 \text{ Pa} \cdot \text{s}$, $t_+ = 583 \text{ ns}$)から, (3.12)式と(3.13)式を用いて $\bar{p} = 14.4 \text{ MPa}$, $U_m = 1511 \text{ m/s}$ と計算され, 先程と同様の仮定をすれば $\beta = 1.1$, $\alpha = 0.8$ のときに流速 $w = 5.4 \text{ m/s}$ となる. 細胞の周囲がプラスミド溶液であるとすれば, LISW の力学的作用で生じた相対的変位 d と細胞に起きる面歪み ε によって細胞膜の透過性が上がり, プラスミド溶液は流速 $w = 5.4 \text{ m/s}$ で変動することがわかる. そのため, Figure 3-8 に示した通り 3 パルスよりも 10 パルスの LISW 適用時に遺伝子発現量が増えているのは, 細胞膜の透過性亢進性が上がった状態でプラスミド DNA 溶液が流速 w で移動して細胞内に取り込まれている可能性が考えられる. 1 細胞あたりの導入遺伝子数は, ある一定数でその発現が飽和するものの, レーザフルエンス 0.3 J/cm^2 のときにはパルス数依存的に導入量とそれに伴う発現量が増えていると推察される.

3.6.2 遺伝子発現部位と遺伝子発現細胞

Figure 3-8 の結果から, LISW による脊髄への遺伝子導入では, 神経軸索が伸張する白質において, より高い EGFP の発現レベルが観察された. 一方, Figure 3-11 に示した発現細胞の同定実験からはアストロサイトの細胞骨格となる GFAP の蛍光染色と EGFP の蛍光には重なる部分が観察された. 白質の神経軸索間には繊維性のアストロサイトが存在することを考えると, 白質に存在するこの繊維性アストロサイトに対して EGFP 発現遺伝子が導入されていると考えられる. さらに, Figure 3-11 に示した NeuN 染色の結果では, ニューロンの細胞体に対しては遺伝子導入が達成されていないことがわかった. 超音波とマイクロバブルを用いた中枢神経系への遺伝子導入でも, 遺伝子発現が得られた細胞はニューロンではなくグリアであるといった報告がある[54, 55, 64]. これら物理的手法による脊髄への遺伝子導入実験に見られる細胞選択性について考察する. 近年, 体外衝撃波結石破碎術 (extracorporeal shock wave lithotripsy, ESWL)に用いられる衝撃波が脊髄に照射されたときの副作用を調査した研究結果がいくつか報告されている[65-67]. Karatas らによれば, 健常ラット脊髄に 2000 パルスの衝撃波(臨床で用いられる ESWL と同等との記述はあるが圧力特性は不明)を照射したとき, 灰白質に存在するニューロンの細胞体の形態は正常であっても, 白質に存在する軸索の原形質では, ミトコンドリアの膨張, および一部の軸索に至っては脱落が観察されたと報告している[66]. この実験結果から, ニューロンとグリアでは機械的特性が異なり, それにより遺伝子導入特性に違いが生じている可能性がある. より具体

的には、先述した生体組織への力学的作用(変位と歪み)に対して、細胞とその構成物ごとの脆弱性が異なることから発現細胞の選択性が生じている可能性が考えられる。

以上の発現特性を他の遺伝子導入法と比較する。超音波法による健常ラット脊髄への遺伝子導入では、プラスミド DNA 溶液の注入による髄膜の損傷と超音波による組織損傷が同時に起きるのを防ぐため、プラスミド DNA 溶液の注入は腰椎切除部位に、超音波照射は胸椎切除部分から行っている[54, 55]。遺伝子発現部位を見ると、キャビテーションを発生させるためのマイクロバブルを使用することから、マイクロバブルが分布する脊髄表層の髄膜細胞(グリアの一種)に遺伝子発現細胞が局限してしまっている。LISW を用いた遺伝子導入では、プラスミド DNA を髄内注射しているものの、Figure 3-11 にあるように脊髄実質内に存在するグリアの一つであるアストロサイトでの遺伝子発現が認められる。脊髄損傷の遺伝子治療では、脊髄実質内での遺伝子発現が必要となるため、本方法では超音波マイクロバブル法よりも有効な遺伝子発現特性が得られていると言える。一方、ウイルスベクター法では、安全性の観点からは臨床への応用は難しいが、脊髄への遺伝子導入においてニューロンの細胞体での遺伝子発現が報告されている[68-74]。先述した通り、免疫反応系と血液脳脊髄液関門の防御機能により、プラスミドベクターを用いて脊髄内のニューロンの細胞体で遺伝子発現を得るのは特に難しいとされている[7]。ニューロンの細胞体での遺伝子発現を LISW による遺伝子導入法で実現するための一つの方法としては、化学的手法との併用が考えられる。これまでに報告されている LISW を用いたマウス脳への遺伝子導入では、細胞内への取り込みを促進するためにカチオン性試薬(polyethyleneimine)でプラスミド DNA を修飾することで、脳室壁および海馬歯状回の神経細胞(細胞種は不明)に対して EGFP 発現遺伝子を導入している[16]。また、ポリエチレングリコール修飾の polyethyleneimine を用いて(化学的手法単独)、ラット脊髄を対象にプラスミドベクターによるニューロンおよびグリアへの遺伝子導入が組織の広範囲に得られているとの報告もある[75]。試薬の細胞毒性や生体内での動態制御の困難性といった問題があるものの、化学的手法はウイルスベクターに比べると安全であるため、LISW との併用で非侵襲に脊髄内のニューロンへの遺伝子の取り込みを促進できる可能性が考えられる。

3.6.3 レーザ誘起応力波の安全性

プラスミドベクターを用いる物理的遺伝子導入法は、ウイルスベクターに比べると安全性が高いとされるが[76]、物理エネルギーの負荷による組織損傷が生じる可能性がある。例えば、電気パルスによるラット脳室壁への遺伝子導入においては、高電圧の電気パルス

で神経組織の変性が生じてしまうため、神経再生の治療には不向きであると報告されている[77]. また、健常ラット脊髄への遺伝子導入において電極カテーテルを髄腔内に挿入している報告事例がある[51-53]. 神経変性および損傷は観察されていないが、電極の挿入自体が侵襲的であるので、組織損傷を生じる恐れがある.

脊髄に対する LISW の適用では、レーザフルエンスが 0.3 J/cm^2 のときには 10 パルスの適用でも運動機能の低下は見られなかった(Fig. 3-12). 第 2 章の圧力計測実験の結果で示したように、このとき脊髄表層に作用するピーク圧力は約 44 MPa (440 気圧)である(Fig. 2-12). 極めて高い圧力が脊髄に作用しているにもかかわらず運動機能の低下が生じていないのは、その圧力の作用時間が $1 \mu\text{s}$ 未満と非常に短い時間であるためと考えられる. 仮に、数十 MPa もの圧力がより長時間作用すると、(3.14)式より圧力積分値 I_p の増加で細胞形状を保てないほどに細胞の変位 d が増加してしまう. また、生体組織は一般に引っ張り応力よりも圧縮応力に対して強靱であり[78], LISW は圧縮性で正圧主体であることから、侵襲性が低いと考えられる. さらに、本研究で用いた LISW による遺伝子導入法では、簡便かつ短時間に遺伝子導入が可能であることから、身体的負担も軽いと言える.

3.6.4 遺伝子発現特性と脊髄損傷治療

現在までに考えられている脊髄損傷の遺伝子治療の一つとして、脊髄損傷後に神経軸索の伸長を阻害するグリア瘢痕の形成に寄与する、アストロサイトの細胞骨格タンパク質(中間径フィラメントタンパク質)を抑制し、軸索伸張を間接的に助勢する治療プロセスが考えられる[79-83]. 特に、軸索が伸張する白質に存在するアストロサイトに対して、その細胞骨格タンパク質となる GFAP と vimentin の産生を抑制できれば、効果的な神経再生が期待できる. このようなタンパク質の発現抑制には、近年の研究によれば RNA 干渉(RNA interference, RNAi)が有効とされている[84-87]. RNA 干渉とは、細胞内に導入した siRNA (small interfering RNA)と呼ばれる 2 本鎖 RNA によって配列特異的な遺伝子発現抑制、すなわちタンパク質産生を抑制する現象を指す. LISW による遺伝子導入法を用いて、GFAP と vimentin の発現遺伝子に対する siRNA をアストロサイトに導入することで、グリア瘢痕の形成が抑制され、軸索の伸張を促進できる可能性があると考えられる.

Figure 3-10 に示した遺伝子発現レベルの経日変化から、上記の脊髄損傷の治療プロセスを考察する. 脊髄が損傷すると、TNF- α や IL-6 などの炎症性サイトカインの産生によってミクログリアが活性化する[83, 88-91]. 損傷 24 時間以内でミクログリアは肥大化、2~3 日後には細胞分裂を起し、その数は健常時の 2 倍以上に増加する[89]. TNF- α の誘導によ

リアストロサイトも活性化されるが、数日間はニューロンの保護や血液脳脊髄液関門の修復などに寄与して神経機能再生の一端を担う[90]。脊髄損傷から 24～48 時間後以降、炎症の鎮静化とともに、こうした活性化グリアで産生された中間径フィラメントタンパク質によるグリア瘢痕の形成が開始される[82, 90]。Figure 3-10 で示した通り、本研究で得られた LISW による遺伝子導入のタンパク質発現日数は、遺伝子導入から 5 日までは高いレベルで発現が見られ、中間径フィラメントタンパク質の産生が始まる損傷後数日以内に遺伝子導入を施せばグリア瘢痕の抑制に十分寄与できると考えられる。

最後に遺伝子発現の部位選択性について考察する。脳あるいは脊髄といった中枢神経系の遺伝子治療では、健常組織に影響のない部位選択的な遺伝子発現が強く求められる。それは、健常組織での副作用をできるだけ減らすためである。ウイルスを用いた脊髄への遺伝子導入では、ウイルスが有する生物活性の高さから脊髄内で広範に遺伝子発現してしまうので、発現部位の標的化が難しい[68-74]。さらに、免疫反応が強く生じる恐れもあるので[92, 93]、脊髄損傷の遺伝子治療には不向きである。第 2 章の伝搬特性計測に基づき、本章では Figure 3-9 に示した通り、面波源(直径 3 mm)で発生させた LISW を太さ 3～4 mm のラット脊髄実質に直接適用することで指向性よく圧力を作用させ、髄節レベルでの遺伝子発現位置の制御が可能であることを実証した。これはラット脊髄において、遺伝子治療を望む髄節だけにタンパク質発現を実現できることを示す結果である。ヒトの場合、脊髄は太さ 10～15 mm であるため、脊髄表面から LISW を適用した場合、部位選択的な遺伝子発現を得るためには、標的部位に対して一定の指向性を有しながら伝搬することが重要となる。第 2 章で示した LISW の伝搬特性計測からは、面波源で発生した LISW の圧力減衰は相対的に小さくなり、より深部への圧力伝搬が可能であると考えられるだろう。

3.7 まとめ

本章では、第 2 章で計測した伝搬特性に基づき、これまで報告事例のない LISW を用いた健常ラット脊髄への標的部位選択的な遺伝子導入を実証した。脊髄への遺伝子導入を達成するための LISW の圧力特性を明らかにし、機能学的な損傷の評価から、安全でかつ細胞膜の透過性亢進作用を備えた、低フルエンスで多パルスの LISW(フルエンス 0.3 J/cm^2 , 10 パルス)による遺伝子導入が適していることを示した。さらに胸髄節ごとの遺伝子発現レベルの評価により、部位選択的な脊髄への遺伝子導入が可能であることを示し、その高いレベルでの発現が 5 日間まで維持されることを示した。発現細胞の同定実験からは、ニューロンの細胞体への遺伝子導入は達成されていないものの、アストロサイトでの遺伝子発

現が得られていることがわかった。これらの発現特性から、グリア瘢痕形成の一端を担う中間径フィラメントタンパク質の発現を抑制する遺伝子をアストロサイトに導入することによって、脊髄損傷の遺伝子治療につながる可能性があることを考察した。

参考文献 第3章

- [1] J. Silver, J. H. Miller, "Regeneration beyond the glial scar," *Nat. Rev. Neurosci.* **5**(2), pp. 146-156 (2004).
- [2] G. Yiu, Z. He, "Glial inhibition of CNS axon regeneration," *Nat. Rev. Neurosci.* **7**(8), pp. 617-627 (2006).
- [3] H. Okano, S. Kaneko, S. Okada, A. Iwanami, M. Nakamura, Y. Toyama, "Regeneration-based therapies for spinal cord injuries," *Neurochem. Int.* **51**(2-4), pp. 68-73 (2007).
- [4] F. Xie, B. Zheng, "White matter inhibitors in CNS axon regeneration failure," *Exp. Neurol.* **209**(2), pp. 302-312 (2008).
- [5] G. Onose, A. Anghelescu, D. F. Muresanu, L. Padure, M. A. Haras, C. O. Chendreau, L. V. Onose, A. Mirea, A. V. Ciurea, W. S. El Masri, K. R. von Wild, "A review of published reports on neuroprotection in spinal cord injury," *Spinal Cord* **47**(10), pp. 716-726 (2009).
- [6] F. Sun, Z. He, "Neuronal intrinsic barriers for axon regeneration in the adult CNS," *Curr. Opin. Neurobiol.* **20**(4), pp. 510-518 (2010).
- [7] M. Berry, L. Barrett, L. Seymour, A. Baird, A. Logan, "Gene therapy for central nervous system repair," *Curr. Opin. Mol. Ther.* **3**(4), pp. 338-349 (2001).
- [8] B. Blits, M. B. Bunge, "Direct gene therapy for repair of the spinal cord," *J. Neurotrauma* **23**(3-4), pp. 508-520 (2006).
- [9] X. Bo, D. Wu, J. Yeh, Y. Zhang, "Gene therapy approaches for neuroprotection and axonal regeneration after spinal cord and spinal root injury," *Curr. Gene Ther.* **11**(2), pp. 101-115 (2011).
- [10] S. Franz, N. Weidner, A. Blesch, "Gene therapy approaches to enhancing plasticity and regeneration after spinal cord injury," *Exp. Neurol.* **235**(1), pp. 62-69 (2012).
- [11] E. J. Bradbury, L. D. Moon, R. J. Popat, V. R. King, G. S. Bennett, P. N. Patel, J. W. Fawcett, S. B. McMahon, "Chondroitinase ABC promotes functional recovery after spinal cord injury," *Nature* **416**(6881), pp. 636-640 (2002).
- [12] S. Okada, M. Nakamura, Y. Mikami, T. Shimazaki, M. Mihara, Y. Ohsugi, Y. Iwamoto, K. Yoshizaki, T. Kishimoto, Y. Toyama, H. Okano, "Blockade of interleukin-6 receptor suppresses reactive astrogliosis and ameliorates functional recovery in experimental spinal cord injury," *J. Neurosci. Res.* **76**(2), pp. 265-276 (2004).
- [13] S. Kaneko, A. Iwanami, M. Nakamura, A. Kishino, K. Kikuchi, S. Shibata, H. J. Okano, T.

- Ikegami, A. Moriya, O. Konishi, C. Nakayama, K. Kumagai, T. Kimura, Y. Sato, Y. Goshima, M. Taniguchi, M. Ito, Z. He, Y. Toyama, H. Okano, "A selective Sema3A inhibitor enhances regenerative responses and functional recovery of the injured spinal cord," *Nat. Med.* **12**(12), pp. 1380-1389 (2006).
- [14] M. Desclaux, M. Teigell, L. Amar, R. Vogel, M. Giménez y Ribotta, A. Privat, J. Mallet, "A novel and efficient gene transfer strategy reduces glial reactivity and improves neuronal survival and axonal growth *in vitro*," *PLoS One* **4**(7), pp. e6227/1-15 (2009).
- [15] M. Ogura, S. Sato, K. Nakanishi, M. Uenoyama, T. Kiyozumi, D. Saito, T. Ikeda, H. Ashida, M. Obara, "*In vivo* targeted gene transfer in skin by the use of laser-induced stress waves," *Lasers Surg. Med.* **34**(3), pp. 242-248 (2004).
- [16] Y. Satoh, Y. Kanda, M. Terakawa, M. Obara, K. Mizuno, Y. Watanabe, S. Endo, S. Sato, K. Takishima, "Targeted DNA transfection into the mouse central nervous system using laser-induced stress waves," *J. Biomed. Opt.* **10**(6), pp. 060501/1-3 (2005).
- [17] M. Terakawa, S. Sato, D. Saitoh, H. Tsuda, H. Ashida, H. Okano, M. Obara, "Enhanced angiogenesis in grafted skins by laser-induced stress wave-assisted gene transfer of hepatocyte growth factor," *J. Biomed. Opt.* **12**(3), pp. 034031/1-8 (2007).
- [18] S. Takano, S. Sato, M. Terakawa, H. Asida, H. Okano, M. Obara, "Enhanced transfection efficiency in laser-induced stress wave-assisted gene transfer at low laser fluence by increasing pressure impulse," *Appl. Phys. Express* **1**, pp. 038001/1-3 (2008).
- [19] K. Aizawa, S. Sato, M. Terakawa, D. Saitoh, H. Tsuda, H. Ashida, M. Obara, "Accelerated adhesion of grafted skin by laser-induced stress wave-based gene transfer of hepatocyte growth factor," *J. Biomed. Opt.* **14**(6), pp. 064043/1-9 (2009).
- [20] A. Kurita, T. Matsunobu, Y. Satoh, T. Ando, S. Sato, M. Obara, A. Shiotani, "Targeted gene transfer into rat facial muscles by nanosecond pulsed laser-induced stress waves," *J. Biomed. Opt.* **16**(9), pp. 098002/1-5 (2011).
- [21] Fred Delcomyn, ニューロンの生物学 (南江堂, 2000).
- [22] 森寿, 真鍋俊也, 渡辺雅彦, 岡野栄之, 宮川剛, 脳神経科学イラストレイテッド (羊土社, 2006).
- [23] A. Siegel, H. N. Saprú, *Essential Neuroscience* (Lippincott Williams & Wilkins, 2006).
- [24] 独立行政法人 情報処理推進機構 「教育用画像素材集サイト」
<http://www2.edu.ipa.go.jp/gz/>
- [25] 内山安男, 組織細胞生物学 (南江堂, 2006).

- [26] M. W. Miller, D. L. Miller, A. A. Brayman, "A review of *in vitro* bioeffects of inertial ultrasonic cavitation from a mechanistic perspective," *Ultrasound Med. Biol.* **22**(9), pp. 1131-1154 (1996).
- [27] S. Lee, A. G. Doukas, "Laser-generated stress waves and their effects on the cell membrane," *IEEE J. Selected Topics Quant. Electron.* **5**(4), pp. 997-1003 (1999).
- [28] J. C. Williams Jr, J. F. Woodward, M. A. Stonehill, A. P. Evan, J. A. McAteer, "Cell damage by lithotripter shock waves at high pressure to preclude cavitation," *Ultrasound Med. Biol.* **25**(9), pp. 1445-1449 (1999).
- [29] T. Kodama, M. R. Hamblin, A. G. Doukas, "Cytoplasmic molecular delivery with shock waves: importance of impulse," *Biophys. J.* **79**(4), pp. 1821-1832 (2000).
- [30] Sondén, B. Svensson, N. Roman, H. Ostmark, B. Brismar, J. Palmblad, B. T. Kjellström, "Laser-induced shock wave endothelial cell injury," *Lasers Surg. Med.* **26**(4), pp. 364-375 (2000).
- [31] T. Kodama, A. G. Doukas, M. R. Hamblin, "Shock wave-mediated molecular delivery into cells," *Biochim. Biophys. Acta.* **1542**(1-3), pp. 186-194 (2002).
- [32] M. Terakawa, S. Sato, H. Ashida, K. Aizawa, M. Uenoyama, Y. Masaki, M. Obara, "*In vitro* gene transfer to mammalian cells by the use of laser-induced stress waves: effects of stress wave parameters, ambient temperature, and cell type," *J. Biomed. Opt.* **11**(1), pp. 014026/1-7 (2006).
- [33] E. VanBavel, "Effects of shear stress on endothelial cells: possible relevance for ultrasound applications," *Prog. Biophys. Mol. Biol.* **93**(1-3), pp. 374-383 (2007).
- [34] J. Sundaram, B. R. Mellein, S. Mitragotri, "An experimental and theoretical analysis of ultrasound-induced permeabilization of cell membranes," *Biophys. J.* **84**(5), pp. 3087-3101 (2003).
- [35] K. Koshiyama, T. Kodama, T. Yano, S. Fujikawa, "Structural change in lipid bilayers and water penetration induced by shock waves: molecular dynamics simulations," *Biophys. J.* **91**(6), pp. 2198-2205 (2006).
- [36] D. Dimitris, L. Javier, P. Sandip, "Effects of shock waves on biological membranes: a molecular dynamics study," *J. Comput. Theor. Nanosci.* **6**(7), pp. 1437-1442 (2009).
- [37] K. Koshiyama, T. Yano, T. Kodama, "Self-organization of a stable pore structure in a phospholipid bilayer," *Phys. Rev. Lett.* **105**(1), pp. 018105/1-4 (2010).
- [38] K. Lai, B. Wang, Y. Zhang, Y. Zhang, "High pressure effect on phase transition behavior of

- lipid bilayers,” *Phys. Chem. Chem. Phys.* **14**(16), pp. 5744-5752 (2012).
- [39] M. S. Howe, *Hydrodynamics and Sound* (Cambridge University Press, Cambridge, 2006)
- [40] R. H. Cole, *Underwater Explosions* (Princeton University Press, Princeton, 1948)
- [41] M. Lokhandwalla, B. Sturtevant, “Mechanical haemolysis in shock wave lithotripsy (SWL): I. Analysis of cell deformation due to SWL flow-fields,” *Phys. Med. Biol.* **46**(2), pp. 413-437 (2001).
- [42] M. Lokhandwalla, J. A. McAteer, J. C. Williams Jr, B. Sturtevant, “Mechanical haemolysis in shock wave lithotripsy (SWL): II. *In vitro* cell lysis due to shear,” *Phys. Med. Biol.* **46**(4), pp. 1245-1264 (2001).
- [43] 斎藤泉, 菅野純男, 遺伝子導入&発現解析実験法 (羊土社, 1997).
- [44] 松村正實, 山本雅, 新遺伝子工学ハンドブック改訂第4版 (羊土社, 2003).
- [45] P. M. Buttrick, A. Kass, R. N. Kitsis, M. L. Kaplan, L. A. Leinwand, “Behavior of gene directly injected into the rat heart *in vivo*,” *Circ. Res.* **70**(1), pp. 193-198 (1992).
- [46] J. A. Nickoloff, R. J. Reynolds, “Electroporation-mediated gene transfer efficiency is reduced by linear plasmid carrier DNAs,” *Anal. Biochem.* **205**(2), pp. 237-243 (1992).
- [47] Clontech Laboratories Inc. ウェブサイト; <http://www.clontech.com>
- [48] R. Y. Tsien, “The green fluorescent protein,” *Annu. Rev. Biochem.* **67**, pp. 509-544 (1998).
- [49] O. Shimomura, F. H. Johnson, Y. Saiga, “Extraction, purification and properties of aequorin, a bioluminescent protein from the luminous hydromedusan, *Aequorea*,” *J. Cell. Comp. Physiol.* **59**, pp. 223-239 (1962).
- [50] Y. Kaneda, T. Nakajima, T. Nishikawa, S. Yamamoto, H. Ikegami, N. Suzuki, H. Nakamura, R. Morishita, H. Kotani, “Hemagglutinating virus of Japan (HVJ) envelope vector as a versatile gene delivery system,” *Mol. Ther.* **6**(2), pp. 219-226 (2002).
- [51] C. R. Lin, M. H. Tai, J. T. Cheng, A. K. Chou, J. J. Wang, P. H. Tan, M. Marsala, L. C. Yang, “Electroporation for direct spinal gene transfer in rats,” *Neurosci. Lett.* **317**(1), pp. 1-4 (2002).
- [52] C. R. Lin, L. C. Yang, T. H. Lee, C. T. Lee, H. T. Huang, W. Z. Sun, J. T. Cheng, “Electroporation-mediated pain-killer gene therapy for mononeuropathic rats,” *Gene Ther.* **9**(18), pp. 1247-1253 (2002).
- [53] C. M. Wu, M. W. Lin, J. T. Cheng, Y. M. Wang, Y. W. Huang, W. Z. Sun, C. R. Lin, “Regulated, electroporation-mediated delivery of pro-opiomelanocortin gene suppresses chronic constriction injury-induced neuropathic pain in rats,” *Gene Ther.* **11**(11), pp. 933-940 (2004).
- [54] M. Shimamura, N. Sato, Y. Taniyama, H. Kurinami, H. Tanaka, T. Takami, T. Ogihara, M.

- Tohyama, Y. Kaneda, R. Morishita, "Gene transfer into adult rat spinal cord using naked plasmid DNA and ultrasound microbubbles," *J. Gene Med.* **7**(11), pp. 1468-1474 (2005).
- [55] M. Takahashi, K. Kido, A. Aoi, H. Furukawa, M. Ono, T. Kodama, "Spinal gene transfer using ultrasound and microbubbles," *J. Control. Release* **117**(2), pp. 267-272 (2007).
- [56] 仲嶋一範, 北村義浩, 必ず上手くいく遺伝子導入と発現解析プロトコール (羊土社, 2004).
- [57] D. M. Basso, M. S. Beattie, J. C. Bresnahan, "A sensitive and reliable locomotor rating scale for open field testing in rats," *J. Neurotrauma* **12**(1), pp. 1-21 (1995).
- [58] D. M. Basso, M. S. Beattie, J. C. Bresnahan, "Graded histological and locomotor outcomes after spinal cord contusion using the NYU weight-drop device versus transection," *Exp. Neurol.* **139**(2), pp. 244-256 (1996).
- [59] R. S. Schwartz, S. Musto, M. E. Fabry, R. L. Nagel, "Two distinct pathways mediate the formation of intermediate density cells and hyperdense cells from normal density sickle red blood cells," *Blood* **92**(12), pp. 4844-4855 (1998).
- [60] F. J. Schuier, K. A. Hossmann, "Experimental brain infarcts in cats. II. Ischemic brain edema," *Stroke* **11**(6), pp. 593-601 (1980).
- [61] C. Nicholson, "Ion-selective microelectrodes and diffusion measurements as tools to explore the brain cell microenvironment," *J. Neurosci. Methods.* **48**(3), pp. 199-213 (1993).
- [62] L. L. Latour, K. Svoboda, P. P. Mitra, C. H. Sotak, "Time-dependent diffusion of water in a biological model system," *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **91**(4), pp. 1229-1233 (1994).
- [63] A. Szafer, J. Zhong, J. C. Gore, "Theoretical model for water diffusion in tissues," *Magn. Reson. Med.* **33**(5), pp. 697-712 (1995).
- [64] M. Shimamura, N. Sato, Y. Taniyama, S. Yamamoto, M. Endoh, H. Kurinami, M. Aoki, T. Ogihara, Y. Kaneda, R. Morishita, "Development of efficient plasmid DNA transfer into adult rat central nervous system using microbubble-enhanced ultrasound," *Gene Ther.* **11**(20), pp. 1532-1539 (2004).
- [65] T. C. Lee, H. Y. Huang, Y. L. Yang, K. S. Hung, C. H. Cheng, N. K. Chang, Y. H. Chung, M. S. Hu, C. J. Wang, "Vulnerability of the spinal cord to injury from extracorporeal shock waves in rabbits," *J. Clin. Neurosci.* **14**(9), pp. 873-878 (2007).
- [66] A. Karatas, M. Dosoglu, T. Zeyrek, A. Kayikci, A. Erol, B. Can, "The effect of extracorporeal shock wave lithotripsy on the rat spinal cord," *Spinal Cord* **46**(9), pp. 627-632 (2008).
- [67] T. C. Lee, H. Y. Huang, Y. L. Yang, K. S. Hung, C. H. Cheng, W. C. Lin, C. J. Wang,

- “Application of extracorporeal shock wave treatment to enhance spinal fusion: a rabbit experiment,” *Surg. Neurol.* **70**(2), pp. 129-134 (2008).
- [68]M. I. Romero, G. M. Smith, “Adenoviral gene transfer into the normal and injured spinal cord: enhanced transgene stability by combined administration of temperature-sensitive virus and transient immune blockade,” *Gene Ther.* **5**(12), pp. 1612-1621 (1998).
- [69]A. J. Mannes, R. M. Caudle, B. C. O’Connell, M. J. Iadarola, “Adenoviral gene transfer to spinal-cord neurons: intrathecal vs. intraparenchymal administration,” *Brain Res.* **793**(1-2), pp. 1-6 (1998).
- [70]N. M. Boulis, V. Bhatia, T. I. Brindle, H. T. Holman, D. J. Krauss, M. Blaivas, J. T. Hoff, “Adenoviral nerve growth factor and beta-galactosidase transfer to spinal cord: a behavioral and histological analysis,” *J. Neurosurg.* **90**(1 Suppl), pp. 99-108 (1999).
- [71]A. B. Huber, M. U. Ehrengruber, M. E. Schwab, C. Brösamle, “Adenoviral gene transfer to the injured spinal cord of the adult rat,” *Eur. J. Neurosci.* **12**(9), pp. 3437-3442 (2000).
- [72]Q. Teng, D. K. Tanase, J. K. Liu, M. E. Garrity-Moses, K. B. Baker, N. M. Boulis, “Adenoviral clostridial light chain gene-based synaptic inhibition through neuronal synaptobrevin elimination,” *Gene Ther.* **12**(2), pp. 108-119 (2005).
- [73]H. Nakajima, K. Uchida, S. Kobayashi, Y. Kokubo, T. Yayama, R. Sato, H. Baba, “Targeted retrograde gene delivery into the injured cervical spinal cord using recombinant adenovirus vector,” *Neurosci. Lett.* **385**(1), pp. 30-35 (2005).
- [74]A. A. Abdellatif, J. L. Pelt, R. L. Benton, R. M. Howard, P. Tsoulfas, P. Ping, X. M. Xu, S. R. Whittemore, “Gene delivery to the spinal cord: comparison between lentiviral, adenoviral, and retroviral vector delivery systems,” *J. Neurosci. Res.* **84**(3), pp. 553-567 (2006).
- [75]L. Shi, G. P. Tang, S. J. Gao, Y. X. Ma, B. H. Liu, Y. Li, J. M. Zeng, Y. K. Ng, K. W. Leong, S. Wang, “Repeated intrathecal administration of plasmid DNA complexed with polyethylene glycol-grafted polyethylenimine led to prolonged transgene expression in the spinal cord,” *Gene Ther.* **10**(14), pp. 1179-1188 (2003).
- [76]S. D. Li, L. Huang, “Non-viral is superior to viral gene delivery,” *J. Control. Release* **123**(3), pp. 181-183 (2007).
- [77]T. Kondoh, Y. Motooka, A. K. Bhattacharjee, T. Kokunai, N. Saito, N. Tamaki, “*In vivo* gene transfer into the periventricular region by electroporation,” *Neurol. Med. Chir. (Tokyo)* **40**(12), pp. 618-622 (2000).
- [78]F. A. Duck, *Physical Properties of Tissue: A Comprehensive Reference Book* (Academic Press,

1990).

- [79] V. Menet, M. Prieto, A. Privat, M. Giménez y Ribotta, "Axonal plasticity and functional recovery after spinal cord injury in mice deficient in both glial fibrillary acidic protein and vimentin genes," *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **100**(15), pp. 8999-9004 (2003).
- [80] M. Rostworowski, V. Balasingam, S. Chabot, T. Owens, V. W. Yong, "Astrogliosis in the neonatal and adult murine brain post-trauma: elevation of inflammatory cytokines and the lack of requirement for endogenous interferon-gamma," *J. Neurosci.* **17**(10), pp. 3664-3674 (1997).
- [81] M. Pekny, M. Nilsson, "Astrocyte activation and reactive gliosis," *Glia* **50**(4), pp. 427-434 (2005).
- [82] F. Renault-Mihara, S. Okada, S. Shibata, M. Nakamura, Y. Toyama, H. Okano, "Spinal cord injury: emerging beneficial role of reactive astrocytes' migration," *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **40**(9), pp. 1649-1653 (2008).
- [83] S. Ohtori, K. Takahashi, H. Moriya, R. R. Myers, "TNF-alpha and TNF-alpha receptor type 1 upregulation in glia and neurons after peripheral nerve injury: studies in murine DRG and spinal cord," *Spine (Phila Pa 1976)* **29**(10), pp. 1082-1088 (2004).
- [84] A. Fire, S. Q. Xu, M. K. Montgomery, S. A. Kostas, S. E. Driver, C. C. Mello, "Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*," *Nature* **391**(6669), pp. 806-811 (1998).
- [85] S. M. Elbashir, J. Harborth, W. Lendeckel, A. Yalcin, K. Weber, T. Tuschl, "Duplexes of 21-nucleotide RNAs mediate RNA interference in cultured mammalian cells," *Nature* **411**(6836), pp. 494-498 (2001).
- [86] G. J. Hannon, "RNA interference," *Nature* **418**(6894), pp. 244-251 (2002).
- [87] G. Sui, C. Soohoo, B. Affar el, F. Gay, Y. Shi, W. C. Forrester, Y. Shi, "A DNA vector-based RNAi technology to suppress gene expression in mammalian cells," *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **99**(8), pp. 5515-5520 (2002).
- [88] T. Morino, T. Ogata, H. Horiuchi, J. Takeba, H. Okumura, T. Miyazaki, H. Yamamoto, "Delayed neuronal damage related to microglia proliferation after mild spinal cord compression injury," *Neurosci. Res.* **46**(3), pp. 309-318 (2003).
- [89] M. Tsuda, K. Inoue, M. W. Salter, "Neuropathic pain and spinal microglia: a big problem from molecules in "small" glia," *Trends Neurosci.* **28**(2), pp. 101-107 (2005).
- [90] M. V. Sofroniew, "Reactive astrocytes in neural repair and protection," *Neuroscientist* **11**(5), pp. 400-407 (2005).

- [91] S. Okada, M. Nakamura, H. Katoh, T. Miyao, T. Shimazaki, K. Ishii, J. Yamane, A. Yoshimura, Y. Iwamoto, Y. Toyama, H. Okano, "Conditional ablation of Stat3 or Socs3 discloses a dual role for reactive astrocytes after spinal cord injury," *Nat. Med.* **12**(7), pp. 829-834 (2006).
- [92] M. J. Wood, H. M. Charlton, K. J. Wood, K. Kajiwara, A. P. Byrnes, "Immune responses to adenovirus vectors in the nervous system," *Trends Neurosci.* **19**(11), pp. 497-501 (1996).
- [93] P. R. Lowenstein, M. G. Castro, "Inflammation and adaptive immune responses to adenoviral vectors injected into the brain: peculiarities, mechanisms, and consequences," *Gene Ther.* **10**(11), pp. 946-954 (2003).

Table 3-1 The 21-point Basso, Beattie, and Bresnahan locomotor rating scale and operational definitions of categories and attributes [57, 58].

-
- 0 No observable hindlimb (HL) movement
 - 1 Slight movement of one or two joints, usually the hip and/or knee
 - 2 Extensive movement of one joint or extensive movement of one joint *and* slight movement of one other joint
 - 3 Extensive movement of two joints
 - 4 Slight movement of all three joints of the HL
 - 5 Slight movement of two joints *and* extensive movement of the third
 - 6 Extensive movement of two joints *and* slight movement of the third
 - 7 Extensive movement of all three joints of the HL
 - 8 Sweeping with no weight support or plantar placement of the paw with no weight support
 - 9 Plantar placement of the paw with weight support in stance only (i.e., when stationary) or occasional, frequent, or consistent weight-supported dorsal stepping and no plantar stepping
 - 10 Occasional weight-supported plantar steps; no forelimb (FL)-HL coordination
 - 11 Frequent to consistent weight-supported plantar steps *and* no FL-HL coordination
 - 12 Frequent to consistent weight-supported plantar steps *and* occasional FL-HL coordination
 - 13 Frequent to consistent weight-supported plantar steps *and* frequent FL-HL coordination
 - 14 Consistent weight-supported plantar steps, consistent FL-HL coordination, *and* predominant paw position during locomotion is rotated (internally or externally) when it makes *initial contact* with the surface as well as just before it is *lifted off* at the end of stance; or frequent plantar stepping, consistent FL-HL coordination, and occasional dorsal stepping
 - 15 Consistent plantar stepping and consistent FL-HL coordination *and* no toe clearance or occasional toe clearance during forward limb advancement; predominant paw position is parallel to the body at initial contact
 - 16 Consistent plantar stepping and consistent FL-HL coordination during gait *and* toe clearance occurs frequently during forward limb advancement; predominant paw position is parallel at initial contact and rotated at lift off
 - 17 Consistent plantar stepping and consistent FL-HL coordination during gait *and* toe clearance occurs frequently during forward limb advancement; predominant paw position is parallel at initial contact *and* lift off
 - 18 Consistent plantar stepping and consistent FL-HL coordination during gait *and* toe clearance occurs consistently during forward limb advancement; predominant paw position is parallel at initial contact and rotated at lift off

(continued on the following page)

Table 3-1 (continued)

- 19 Consistent plantar stepping and consistent FL-HL coordination during gait, toe clearance occurs consistently during forward limb advancement, predominant paw position is parallel at initial contact *and* lift off, and tail is down part or all of the time
- 20 Consistent plantar stepping and consistent coordinated gait, consistent toe clearance, predominant paw position is parallel at initial contact and lift off, *and* trunk instability; tail consistently up
- 21 Consistent plantar stepping and coordinated gait, consistent toe clearance, predominant paw position is parallel throughout stance, and consistent trunk stability; tail consistently up

Definitions

Slight: partial joint movement through less than half the range of joint motion

Extensive: movement through more than half of the range of joint motion

Sweeping: rhythmic movement of HL in which all three joints are extended, and then fully flex and extend again; animal is usually sidelying and plantar surface of paw may or may not contact the ground; no weight support across the HL is evident

No weight support: no contraction of the extensor muscles of the HL during plantar placement of the paw; or no elevation of the hindquarter

Weight support: contraction of the extensor muscles of the HL during plantar placement of the paw, or elevation of the hindquarter

Plantar stepping: the paw is in *plantar* contact with weight support and then the HL is advanced forward and *plantar* contact with weight support is reestablished

Dorsal stepping: weight is supported through the dorsal surface of the paw at some point in the step cycle

FL-HL coordination: for every FL step a HL step is taken and the HLs alternate

Occasional: less than or equal to half; $\leq 50\%$

Frequent: more than half but not always; 51-94%

Consistent: nearly always or always; 95-100%

Trunk instability: lateral weight shifts that cause waddling from side to side or a partial collapse of the trunk

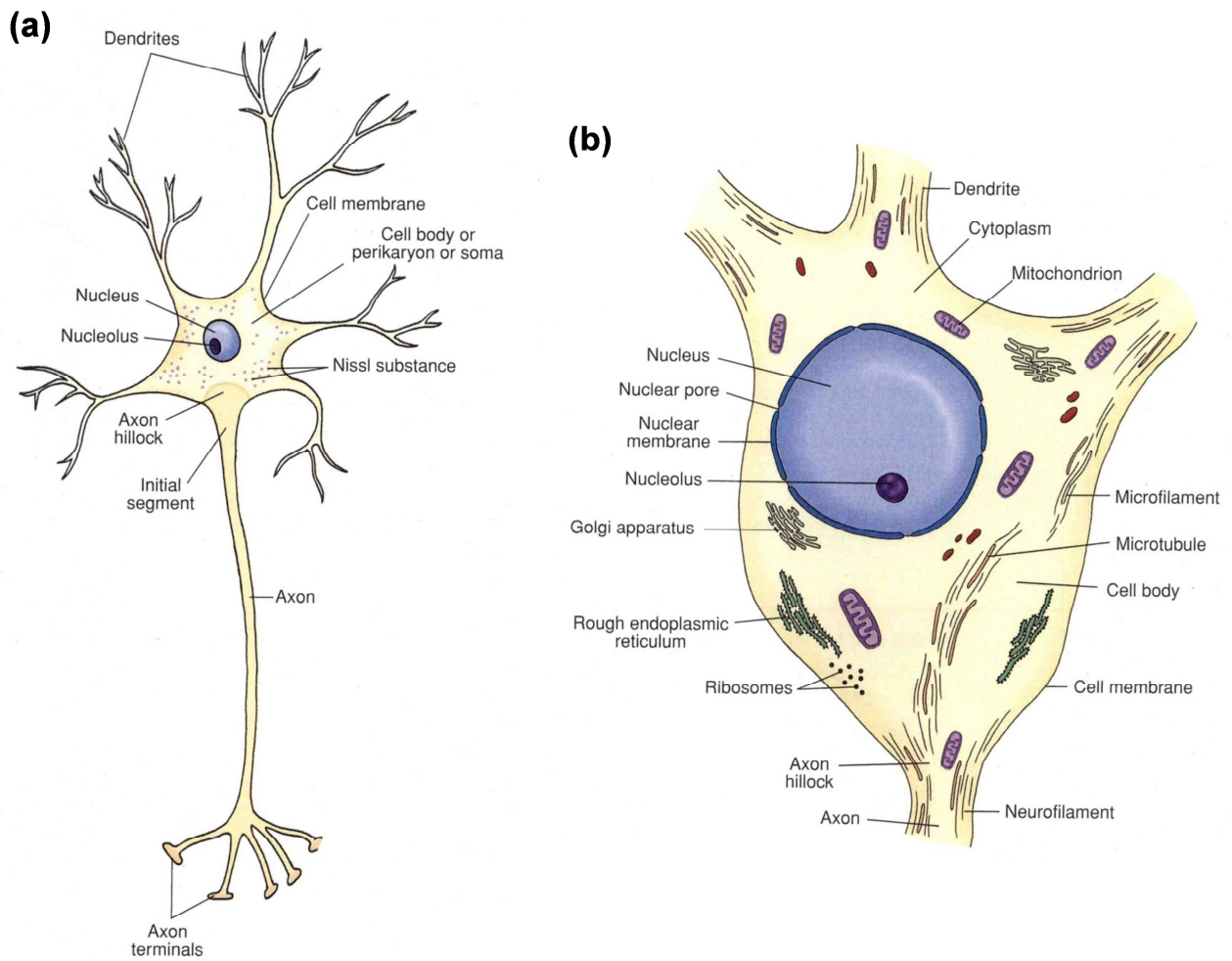


Fig. 3-1 Schematic representation of a neuron. (a) The axon conducts information from the cell body to different targets. (b) Components of the neuron, including the cell membrane, nucleus, nuclear membrane, nucleolus, and the organelles are present in the cytoplasm of the neuron [23].

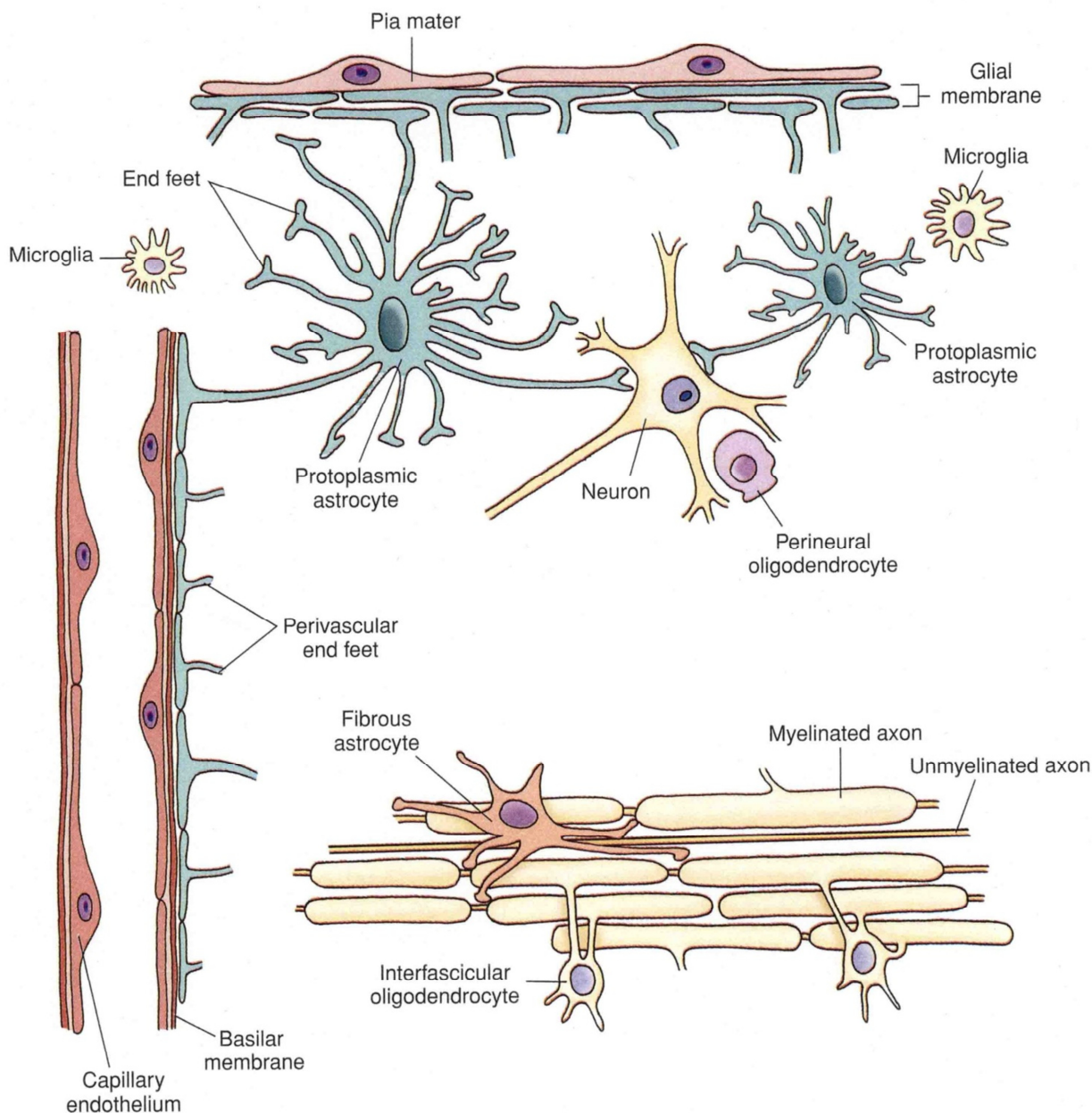


Fig. 3-2 Different types of glial cells. The astrocytes provide support for the neurons, a barrier against the spread of the transmitters from synapses, and insulation to prevent electrical activity of one neuron from affecting the activity of a neighboring neuron [23].

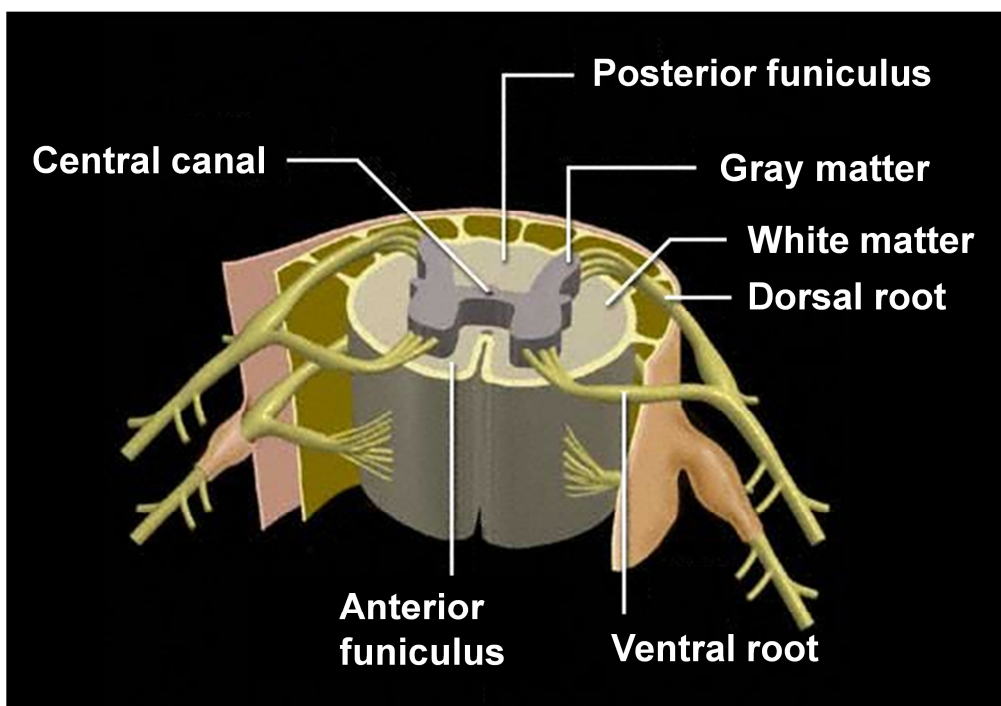


Fig. 3-3 Structure of the spinal cord [24].

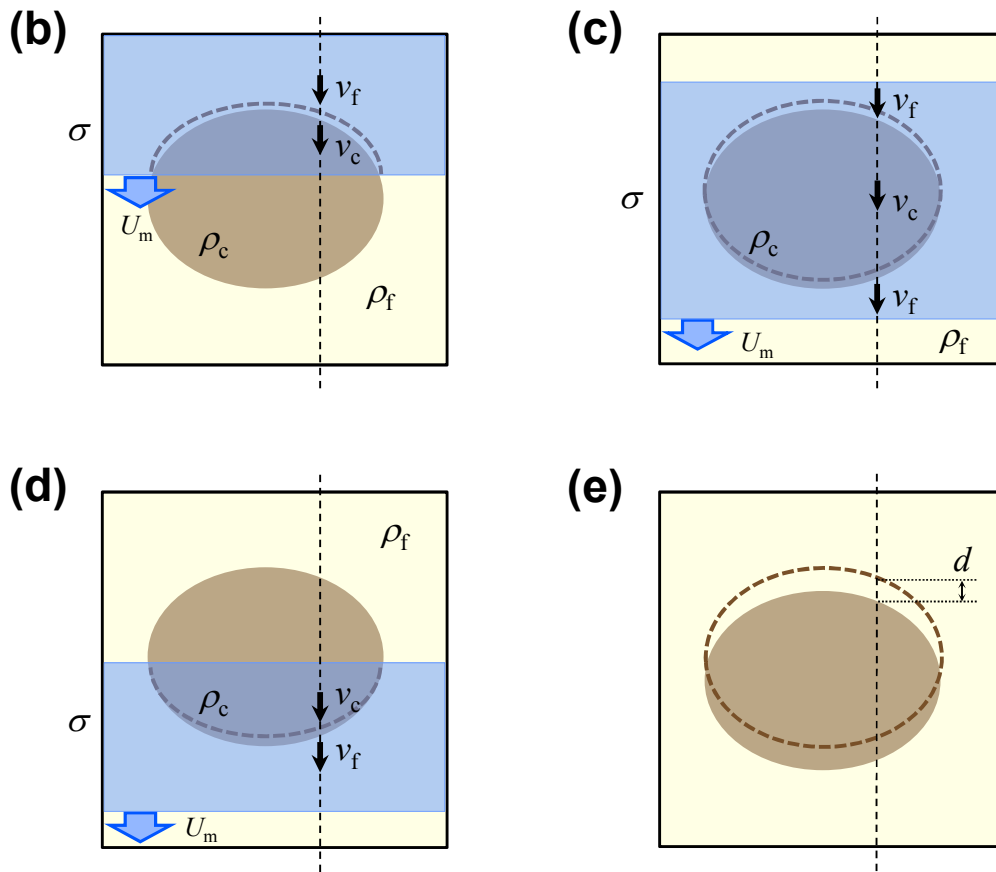
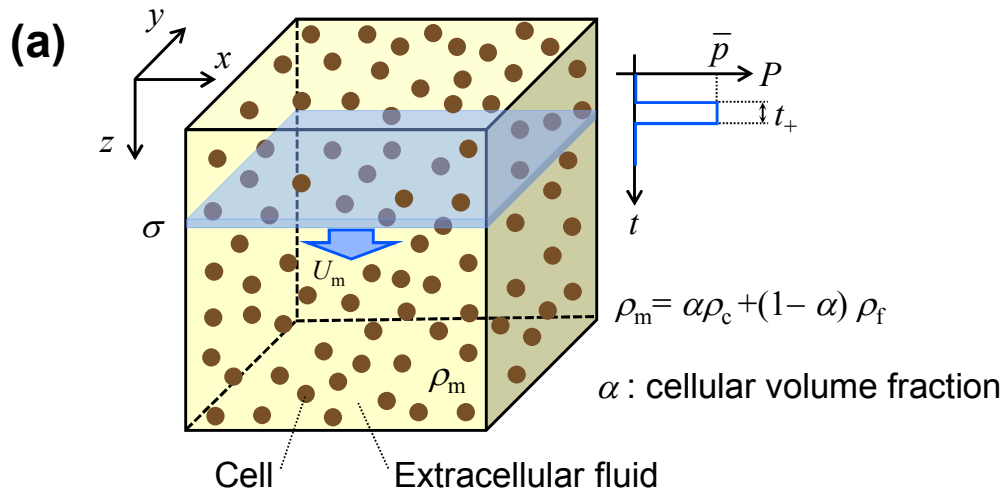


Fig. 3-4 Models of a relative displacement induced by impulsive pressure, σ .
 (a) Schematic of biological tissue which the pressure waves propagate through.
 (b)-(e) Generation processes of the relative displacement.

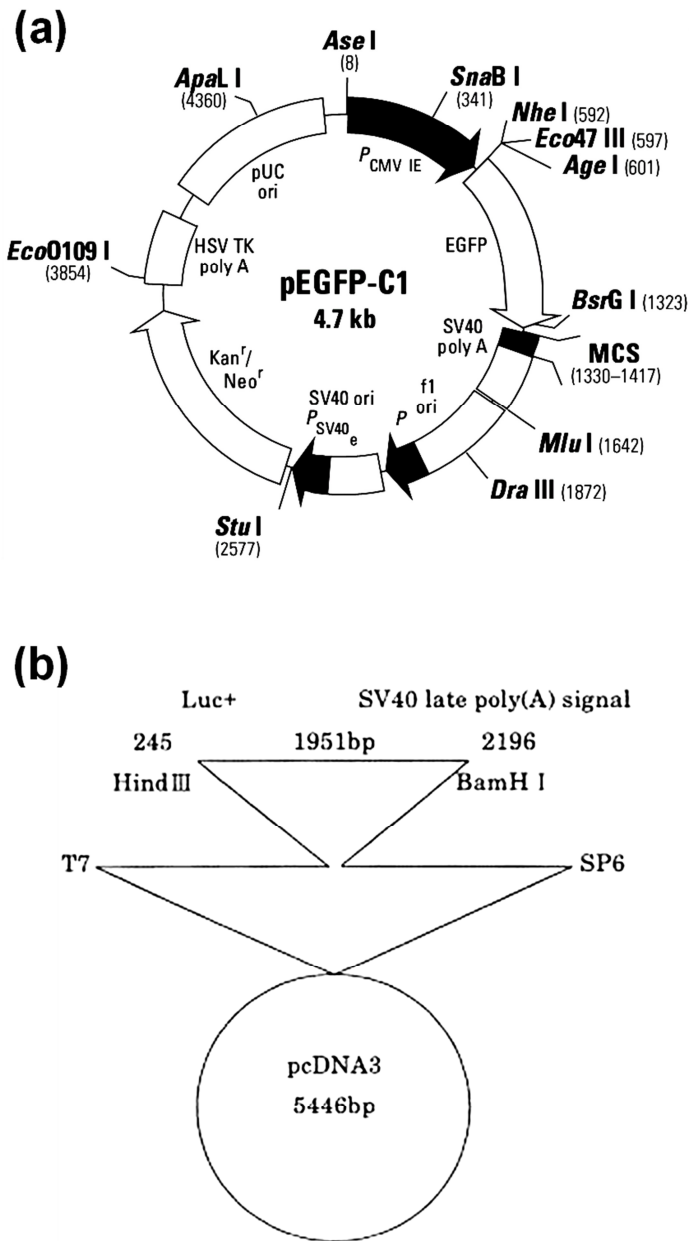


Fig. 3-5 Schematic representation of plasmid DNA. (a) Plasmid DNA encoding EGFP and (b) plasmid DNA encoding firefly luciferase.

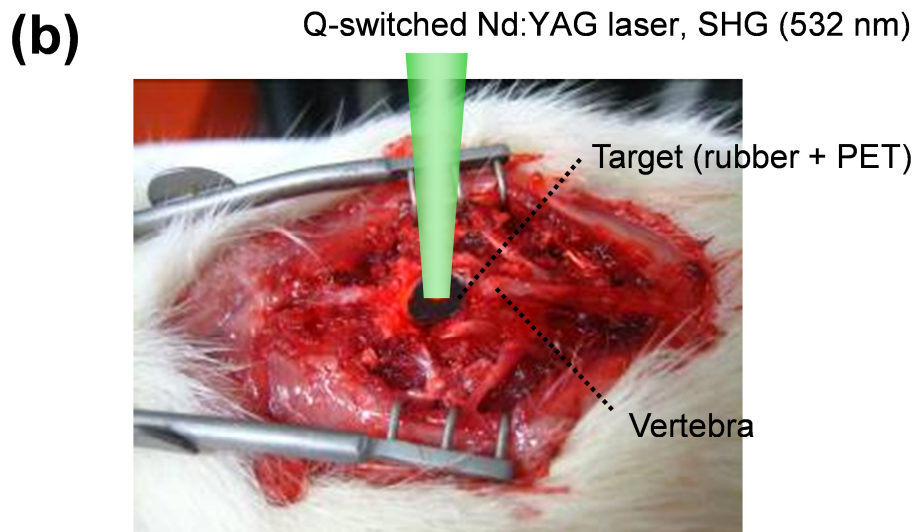
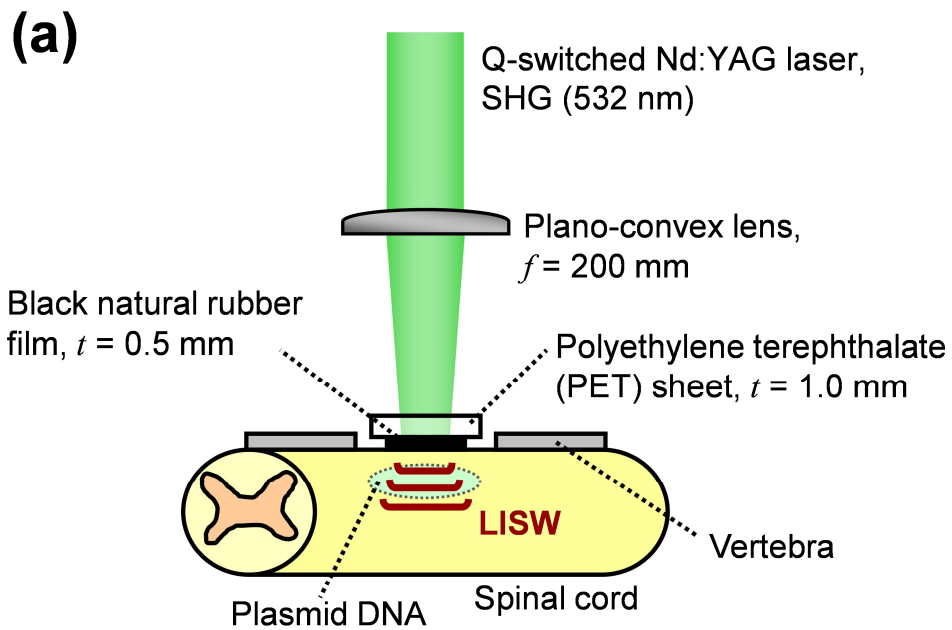


Fig. 3-6 Configuration for gene transfer into the rat spinal cord by use of LISW.

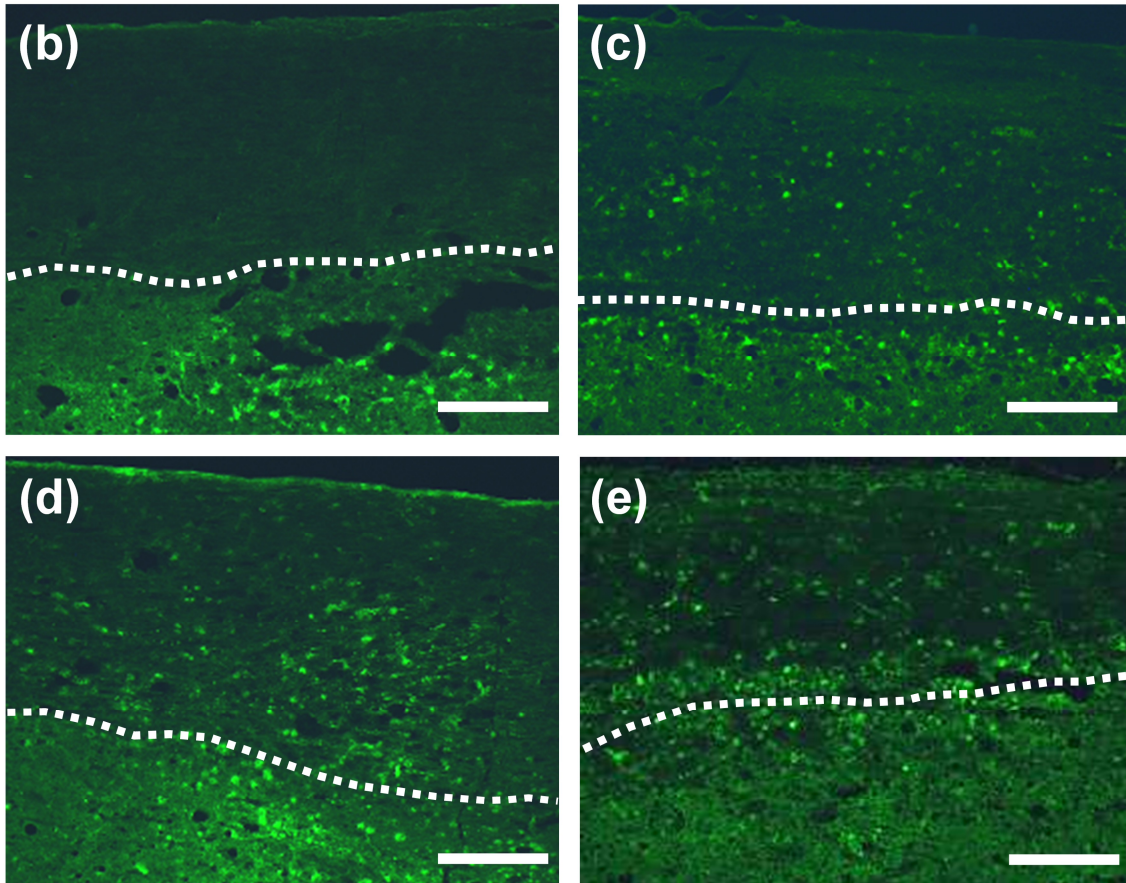
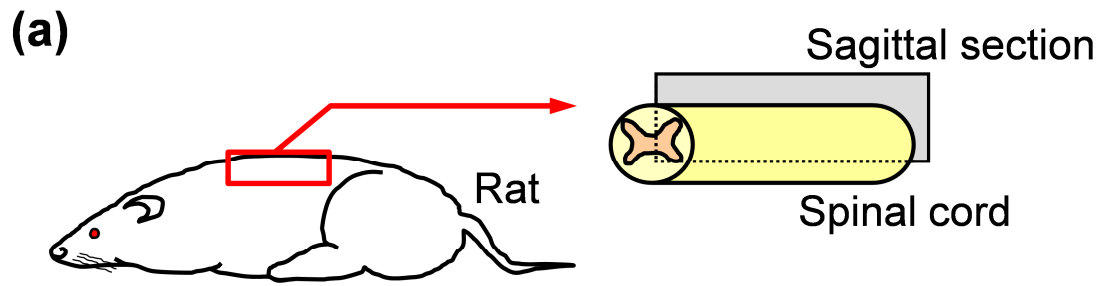


Fig. 3-7 Expression of EGFP gene in the rat spinal cord at 48 h after LISW-based gene transfer under the four different treatment conditions: (b) plasmid DNA injection alone; (c), (d), (e) LISW application after plasmid injection. (c) $0.3 \text{ J/cm}^2 \times 3$ pulses, (d) $0.3 \text{ J/cm}^2 \times 10$ pulses, and (e) $0.9 \text{ J/cm}^2 \times 1$ pulse. Broken lines indicate the boundary between the white (upper) and the gray (lower) matters. Scale bars indicate $200 \mu\text{m}$.

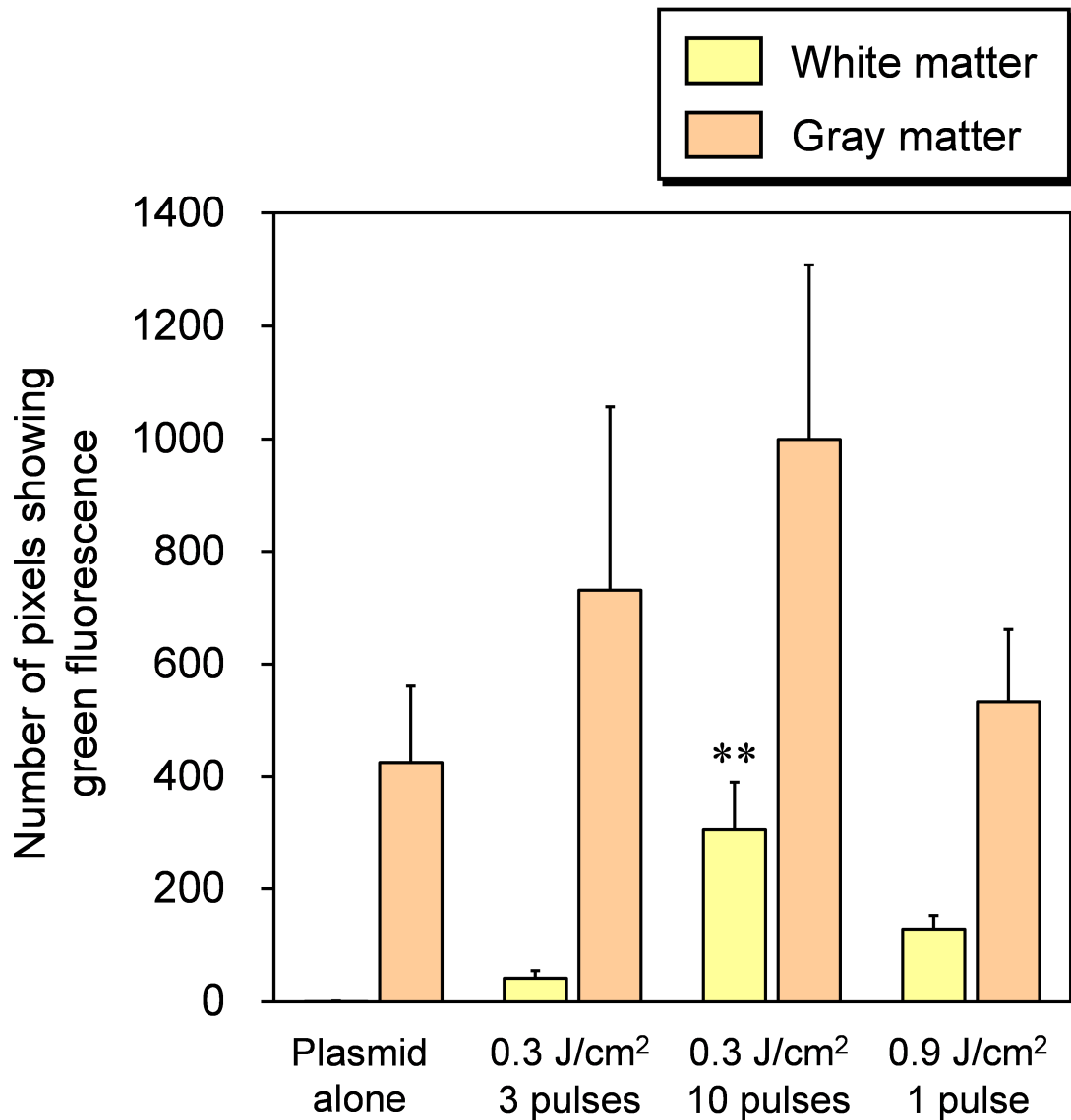


Fig. 3-8 Number of pixels showing green fluorescence in the EGFP expression images of rat spinal cords under the four different treatment conditions: (a) plasmid DNA injection alone; (b), (c), (d) LISW application after plasmid injection. (b) 0.3 J/cm² × 3 pulses, (c) 0.3 J/cm² × 10 pulses, and (d) 0.9 J/cm² × 1 pulse. Values are expressed as means + S.E.M (n = 4). ** depicts *P* < 0.01 versus plasmid injection alone.

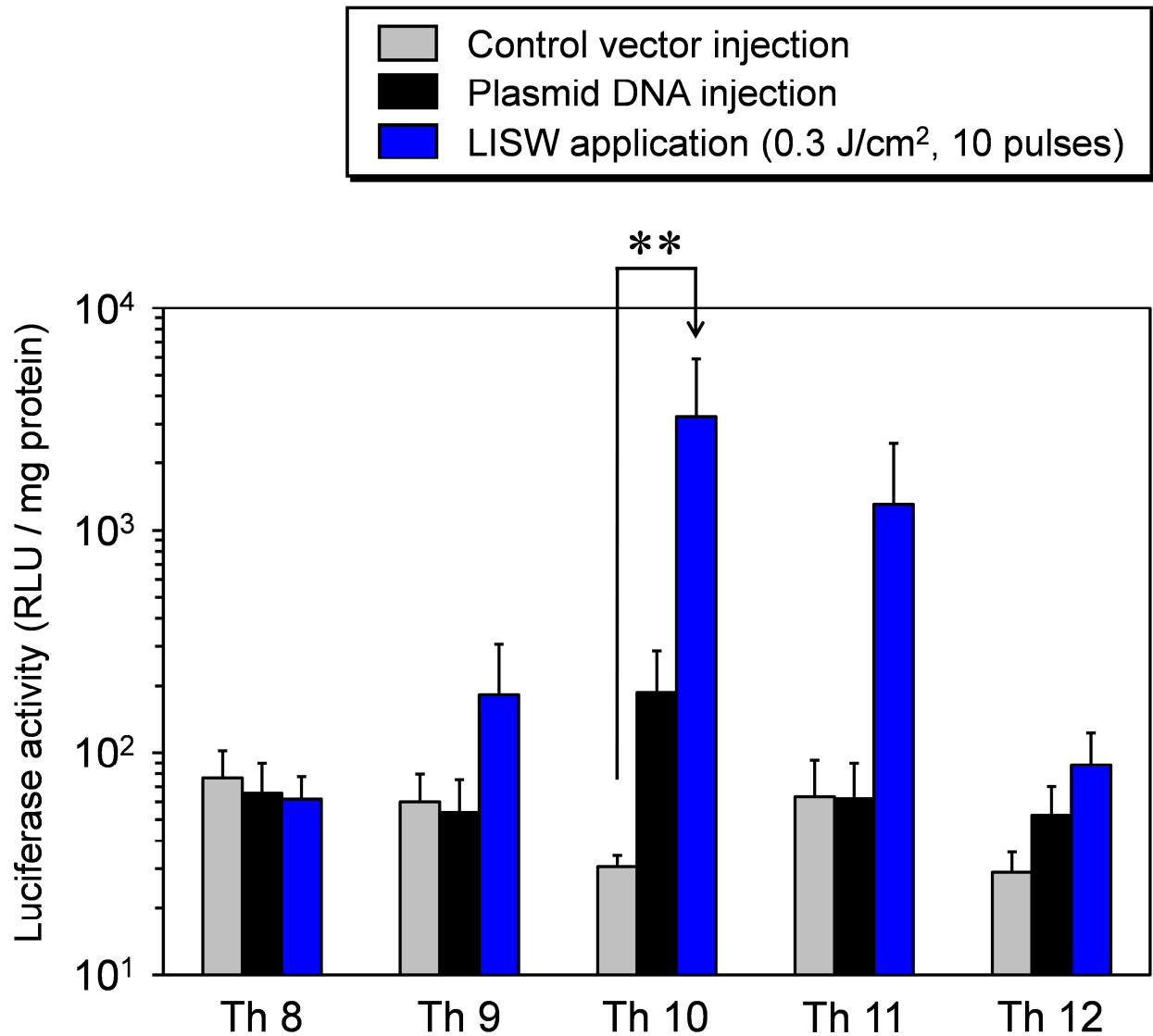


Fig. 3-9 Levels of luciferase gene expressions for each thoracic (Th) spinal segment under the three different treatment conditions: control vector injection alone, plasmid DNA injection alone and LISW application after plasmid DNA injection. Control vector or plasmid DNA was injected into the spinal cord segment under the tenth thoracic vertebra, to which LISWs were applied. Results are expressed as means + S.E.M (n = 5). ** depicts $P < 0.01$.

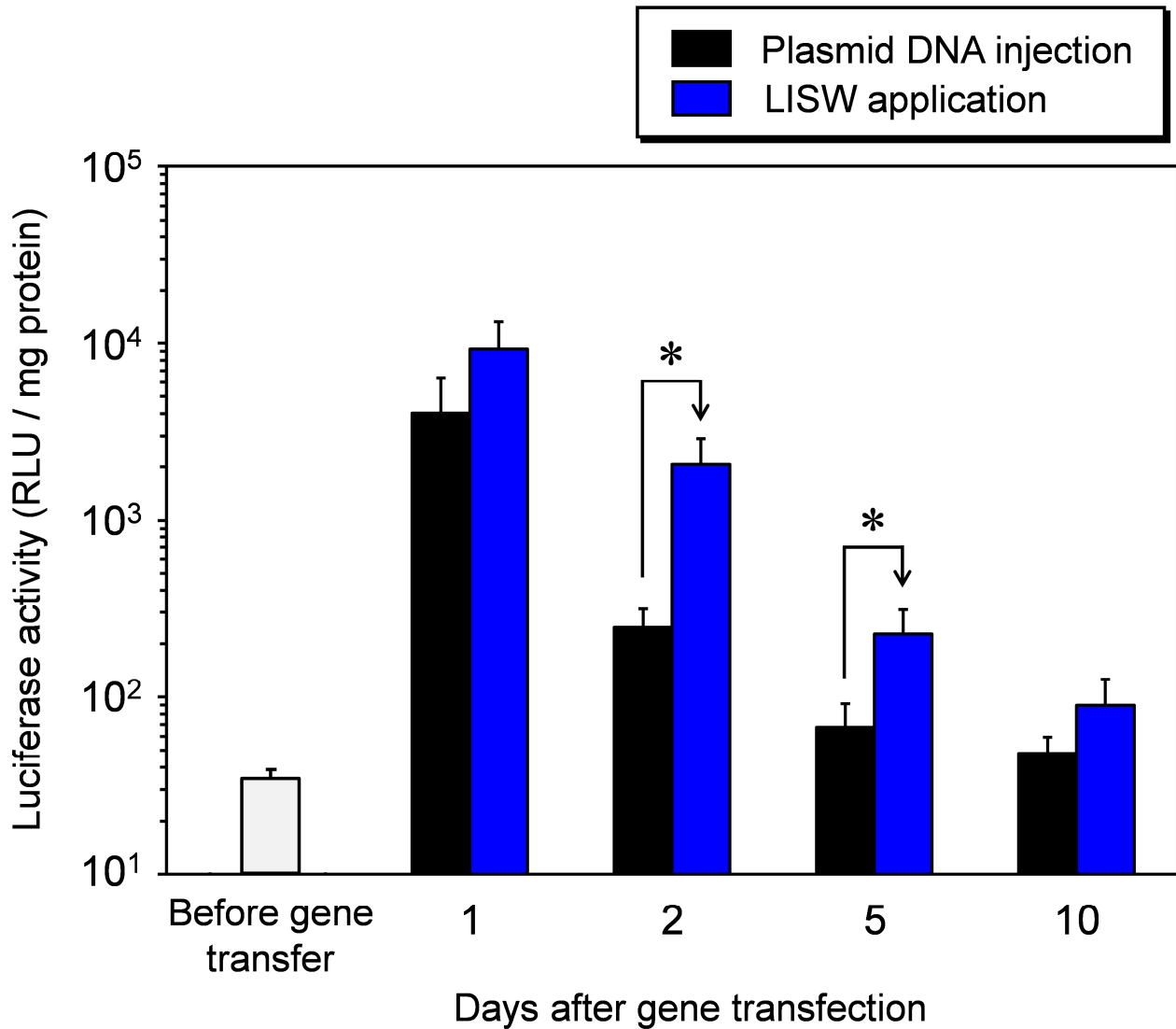


Fig. 3-10 Time courses of luciferase gene expressions integrated for the 9th, 10th, and 11th thoracic spinal segments for the plasmid injection alone group and the LISW application group. The luciferase activity before treatment is also shown for comparison. Values are expressed as means +S.E.M (n = 5 - 10). * depicts $P < 0.05$.

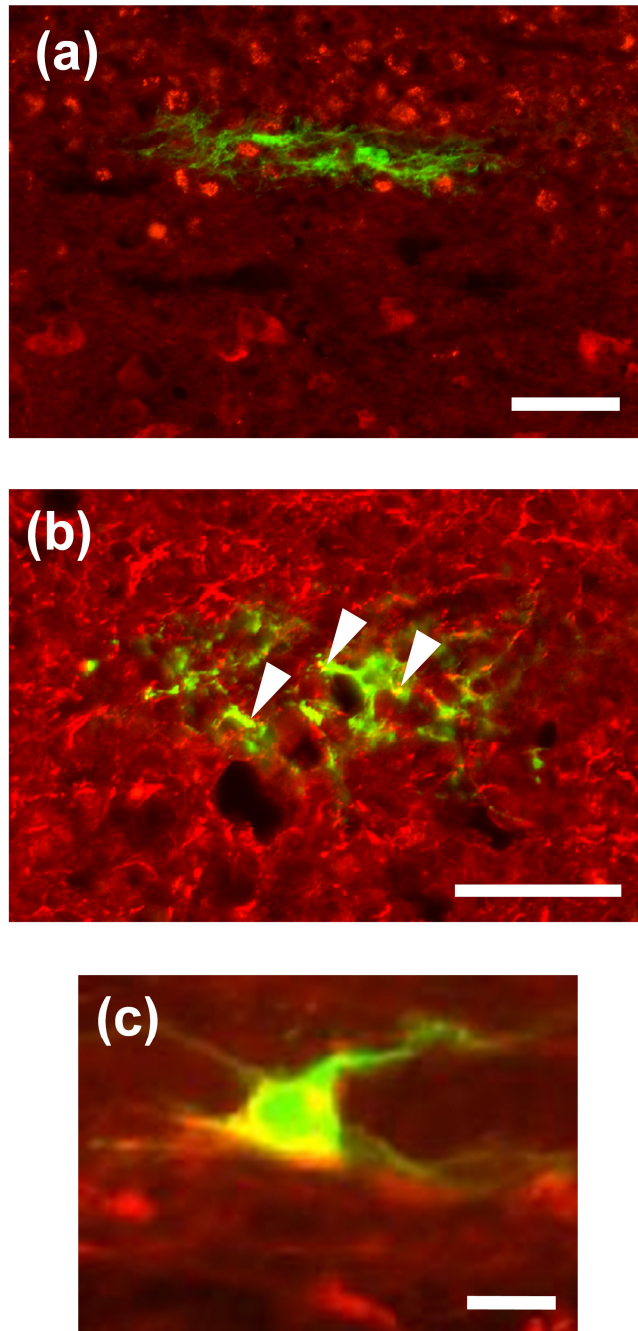


Fig. 3-11 Immunochemical identification of cell types in the rat spinal cord, to which EGFP gene was delivered by LISWs. (a) NeuN staining (red) showing cell bodies of neurons, (b) and (c) GFAP staining (red) showing astrocytes. Green fluorescent shows expression of EGFP gene showed green fluorescent, and therefore transfected cells look yellow (arrow heads).

The scale bars indicate (a) and (b) 50 μm , and (c) 10 μm .

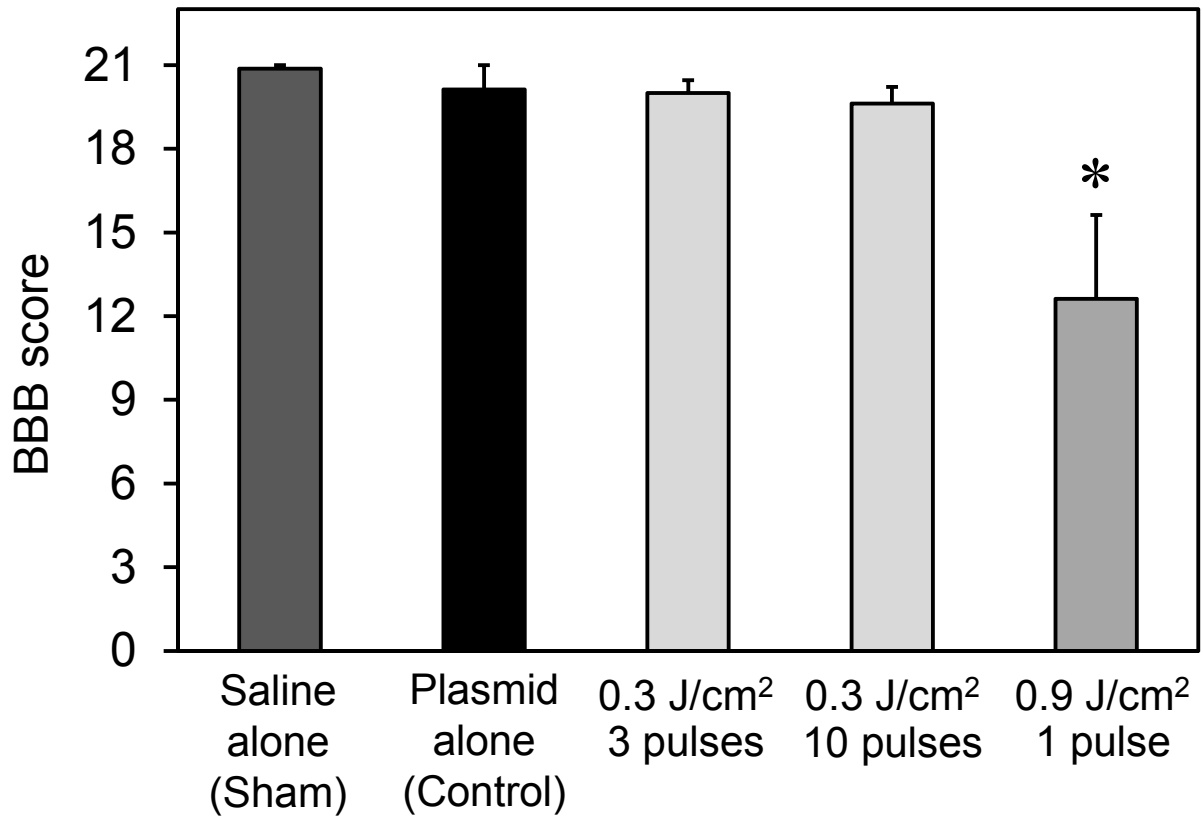
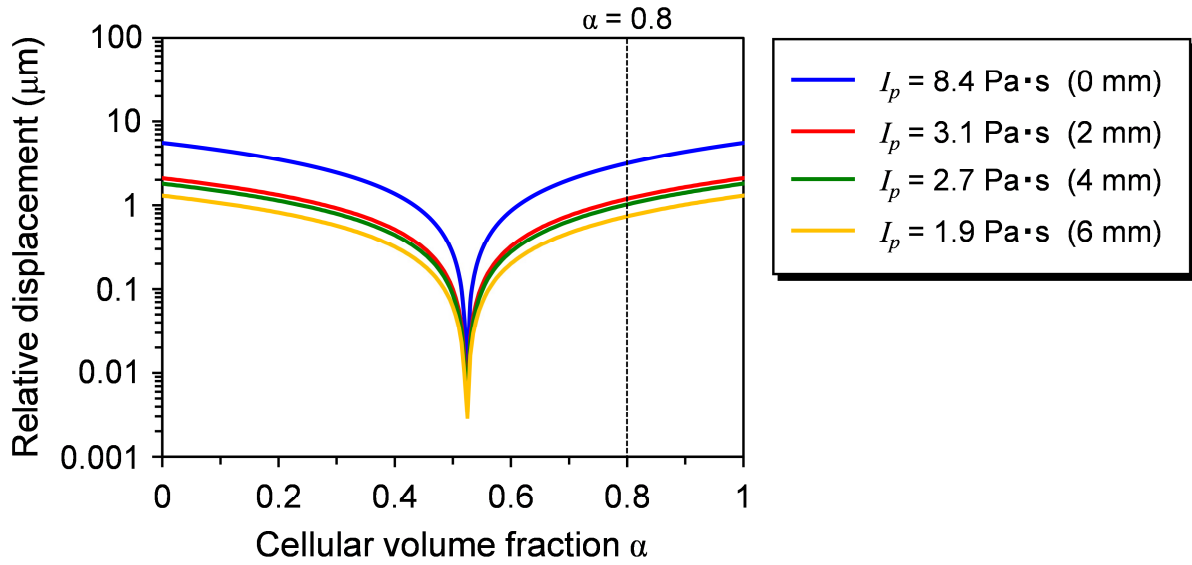


Fig. 3-12 Results of functional evaluation based on BBB scoring at 24 h after EGFP gene transfer under the same four treatment conditions as those shown in Figs. 3-7 and 3-8. Values are expressed as means + S.E.M (n = 4 - 6). * depicts $P < 0.05$ versus plasmid injection alone.

(a)



(b)

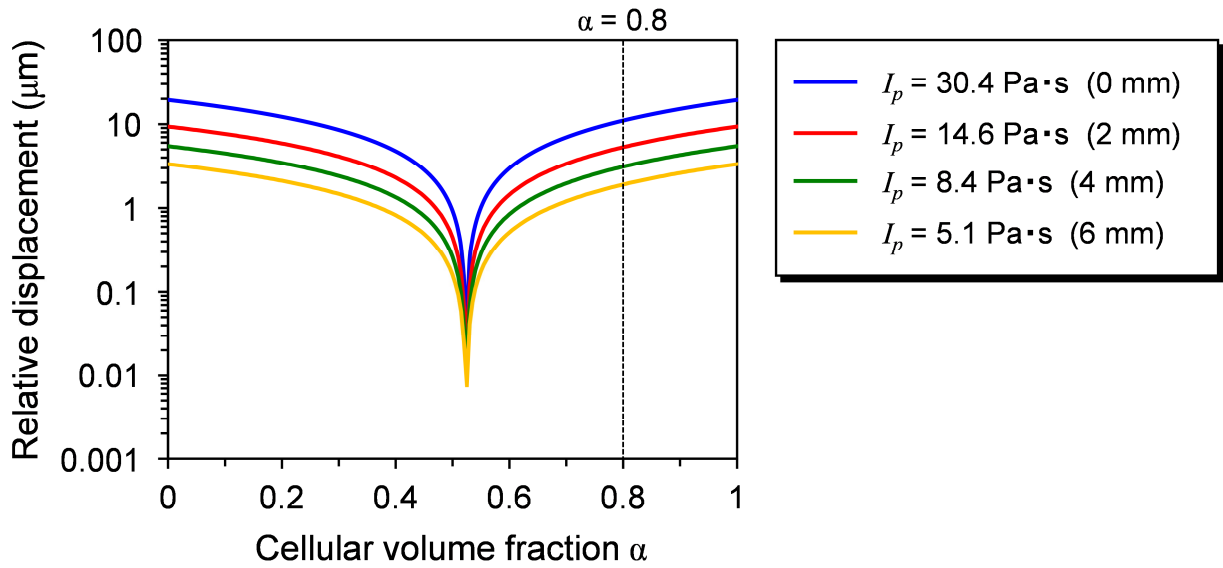


Fig. 3-13 Relationship between the cellular volume fraction and relative displacement for different impulse values, I_p , given in Table 2-1. (a) Laser fluence 0.3 J/cm^2 , (b) 0.9 J/cm^2 .

第4章

レーザー誘起応力波を用いた siRNA 導入による 脊髄損傷モデルラットの運動機能改善

4.1 はじめに

外傷性の脊髄損傷の病態は、脊髄が直接的外力で損傷を受けることに加え、その数日以内には炎症性細胞の浸潤や虚血などにより周囲の細胞までもが壊死とアポトーシスに陥る。脊髄損傷後のグリアの反応(活性化)として、損傷部位に対するアストロサイト、ミクログリア、オリゴデンドロサイト前駆細胞、および髄膜細胞の遊走が報告されている[1-3]。損傷によって活性化されたアストロサイト(reactive astrocyte)には、細胞自体の肥大化、コンドロイチン硫酸プロテオグリカン、エフリンなどの細胞外基質の放出が見られる[4-7]。これらの反応は損傷部位を隔離し、炎症反応と損傷の影響を受けていない周辺細胞の壊死を最小限に抑えようとする神経保護効果がある[8, 9]。しかし、その神経細胞保護のために過剰に集積した活性化アストロサイトは、損傷後数週間のうちに、組織内にグリア瘢痕と呼ばれる神経軸索伸長の生理的、および物理的な障壁を形成する。そして、損傷の中心部は組織が空洞化した状態となってしまう。損傷に反応して内在性の神経幹細胞が増殖することも明らかになっている。これらはニューロンへは全く分化せず、全てアストロサイトへ分化してグリア瘢痕の形成に寄与していることが報告されている[10]。中枢神経系の自己再生能は、他の生体組織に比べて極めて低いため、損傷から数週間経っても再構築されなかった神経路を回復させるのは非常に困難である。こうして、再生されなかった中枢神経路が担う運動機能と感覚機能は慢性的に障害を負うこととなる[11-14]。

以上の背景から、神経軸索の伸長を阻害するグリア瘢痕の形成を抑制できれば、神経路の構築ならびに運動機能と感覚機能の改善が期待できる。実際、グリア瘢痕形成に寄与する活性化アストロサイトの細胞骨格タンパク質(GFAP と vimentin)が欠損したノックアウトマウスでは、脊髄切断後の神経再生が野生型(遺伝子をノックアウトしていない)マウスに比べて有意に促進されたという報告が 2003 年に初めてなされている[15]。ごく最近では、2011 年に Toyooka らが脊髄損傷モデルラットを対象に GFAP と vimentin の発現を抑制する siRNA 溶液を切開した硬膜下に滴下し、脊髄損傷に起因する膀胱機能の異常を有意に抑制できることを報告している[16]。彼らは、側索に走行する軸索の再生が膀胱機能の改善に寄与したとしているものの、一方で、より広範に神経路の再構築が必要となる運動機能の改善は得られなかった。その主な原因は、過剰発現タンパク質の発現を抑制するための siRNA の導入が、空間的に限定的であったことが考えられる。運動機能を司る神経路は脊髄の腹側(前索側)を走行しており、運動機能の改善効果を得るためには、siRNA 導入によるグリア瘢痕抑制を生体深部で達成する必要がある。本研究では、この技術的課題の解決に、LISW による遺伝子導入法が有用であると考えた。

第2章と第3章で述べた LISW を用いたラット健常脊髄へのレポーター遺伝子導入に関して得られた知見は、以下のようにまとめられる。

- (1) 安全かつ高効率な遺伝子導入が達成された LISW のレーザパラメータは、フルエンス 0.3 J/cm^2 、スポット径 3 mm 、 10 パルスであった。このとき脊髄表面に作用するピーク圧力は 44 MPa であった。
- (2) 脊髄ファントムを用いた LISW の伝搬特性計測実験から、一定の指向性をもってラット脊髄中(太さ $3 \sim 4 \text{ mm}$)を LISW が伝搬していると考えられた。
- (3) 遺伝子発現部位の標的性に関して、髄節レベル(長さ $\sim 5 \text{ mm}$)での遺伝子導入部位の制御が可能であった。
- (4) 発現細胞種の調査では、白質にある線維性アストロサイトに遺伝子発現が得られていることがわかった。
- (5) 遺伝子発現日数について、遺伝子導入から 5 日まで顕著に発現が見られた。

これらの特性のうち、脊髄損傷受傷後に活性化したアストロサイトに対して、中間径フィラメントタンパク質の発現を抑制する siRNA を導入し、運動機能改善を達成するには、(2)と(4)の特性は特に重要である。その理由は、運動機能の神経路が走行する前索側でグリア瘢痕の低減が期待できるからである。一方、第3章では健常ラットの脊髄を対象としたのに対し、損傷脊髄への LISW 適用では、(3)の標的性は重要であるが、(1)で示すレーザパラメータが必ずしも安全とは限らない。さらに、第3章では細胞の核内への取り込みが必要となるプラスミド DNA の導入と遺伝子の発現を達成したのに対し、siRNA 分子は細胞質への取り込み(導入)だけでタンパク質産生の抑制効果がある。これは、細胞質内のメッセンジャーRNA に対して、導入した siRNA が配列特異的に結合して発現抑制効果を生じるためである。(5)に関しては、siRNA 導入の場合、損傷直後からグリア瘢痕が形成され始めるまでの持続的なタンパク質発現抑制効果が必要となるため、導入後の siRNA 分子の動態を確認しなければならない。

本章では、以上の検討項目を勘案しながら、脊髄損傷モデルラットを対象として GFAP と vimentin の発現を抑制する siRNA 溶液を髄腔内に注入後、硬膜上から LISW を直接適用し、運動機能改善効果が得られるか検討した実験について述べる。

4.2 実験方法

4.2.1 ラット脊髄損傷モデル

実験動物の疾患モデルは、その治療法の研究開発にとって欠かすことのできないものである。ラットの脊髄損傷モデルは、1985年に Wrathall らのグループによって考案された [17-19]。ラットの脊髄上に硬膜(dura mater)を残した状態で 10 g のおもりを自由落下させるもので、臨床で見られる外傷性の脊髄損傷によく似た生理学的、かつ組織学的病態を引き起こすことができる。また、脊髄損傷後に観察される機能学的障害に関しても再現性が高く、現在まで広く用いられている脊髄損傷モデルであるので、本実験においても採用した。

Sprague-Dawley ラット(日本エスエルシー、メス、体重 180 ~ 270 g)を用い、ペントバルビタール 50 mg/kg の腹腔内投与による麻酔下に、第 10 胸椎を椎弓切除し、胸髄硬膜を露出させた。Figure 4-1 に示すように、外傷性脊髄損傷の作製装置として一般的に用いられている New York University (NYU) impactor を使用し、第 9 胸椎および第 11 胸椎の棘突起を固定後、10 g のおもりを高さ 25 mm より露出胸随へ垂直落下させ、脊髄実質に挫傷性外傷を作製した。これらの手技の最中および麻酔が覚醒するまで、保温パッドを用いて体温を 37°C に管理した。脊髄損傷後に生じる膀胱機能障害(神経因性膀胱)を防ぐため、損傷作製翌日より自律性排尿が可能となるまで腹部の用手圧迫排尿を行った。

4.2.2 レーザ誘起応力波

LISW の発生方法は、第 2 章と第 3 章で述べた実験と同様である。光吸収体としての黒色天然ゴム板(厚さ 0.5 mm)にレーザ生成プラズマの閉じ込め用の透明ポリエチレンテレフタレート(厚さ 1.0 mm)を接着したターゲットに対して、透明材料側から Q スイッチ・Nd:YAG レーザ(Brilliant b, Quantel)の第 2 高調波(波長 532 nm, パルス幅 6 ns)を平凸レンズ($f=200$ mm)で集光して照射した。このときの照射スポット径は 3 mm で一定とした。

4.2.3 損傷脊髄に対する LISW 適用の安全性の調査

第 3 章では、健常な脊髄組織に対して LISW を適用することの安全性を調査するため、Basso-Beattie-Bresnahan (BBB)スコアによる運動機能評価を行った[20, 21]。その結果、フルエンス 0.3 J/cm^2 のときは、10 パルスの適用でも運動機能の低下は見られなかったが、フルエンス 0.9 J/cm^2 のときには、1 パルスの適用でも運動機能の低下が見られた。

一般に物理学的遺伝子導入法では、その物理エネルギーにより組織損傷を引き起こす危

陰性があるため、ここではまず脊髄損傷モデルラットに対する LISW 適用により、機能学的な損傷が生じないか調査した。上記脊髄損傷モデルを作製後、露出胸髄の硬膜上にフルエンス 0.3 J/cm^2 , 10 パルスで LISW を適用した。このとき、ターゲットから発生した LISW を効率的に伝搬させるため、黒色天然ゴムと胸髄硬膜の間には音響結合剤として超音波ゼリー(Echo Jelly, アロカ)を塗布した。LISW 適用から 7 日後, 14 日後, 21 日後に, 第 3 章で述べた BBB スコアによる運動機能評価を行った[20, 21]。脊髄損傷のみの群(Control)と LISW 適用群(LISW application)の 2 群につき, それぞれラット 4 匹ずつを対象に実験を行ってデータの統計解析を行った。実験日ごとに 2 群の BBB スコアにつきマン・ホイットニー(Mann-Whitney)検定を行い, $P < 0.05$ を統計学的に有意であるとした。

4.2.4 損傷脊髄への siRNA 導入

前章で述べた LISW によるラット健常脊髄へのレポーター遺伝子の導入実験では, アストロサイトにおいて遺伝子発現が観察されている。しかし, 外傷を負わせていることと導入遺伝子が異なることから, 損傷脊髄に対しても標的とするアストロサイトに導入遺伝子(siRNA)が取り込まれるか確認する必要がある。そこで, ラット脊髄損傷モデルに対して蛍光分子の Alexa Fluor 488 により標識されたレポーター siRNA (5'-UUC UCC GAA CGU GUC ACG UdT dT-3'(sense) and 5'-ACG UGA CAC GUU CGG AGA AdT dT-3'(antisense), Qiagen Inc.)の導入実験を行った。siRNA 分子単体では, 生体内のリボヌクレアーゼによって数時間内に分解されてしまうため, それを防ぐためにアテロコラーゲン(1390, Koken)を用いて siRNA 分子を修飾した[22-26]。生理的条件下において, アテロコラーゲンは正電荷, siRNA 分子は負電荷を帯びるため, その両者は静電的に結合し複合体を形成する。この状態で siRNA は生体内の酵素による分解を免れ, 組織内に拡散することができる。さらには, 負電荷を帯びる細胞膜と結合しやすくなる。脊髄損傷を作製後, 31 ゲージの注射針を装着したマイクロシリンジを用いて, 露出したラット胸髄の髄腔内の 3~5 箇所 siRNA 溶液(最終濃度 $10 \mu\text{M}$)を合計 $50 \mu\text{l}$ 注入した。実質内への直接注射をしなかったのは, 損傷が拡大してしまうのを防ぐためである。注入速度は, 髄腔内の液圧が過度に上昇するのを防ぐために $5 \mu\text{l}/\text{min}$ 未満とした。siRNA 溶液を注入した胸髄の硬膜上からフルエンス 0.3 J/cm^2 , 10 パルスの LISW を適用した(Fig. 4-2)。先述の実験と同様に, LISW を効率的に伝搬させるため, 黒色天然ゴムと胸髄硬膜の間に超音波ゼリー(Echo Jelly, アロカ)を塗布した。実験は, 対照群として脊髄損傷のみの群(SCI 群, SCI group), 損傷後に siRNA 溶液を注入した群(siRNA 群, SCI + siRNA group), および siRNA 溶液注入後に LISW を適用した群(LISW

群, SCI + siRNA + LISW group)の3条件で行った.

中間径フィラメントタンパク質遺伝子の抑制実験には, GFAP と vimentin それぞれの発現を抑制する siRNA の混合溶液を使用した. siRNA は配列特異的な遺伝子発現抑制が可能であり, 標的とする配列によってその抑制量に変化する[16, 27-31]. そのため, 所望のタンパク質抑制効果を得るためには配列の選択が重要となるが, 本実験ではこれまで *in vitro*, *in vivo* の実験でラット脊髄損傷後の中間径フィラメントタンパク質の発現抑制が報告されている siRNA を使用した[16]. GFAP (NM_017009)を標的とする siRNA (5'-CGA GUC CUU GGA GAG GCA AdT dT-3' (sense) and 5'-UUG CCU CUC CAA GGA CUC GdT dT-3' (antisense))と vimentin (NM_031140)を標的とする siRNA (5'-UGC UUC UCU GGC ACG UCU UdT dT-3' (sense) and 5'-AAG ACG UGC CAG AGA AGC AdT dT-3' (antisense))はどちらも Qiagen 社より購入した. Menet らの報告[15]によれば, GFAP と vimentin のいずれかのみを欠損したノックアウトマウスでは神経線維の密度は有意に上がらず, GFAP と vimentin をともに欠損したノックアウトマウスでは脊髄損傷後の神経再生が促進されている[32-35]. このことから, GFAP または vimentin 発現遺伝子に対する siRNA を等量で混ぜた siRNA 溶液を最終濃度 10 μ M に調整して用いた. 蛍光標識 siRNA の導入実験と同様の手順で, アテロコラーゲンによる siRNA 分子の修飾後, 脊髄損傷モデルラットの髄腔内に siRNA 溶液を 50 μ l 注入し, 硬膜上から LISW を適用した. 実験条件は, 脊髄損傷のみの群(SCI 群, SCI group), 損傷後に siRNA 溶液を注入した群(siRNA 群, siRNA group), および siRNA 溶液注入後に LISW を適用した群(LISW 群, LISW group)の3条件とした.

4.2.5 蛍光標識 siRNA の分布評価

蛍光分子で標識されたレポーターsiRNA の導入実験では, 脊髄損傷および siRNA 導入から5日後のラットに対し, ペントバルビタール 50 mg/kg の腹腔内投与による麻酔下に 4% パラホルムアルデヒドリン酸緩衝溶液(200 ml)による灌流固定を行った. 灌流固定後, 直達損傷部位を中心に長さ約 10 mm の脊髄を切り出し, 灌流固定時と同じ組織固定液で後固定を約 16 時間行った. 20%スクロース入りのリン酸緩衝生理食塩水(4°C)で洗浄した後, 液体窒素を用いて OCT (optimal cutting temperature)コンパウンド(4583, Tissue-Tek)中に組織を包埋し, ミクロトームを用いて厚さ 10 μ m の矢状断切片を作製した. 蛍光標識 siRNA の蛍光は, 蛍光顕微鏡(Axiovert 200, Carl Zeiss)を用いて観察した. siRNA 分子に結合している Alexa Fluor 488 の蛍光は, 波長 465 ~ 505 nm で励起し, 波長 515 ~ 565 nm のバンドパスフィルタを挿入して観察した. 損傷脊髄内の蛍光標識 siRNA 分布を半定量的に評価するため, SCI

群, siRNA 注入群, および LISW 適用群の 3 群で, 取得した蛍光画像において標識 siRNA 由来と考えられる特定の強度以上の緑色蛍光を示すピクセル数を深さ方向に分解してカウントした. 各条件でラット 3 匹を対象に実験を行い, それぞれのラットで損傷中心部の画像を 3 枚ずつ取得し, 1 枚あたり任意の 3 本の蛍光強度分布を計測した.

また, 蛍光標識 siRNA のアストロサイトへの取り込みを確認するため, 先述の通り作製した凍結切片に対して GFAP の蛍光免疫染色を行った. 抗 GFA・ウサギポリクローナル抗体(希釈率 1:3, N1506, Dako)を一次抗体, TRITC (tetramethyl-rhodamine-isothiocyanate)標識抗ウサギ IgG (希釈率 1:40, R0156, Dako)を二次抗体として用いた. インキュベーションの時間は一次抗体が室温 25°C で 2 時間, 二次抗体が室温 25°C で 2 時間である. 組織スライスの封入には, 蛍光染色用マウンティングメディウム(S3023, Dako)を用いた. 蛍光顕微鏡 (Axiovert 200, Carl Zeiss)による観察で, 緑色蛍光を発するレポーターsiRNA と赤色蛍光を発する GFAP の蛍光画像を重ね合わせて, siRNA 分子のアストロサイト内への取り込みについて評価した. TRITC の蛍光は, 波長 534 ~ 558 nm で励起し, 波長 590 nm 以上の透過フィルタを挿入して観察した.

4.2.6 中間径フィラメントタンパク質の発現評価

脊髄損傷後の中間径フィラメント質の発現量を定量化するため, ウェスタンブロッティング(Western blotting)によるタンパク質定量を行った. 脊髄損傷から 5 日後のラットに対し, ペントバルビタール 50 mg/kg の腹腔内投与による麻酔下に, 直達損傷部位を中心に長さ約 10 mm の脊髄を切り出し, 直ちに液体窒素に入れて組織を凍結させた. タンパク質発現の基準として, 椎弓切除をしたが損傷を与えない群(Sham 群)でも同様に, 椎弓切除から 5 日後に脊髄を取り出した. RIPA バッファァー(8990, Thermo Scientific)中で組織を均質化(homogenization)し, タンパク質濃度計測キット(500-0112, Biorad)を用いてバッファァー中のタンパク質濃度を計測した. 全てのサンプルでタンパク質濃度が 0.5 mg/ml となるようにバッファァー量を調整した後, SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動でタンパク質を分離した. これを, ウェスタンブロッティングを用いて膜に転写し, GFAP または vimentin に対する抗体でそのタンパク質の存在を検出した. ここで用いた抗体は, 抗 GFA・ウサギポリクローナル抗体(希釈率 1:1000, ROI003, コスモバイオ)と抗 vimentin・マウスモノクローナル抗体(希釈率 1:1000, sc-6260, Santa Cruz Biotechnology Inc.)である. また, 内在性タンパク質として GAPDH の量も同時に計測した. この内在性タンパク質は, 取り出した組織内の全タンパク質量を示す指標となる. 一次抗体には, 抗 GAPDH・マウスモノクローナ

ル抗体(希釈率 1:1000, sc-32233, Santa Cruz Biotechnology Inc.)を用いた。二次抗体として、ペルオキシダーゼ(horseradish peroxidase, HRP)標識の抗体を用い、化学発光検出器(LAS-3000, 富士フイルム)と化学発光検出試薬(ECL reagent, GE Healthcare)によってタンパク質の存在を示すバンド(黒い線)の写真を取得した。ウエスタンブロッティングで得られるバンドを定量解析するための画像解析ソフト(Image J)を用いて、SCI 群, siRNA 群, および LISW 群の 3 群において、それぞれ Sham 群と比べたタンパク質量の増減を定量化した。データの統計解析には 1 元配置分散分析(analysis of variance, ANOVA)を行い、事後検定として Tukey 法を用いた。P 値が 0.05 より小さいときに統計学的有意差があると判断した。

4.2.7 組織学的評価

中間径フィラメントタンパク質遺伝子に対する siRNA の導入実験において、脊髄組織内での同タンパク質遺伝子の発現分布およびグリア瘢痕形成を調査するため、それぞれ組織切片の免疫染色およびヘマトキシリン・エオシン(Hematoxylin and Eosin, HE)染色を行った。脊髄損傷から 5 日後および 21 日後のラットに対し、4.2.4 項で述べた手順と同様に凍結組織切片(厚さ 10 μm , 矢状面と横断面)を作製した。免疫染色では、最初に 3%過酸化水素水で内因性ペルオキシターゼを不活化した後、GFAP 染色では抗 GFA \cdot ウサギポリクローナル抗体(希釈率 1:3, N1506, Dako)を、vimentin 染色では抗 vimentin \cdot マウスモノクローナル抗体(希釈率 1:10, sc-6260, Santa Cruz Biotechnology Inc.)を一次抗体として 4 $^{\circ}\text{C}$ で約 16 時間インキュベーションを行った。リン酸緩衝生理食塩水で洗浄後、室温で 30 分間、HRP 標識ストレプトアビジンでインキュベーションし、3,3'-ジアミノベンジジン(diaminobenzidine)を基質として陽性のタンパク質発現を検出した。

脊髄損傷後の組織内における空洞(神経組織の脱落部分)の形成を評価するため、損傷 21 日後の組織切片(矢状断)について HE 染色画像から空洞断面積の定量化を行った。直達損傷部中心の HE 染色画像について、ラット 1 匹あたり任意の 3 枚の写真の空洞部分の面積を画像解析ソフト(Adobe Photoshop 7.0)により評価した。データの統計解析には 1 元配置分散分析を行い、事後検定として Tukey 法を用いた。P < 0.05 を統計学的に有意であるとした。

4.2.8 運動機能評価

ラットの運動機能を経時的に評価するため、第 3 章で述べた実験と同様に、BBB スコアによる運動機能評価を行った[20, 21]。中間径フィラメントタンパク質に対する siRNA の導

入実験において、脊髄損傷モデルの作製および LISW の適用から 1 日後、3 日後、5 日後、7 日後、10 日後、14 日後、および 21 日後に運動機能の評価を行った。BBB スコアの経時的变化を示すデータに対して 2 元配置分散分析を行い、事後検定として Tukey 法を用いた。P 値が 0.05 より小さいときに統計学的有意差があると判断した。

4.3 実験結果

4.3.1 損傷脊髄に対する LISW 適用の安全性の調査

Table 4-1 に、脊髄損傷モデルラットに対する LISW 適用(フルエンス 0.3 J/cm^2 , 10 パルス)で機能学的な損傷を与えることがないかを調査した実験の結果を示す。脊髄損傷のみの群と LISW 適用群の間で、損傷 7 日後、14 日後、21 日後の BBB スコアに統計学的に有意な差は見られなかった。これより、ラットの損傷脊髄に対するフルエンス 0.3 J/cm^2 , 10 パルスの LISW 適用では、下肢運動機能の低下を引き起こすことはないことがわかった。

4.3.2 損傷脊髄内における siRNA 分布

損傷から 5 日後の脊髄内における蛍光標識 siRNA 導入の実験結果を Figure 4-3 に示す。頭部を画像左側、背部を画像上側とした矢状断面のラット脊髄組織であり、レポーター siRNA は緑色の蛍光を呈する。SCI 群(Fig. 4-3 (a))で観測される蛍光は、蛍光標識 siRNA が注入されていないため自家蛍光であり背景光(バックグラウンド)を表す。siRNA 溶液は損傷直後に脊髄とそれを囲む硬膜の間の髄腔内に投与されており、脊髄表面部分から髄腔内を拡散する。しかし、siRNA 群で siRNA 由来の蛍光が観測されたのは組織浅部だけであった(Fig. 4-3 (b))。一方、LISW 群では蛍光標識 siRNA が損傷脊髄内に広く分布している様子が観察された(Fig. 4-3 (c))。GFAP の蛍光免疫染色の結果(Fig. 4-3 (d), (e), (f))は、脊髄損傷後に活性化するアストロサイトの発現(赤色蛍光)を示しており、条件によらず損傷部位(写真の中央部)の周辺に集積している様子が観察された。脊髄表面からおよそ 1.5 mm の深さにおける、LISW 群の脊髄の蛍光標識 siRNA の分布と GFAP の蛍光免疫染色、およびそれらの重ね合わせ画像を Figure 4-4 に示す。緑色蛍光で示す siRNA と赤色蛍光で示す GFAP の重なり(黄色部)が見られることから、アストロサイトに siRNA 分子が導入されていることを示している。

Figure 4-5 は、特定の強度以上の緑色蛍光を示すピクセル数の深さ分布を示している。こ

ここで、SCI群で観測されている緑色蛍光を示す6,000~10,000のピクセルは自家蛍光を示す。siRNA群では、深さ0~300 µmにsiRNA由来の蛍光が多く見られたが、深さ300~600 µm, 600~900 µm, 900~1,200 µm, 1,200~1,500 µmと組織が深くなるにつれて急速に蛍光強度が減衰している。それに比して、LISW群では深さ1,200~1,500 µmでも高い強度でレポーターsiRNAの蛍光が観察できている。このとき、背景光の蛍光強度を差し引くと、siRNA群の約3.5倍のピクセル数であった。

4.3.3 中間径フィラメントタンパク質の発現特性

損傷作製から5日後の脊髓組織切片をHE染色および免疫染色(GFAP, vimentin)した結果をFigure 4-6に示す。画像の中心部が外傷を加えた部分である。Figure 4-3と同様に、頭部を画像左側、背部を画像上側とした矢状断面の脊髓組織画像である。HE染色は、組織構造の全体像と形態学的な変化を把握するためのもので、細胞核と細胞質がそれぞれ青紫色とピンク色に染色される。GFAP, vimentinの免疫染色では、それぞれのタンパク質が発現した部分が褐色を呈する。Figure 4-6を見ると、条件によらず外傷直達部分の周囲で中間径フィラメントタンパク質が多く発現していた。褐色領域を比較すると、LISW適用群ではGFAPとvimentinの両方で損傷中心部分の発現が少なくなっていた。

この発現量を定量的に評価するために行ったウエスタンブロッティングの結果をFigure 4-7 (GFAP)とFigure 4-8 (vimentin)に示す。SCI群の損傷5日後の中間径フィラメントタンパク質は、GFAP, vimentinともにその発現量が著しく増大していることが観察された(Sham群に比して平均値でそれぞれ4.9倍, 1.9倍)。そして、siRNA群でも両タンパク質の産生抑制効果が見られたが、LISW群における発現抑制効果はより顕著であった(GFAP, vimentinともにSCI群に対して $P < 0.05$)。この結果は、損傷後に発現上昇が見られる中間径フィラメントタンパク質を、LISWを用いたsiRNA導入によって効率良く抑制できていることを示している。

4.3.4 損傷脊髓におけるグリア瘢痕と空洞形成

脊髓損傷モデル作製から21日後の組織画像をFigure 4-9, Figure 4-10, Figure 4-11, およびFigure 4-12に示す。Figure 4-9は頭部を左側、背部を上側とした損傷中心部の矢状断画像で、HE染色とGFAPおよびvimentinの免疫染色の結果を表す。Figure 4-10からFigure 4-12は横断面の組織画像で、損傷中心部とその前後における切片をHE染色および免疫染色し

た結果である。挫傷中心部には空洞が形成され、その周囲にはグリア瘢痕が形成されている。このグリア瘢痕形成に寄与する活性化アストロサイトの細胞骨格タンパク質である GFAP と vimentin は、空洞の周囲に強く発現していることがわかる。HE 染色の結果から空洞断面積を 3 群で比較すると、Figure 4-13 に示すように LISW 適用群の脊髓組織の空洞の大きさが、他の 2 群に比して顕著に減少していることが観察された (SCI 群に対して $P < 0.01$, siRNA 群に対して $P < 0.05$)。これは、LISW を用いた siRNA 導入により GFAP と vimentin の発現が抑制されたことでグリア瘢痕の形成が低減され、自発性の軸索伸長を助勢し、組織の欠落(空洞)が縮小したと考えられる。

4.3.5 運動機能スコアの経時変化

Figure 4-14 に運動機能評価の結果を示す。Figure 4-14 (c)に示した運動機能スコアの経時変化を見ると、全条件で損傷後の運動機能は徐々に回復していき、脊髓損傷作製から約 2 週間後には BBB スコアはほぼ変化しない状態となった。損傷 5 日後以降は、LISW 群において他の 2 群に対して有意に高いスコアが得られた。損傷から 5 日後の平均スコアは、SCI 群、siRNA 群、LISW 群でそれぞれ 3.3, 4.4, 6.0 であった。BBB スコアの 3 点と 6 点の差は、可動する関節の数と動きの大きさ(関節角度)に違いを表している (Fig. 4-14 (a), (b))。また、3 週間後の平均スコアは、SCI 群、siRNA 群、LISW 群のそれぞれで 11.3, 11.5, 13.4 であった。11 点と 13 点では前肢と後肢に協調運動が観察されるかどうかという重要な違いがある。

4.4 考察

4.4.1 損傷脊髓に対する LISW 適用の安全性

脊髓損傷に対する遺伝子治療の臨床応用を考えたとき、遺伝子導入効率の高さも重要であるが、最も重要視すべきは安全性である。このことは、健常組織に影響のない標的部選択的な遺伝子発現が可能か否かに密接に関係する。現在臨床で最も広く用いられているのはウイルスベクターであるが、ウイルスが有する生物活性の高さから脊髓内で広範に遺伝子発現してしまうだけでなく、免疫反応を惹起してしまうという問題がある[36-42]。外傷性脊髓損傷の受傷時に免疫反応が過剰に生じると、二次損傷を拡大してしまう恐れがある。一方、物理的手法による脊髓損傷の遺伝子治療においては、使用する物理エネルギー

一による組織損傷を引き起こす危険性がある[43-46]. 例えば, 超音波とマイクロバブルを用いたラット損傷脊髄へのレポーター遺伝子導入においては, 直径 5 mm の発振器(プローブ)から発生させた周波数 1 MHz, デューティ比 20%の超音波を, 強度 1 W/cm^2 以上で適用したとき, 下肢運動機能の低下を来した事例が報告されている(照射時間と評価日数は不明)[47]. 上述したように, LISW を用いた本研究においては, 脊髄損傷部位に対しレーザーフルエンス 0.3 J/cm^2 , スポット径 3 mm, 10 パルスの条件における LISW の適用で, 適用から 21 日後まで脊髄損傷モデルラットの運動機能の低下は観察されなかった(Table 4-1). これは第 3 章でも述べた通り, LISW の作用時間が短いこと(1 μs 未満), 生体への侵襲性が低い圧縮性の圧力であること等によるものと考えられる. これらは本遺伝子導入技術の安全性を示す結果と言える.

4.4.2 LISW の伝搬特性と蛍光標識 siRNA の導入

LISW によるラット脊髄損傷部位への蛍光標識 siRNA の導入実験では, 組織深さ 1,200 ~ 1,500 μm でもレポーター siRNA 由来の蛍光が明瞭に観察できた(Fig. 4-5). また, GFAP の蛍光免疫染色の結果からは, そこに位置するアストロサイトへの siRNA 分子の取り込みが確認された(Fig. 4-4). ラット脊髄表面から約 1.5 mm には, 運動ニューロンの神経細胞体が存在する前角(灰白質), 神経軸索が走行する側索および前索(白質)が存在し, いずれの部位も下肢運動機能に関わる神経路が走行している[48]. 本研究の治療プロトコルにおいて, 運動機能回復の鍵となるのは運動神経路を阻害するグリア瘢痕の低減であり, その運動神経路が存在する部位でアストロサイトに siRNA 導入が確認できた意義は大きい.

本実験では, siRNA 溶液を髄腔内に投与し, 硬膜上からレーザーフルエンス 0.3 J/cm^2 , スポット径 3 mm の条件で発生させた LISW を適用した. siRNA 分子は, 生体内のリボヌクレアーゼによる分解を防ぐためにアテロコラーゲンで修飾されており, これによって siRNA 溶液は髄腔内で拡散し, 数日から一週間は体内で安定に存在できると考えられる[22, 23]. 特にアストロサイト内の GFAP, vimentin を含む中間径フィラメントタンパク質は代謝回転(turnover)が遅く, いずれのタンパク質も, 細胞に存在する全タンパク質量の比で 60% は半減期 8 日間で代謝し新たなタンパク質が生成されているとの報告がある[49]. siRNA 分子が分解されずに安定に維持できれば, そのタンパク質生成に関わる遺伝子発現抑制が可能であるため, 本研究の治療プロトコルにとっては必要な特性である. しかし, 髄腔内投与で拡散した siRNA 分子が効率的に脊髄の実質内の細胞で取り込まれることはない. 生体内を拡散させた薬剤および遺伝子が細胞内に取り込まれるのは, 細胞のエンドサイトー

シスだけである。第 2 章で述べた脊髄ファントム(ポリアクリルアミドゲル)を用いた実験では、レーザーフルエンス 0.3 J/cm^2 のとき、ターゲット直下(ファントムなし)および厚さ 2 mm のファントムの伝搬で、LISW のピーク圧力はそれぞれ 44 MPa と 26 MPa であった。そのため、アストロサイトへの siRNA 導入が確認された深さ約 1.5 mm の位置では、ピーク圧力およそ 30~35 MPa の LISW が作用していると見積もれる。導入対象は異なるが、ラット皮膚およびマウス脳を対象とした遺伝子導入では、ピーク圧力がいずれも 25 MPa 以上の LISW 適用(3 パルス)で顕著な遺伝子導入が確認されている[50, 51]。生体部位が異なり一概には言えないが、本実験で適用した LISW の圧力特性が、損傷脊髄を対象とした遺伝子導入に必要とされる特性を備えていたと考えられる。そして、Figure 4-3 と Figure 4-5 に示したように、脊髄の腹側(前索側)にわたって蛍光標識 siRNA の導入が確認されたのは、硬膜上からの適用でも LISW が一定の指向性をもって効率的に伝搬したことを示している。

4.4.3 損傷脊髄への治療用 siRNA の導入と運動機能の改善

SCI 群では Figure 4-6 に示した免疫染色の結果から、脊髄損傷モデル作製から 5 日後には損傷部位の周辺を中心に中間径フィラメントタンパク質の発現が見られ、Figure 4-7 と Figure 4-8 の結果からは GFAP と vimentin の両方でその発現量が増大していることがわかる。上述したように、活性化アストロサイトは損傷部位に集積するため、グリア瘢痕抑制には中間径フィラメントタンパク質に対する siRNA を損傷部位選択的に導入する必要がある。LISW 群では、蛍光標識 siRNA の導入実験の結果(Figure 4-4)から直達損傷部のアストロサイトへの導入が確認されているため、中間径フィラメントタンパク質に対する siRNA もまた同様にその部位のアストロサイトに導入され、顕著な発現抑制が達成されたと考えられる(Fig. 4-7 および Fig. 4-8)。そのため、Figure 4-9 から Figure 4-12 に示した損傷 21 日後の組織画像でグリア瘢痕の低減が見られたのは、期待通りにグリア瘢痕の形成に関わる中間径フィラメントタンパク質の発現が抑制されたことが寄与したものである。

Figure 4-14 に示した運動機能評価の結果では、脊髄損傷の 5 日後以降に、LISW 群において他の 2 群に対して有意に高いスコアが得られた。本実験で用いた外傷性の脊髄損傷モデルでは、運動機能スコアと残存あるいは再形成された神経軸索の本数(おおよそ白質部分の容積と考えられる)、および組織空洞の大きさに相関があることが知られている[52-55]。Figure 4-13 に示したように、損傷 21 日後の HE 染色画像において LISW 群の組織空洞の大きさが他の 2 群に比して顕著に減少していることが観察されている。生体深部に位置する脊髄の腹側には、皮質脊髄路および前角といった下肢運動機能に関わる神経路が走行して

いるため、この成果は、LISW によって脊髄深部のアストロサイトに siRNA を導入できたことが大きな要因だと考えられる。すなわち、グリア瘢痕の縮小によって再形成される神経軸索が増加し、結果的に運動機能が改善したと考えられる。

4.5 まとめ

本章では、LISW による遺伝子導入法を用いて、ラット脊髄損傷モデルを対象に、神経軸索伸長の阻害に関わる中間径フィラメントタンパク質遺伝子の発現を抑制する siRNA を導入し、損傷後の運動機能改善が得られたことを示した。蛍光標識 siRNA の導入実験から、LISW の適用により損傷脊髄の深部に存在する活性化アストロサイトへの導入が達成されていることが示された。さらに、中間径フィラメントタンパク質遺伝子に対する siRNA を導入した実験では、LISW を適用したラットにおいて、有意な組織空洞の縮減と運動機能スコアの向上が見られた。これはグリア瘢痕の形成に関わる中間径フィラメントタンパク質が siRNA 導入によって抑制されたためと考えられた。以上の結果は、LISW による遺伝子導入技術で、損傷部位選択的かつ深部への遺伝子導入が実現できたことで得られた成果である。

ヒトの脊髄の太さはラットの脊髄のおよそ 3～5 倍の 10～15 mm であるため、臨床応用のためにはより広い範囲での部位選択的遺伝子導入が求められる。第 3 章で示した健常ラット脊髄へのレポーター遺伝子の導入実験では、スポット径 3 mm の LISW 適用によって髄節レベル(長さ～5 mm)での遺伝子導入部位の制御が可能であった。これは、第 2 章の LISW の伝搬特性計測実験で示したように、一定の指向性をもってラット脊髄中(太さ 3～4 mm)を LISW が伝搬しているためと考えられた。この特性から、臨床応用時には、レーザーの照射スポット径の拡大または複数回の適用により、さらに広範囲での標的部位選択的な遺伝子導入が可能であると考えられる。また、レーザーが有する出力の制御性と空間制御性に基けば、臨床適用時に必要な、より精密な LISW のパラメータ選定が可能である。一方で、臨床現場においては、高い操作性を実現するため、経カテーテル的遺伝子導入技術が必要になることが想定される。次章では、光ファイバを用いた経カテーテル的遺伝子導入デバイスの開発について述べる。

参考文献 第4章

- [1] M. E. Hatten, R. K. Liem, M. L. Shelanski, C. A. Mason, "Astroglia in CNS injury," *Glia* **4**(2), pp. 233-243 (1991).
- [2] J. W. Fawcett, R. A. Asher, "The glial scar and central nervous system repair," *Brain Res. Bull.* **49**(6), pp. 377-391 (1999).
- [3] M. V. Sofroniew, "Molecular dissection of reactive astrogliosis and glial scar formation," *Trends Neurosci.* **32**(12), pp. 638-647 (2009).
- [4] L. D. Moon, R. A. Asher, K. E. Rhodes, J. W. Fawcett, "Regeneration of CNS axons back to their target following treatment of adult rat brain with chondroitinase ABC," *Nat. Neurosci.* **4**(5), pp. 465-466 (2001).
- [5] E. J. Bradbury, L. D. Moon, R. J. Popat, V. R. King, G. S. Bennett, P. N. Patel, J. W. Fawcett, S. B. McMahon, "Chondroitinase ABC promotes functional recovery after spinal cord injury," *Nature* **416**(6881), pp. 636-640 (2002).
- [6] J. Silver, J. H. Miller, "Regeneration beyond the glial scar," *Nat. Rev. Neurosci.* **5**(2), pp. 146-156 (2004).
- [7] Y. Goldshmit, M. P. Galea, G. Wise, P. F. Bartlett, A. M. Turnley, "Axonal regeneration and lack of astrocytic gliosis in EphA4-deficient mice," *J. Neurosci.* **24**(45), pp. 10064-10073 (2004).
- [8] J. R. Faulkner, J. E. Herrmann, M. J. Woo, K. E. Tansey, N. B. Doan, M. V. Sofroniew, "Reactive astrocytes protect tissue and preserve function after spinal cord injury," *J. Neurosci.* **24**(9), pp. 2143-2155 (2004).
- [9] F. Renault-Mihara, S. Okada, S. Shibata, M. Nakamura, Y. Toyama, H. Okano, "Spinal cord injury: emerging beneficial role of reactive astrocytes' migration," *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **40**(9), pp. 1649-1653 (2008).
- [10] C. B. Johansson, S. Momma, D. L. Clarke, M. Risling, U. Lendahl, J. Frisén, "Identification of a neural stem cell in the adult mammalian central nervous system," *Cell* **96**(1), pp. 25-34 (1999).
- [11] C. H. Tator, M. G. Fehlings, "Review of the secondary injury theory of acute spinal cord trauma with emphasis on vascular mechanisms," *J. Neurosurg.* **75**(1), pp. 15-26 (1991).
- [12] V. R. Edgerton, R. D. de Leon, S. J. Harkema, J. A. Hodgson, N. London, D. J. Reinkensmeyer, R. R. Roy, R. J. Talmadge, N. J. Tillakaratne, W. Timoszyk, A. Tobin, "Retraining the injured

- spinal cord,” J. Physiol. (London) **533**(Pt 1), pp. 15-22 (2001).
- [13] C. E. Hulsebosch, “Recent advances in pathophysiology and treatment of spinal cord injury,” Adv. Physiol. Educ. **26**(1-4), pp. 238-255 (2002).
- [14] V. Dietz, A. Curt, “Neurological aspects of spinal-cord repair: promises and challenges,” Lancet Neurol. **5**(8), pp. 688-694 (2006).
- [15] V. Menet, M. Prieto, A. Privat, M. Giménez y Ribotta, “Axonal plasticity and functional recovery after spinal cord injury in mice deficient in both glial fibrillary acidic protein and vimentin genes,” Proc. Natl. Acad. Sci. USA **100**(15), pp. 8999-9004 (2003).
- [16] T. Toyooka, H. Nawashiro, N. Shinomiya, K. Shima, “Down-regulation of glial fibrillary acidic protein and vimentin by RNA interference improves acute urinary dysfunction associated with spinal cord injury in rats,” J. Neurotrauma **28**(4), pp. 607-618 (2011).
- [17] J. R. Wrathall, R. K. Pettegrew, F. Harvey, “Spinal cord contusion in the rat: production of graded, reproducible, injury groups,” Exp. Neurol. **88**(1), pp. 108-122 (1985).
- [18] K. Gale, H. Kerasidis, J. R. Wrathall, “Spinal cord contusion in the rat: behavioral analysis of functional neurologic impairment,” Exp. Neurol. **88**(1), pp. 123-134 (1985).
- [19] L. J. Noble, J. R. Wrathall, “Spinal cord contusion in the rat: morphometric analyses of alterations in the spinal cord,” Exp. Neurol. **88**(1), pp. 135-149 (1985).
- [20] D. M. Basso, M. S. Beattie, J. C. Bresnahan, “A sensitive and reliable locomotor rating scale for open field testing in rats,” J. Neurotrauma **12**(1), pp. 1-21 (1995).
- [21] D. M. Basso, M. S. Beattie, J. C. Bresnahan, “Graded histological and locomotor outcomes after spinal cord contusion using the NYU weight-drop device versus transection,” Exp. Neurol. **139**(2), pp. 244-256 (1996).
- [22] A. Sano, M. Maeda, S. Nagahara, T. Ochiya, K. Honma, H. Itoh, T. Miyata, K. Fujioka, “Atelocollagen for protein and gene delivery,” Adv. Drug Deliv. Rev. **55**(12), pp. 1651-1677 (2003).
- [23] Y. Minakuchi, F. Takeshita, N. Kosaka, H. Sasaki, Y. Yamamoto, M. Kouno, K. Honma, S. Nagahara, K. Hanai, A. Sano, T. Kato, M. Terada, T. Ochiya, “Atelocollagen-mediated synthetic small interfering RNA delivery for effective gene silencing *in vitro* and *in vivo*,” Nucleic Acids Res. **32**(13), pp. e109/1-7 (2004).
- [24] F. Takeshita, Y. Minakuchi, S. Nagahara, K. Honma, H. Sasaki, K. Hirai, T. Teratani, N. Namatame, Y. Yamamoto, K. Hanai, T. Kato, A. Sano, T. Ochiya, “Efficient delivery of small interfering RNA to bone-metastatic tumors by using atelocollagen *in vivo*,” Proc. Natl. Acad.

Sci. USA **102**(34), pp. 12177-12182 (2005).

- [25] F. Takeshita, T. Ochiya, "Therapeutic potential of RNA interference against cancer," *Cancer Sci.* **97**(8), pp. 689-696 (2006).
- [26] N. Kinouchi, Y. Ohsawa, N. Ishimaru, H. Ohuchi, Y. Sunada, Y. Hayashi, Y. Tanimoto, K. Moriyama, S. Noji, "Atelocollagen-mediated local and systemic applications of myostatin-targeting siRNA increase skeletal muscle mass," *Gene Ther.* **15**(15), pp. 1126-1130 (2008).
- [27] A. Fire, S. Q. Xu, M. K. Montgomery, S. A. Kostas, S. E. Driver, C. C. Mello, "Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*," *Nature* **391**(6669), pp. 806-811 (1998).
- [28] S. M. Elbashir, J. Harborth, W. Lendeckel, A. Yalcin, K. Weber, T. Tuschl, "Duplexes of 21-nucleotide RNAs mediate RNA interference in cultured mammalian cells," *Nature* **411**(6836), pp. 494-498 (2001).
- [29] G. J. Hannon, "RNA interference," *Nature* **418**(6894), pp. 244-251 (2002).
- [30] G. Sui, C. Soohoo, B. Affar el, F. Gay, Y. Shi, W. C. Forrester, Y. Shi, "A DNA vector-based RNAi technology to suppress gene expression in mammalian cells," *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **99**(8), pp. 5515-5520 (2002).
- [31] M. Desclaux, M. Teigell, L. Amar, R. Vogel, M. Giménez y Ribotta, A. Privat, J. Mallet, "A novel and efficient gene transfer strategy reduces glial reactivity and improves neuronal survival and axonal growth *in vitro*," *PLoS One* **4**(7), pp. e6227/1-15 (2009).
- [32] V. Menet, M. Giménez Y Ribotta, F. Sandillon, A. Privat, "GFAP null astrocytes are a favorable substrate for neuronal survival and neurite growth," *Glia* **31**(3), pp. 267-272 (2000).
- [33] V. Menet, M. Giménez y Ribotta, N. Chauvet, M. J. Drian, J. Lannoy, E. Colucci-Guyon, A. Privat, "Inactivation of the glial fibrillary acidic protein gene, but not that of vimentin, improves neuronal survival and neurite growth by modifying adhesion molecule expression," *J. Neurosci.* **21**(16), pp. 6147-6158 (2001).
- [34] M. Pekny, M. Pekna, "Astrocyte intermediate filaments in CNS pathologies and regeneration," *J. Pathol.* **204**(4), pp. 428-437 (2004).
- [35] U. Wilhelmsson, L. Li, M. Pekna, C. H. Berthold, S. Blom, C. Eliasson, O. Renner, E. Bushong, M. Ellisman, T. E. Morgan, M. Pekny, "Absence of glial fibrillary acidic protein and vimentin prevents hypertrophy of astrocytic processes and improves post-traumatic regeneration," *J. Neurosci.* **24**(21), pp. 5016-5021 (2004).

- [36] M. I. Romero, G. M. Smith, "Adenoviral gene transfer into the normal and injured spinal cord: enhanced transgene stability by combined administration of temperature-sensitive virus and transient immune blockade," *Gene Ther.* **5**(12), pp. 1612-1621 (1998).
- [37] A. J. Mannes, R. M. Caudle, B. C. O'Connell, M. J. Iadarola, "Adenoviral gene transfer to spinal-cord neurons: intrathecal vs. intraparenchymal administration," *Brain Res.* **793**(1-2), pp. 1-6 (1998).
- [38] N. M. Boulis, V. Bhatia, T. I. Brindle, H. T. Holman, D. J. Krauss, M. Blaivas, J. T. Hoff, "Adenoviral nerve growth factor and beta-galactosidase transfer to spinal cord: a behavioral and histological analysis," *J. Neurosurg.* **90**(1 Suppl), pp. 99-108 (1999).
- [39] A. B. Huber, M. U. Ehrengruber, M. E. Schwab, C. Brösamle, "Adenoviral gene transfer to the injured spinal cord of the adult rat," *Eur. J. Neurosci.* **12**(9), pp. 3437-3442 (2000).
- [40] Q. Teng, D. K. Tanase, J. K. Liu, M. E. Garrity-Moses, K. B. Baker, N. M. Boulis, "Adenoviral clostridial light chain gene-based synaptic inhibition through neuronal synaptobrevin elimination," *Gene Ther.* **12**(2), pp. 108-119 (2005).
- [41] H. Nakajima, K. Uchida, S. Kobayashi, Y. Kokubo, T. Yayama, R. Sato, H. Baba, "Targeted retrograde gene delivery into the injured cervical spinal cord using recombinant adenovirus vector," *Neurosci. Lett.* **385**(1), pp. 30-35 (2005).
- [42] A. A. Abdellatif, J. L. Pelt, R. L. Benton, R. M. Howard, P. Tsoulfas, P. Ping, X. M. Xu, S. R. Whitemore, "Gene delivery to the spinal cord: comparison between lentiviral, adenoviral, and retroviral vector delivery systems," *J. Neurosci. Res.* **84**(3), pp. 553-567 (2006).
- [43] D. J. Wells, "Gene therapy progress and prospects: electroporation and other physical methods," *Gene Ther.* **11**(18), pp. 1363-1369 (2004).
- [44] S. Mehier-Humbert, R. H. Guy, "Physical methods for gene transfer: improving the kinetics of gene delivery into cells," *Adv. Drug Deliv. Rev.* **57**(5), pp. 733-753 (2005).
- [45] X. Gao, K. S. Kim, D. Liu, "Nonviral gene delivery: what we know and what is next," *AAPS J.* **9**(1), pp. E92-104 (2007).
- [46] M. S. Al-Dosari, X. Gao, "Nonviral gene delivery: principle, limitations, and recent progress," *AAPS J.* **11**(4), pp. 671-681 (2009).
- [47] M. Shimamura, N. Sato, Y. Taniyama, H. Kurinami, H. Tanaka, T. Takami, T. Ogihara, M. Tohyama, Y. Kaneda, R. Morishita, "Gene transfer into adult rat spinal cord using naked plasmid DNA and ultrasound microbubbles," *J. Gene Med.* **7**(11), pp. 1468-1474 (2005).
- [48] A. Siegel, H. N. Sapru, *Essential Neuroscience* (Lippincott Williams & Wilkins, 2006).

- [49]F. C. Chiu, J. E. Goldman, "Synthesis and turnover of cytoskeletal proteins in cultured astrocytes," *J. Neurochem.* **42**(1), pp. 166-174 (1984).
- [50]Y. Satoh, Y. Kanda, M. Terakawa, M. Obara, K. Mizuno, Y. Watanabe, S. Endo, S. Sato, K. Takishima, "Targeted DNA transfection into the mouse central nervous system using laser-induced stress waves," *J. Biomed. Opt.* **10**(6), pp. 060501/1-3 (2005).
- [51]S. Takano, S. Sato, M. Terakawa, H. Asida, H. Okano, M. Obara, "Enhanced transfection efficiency in laser-induced stress wave-assisted gene transfer at low laser fluence by increasing pressure impulse," *Appl. Phys. Express* **1**, pp. 038001/1-3 (2008).
- [52]D. B. Pettigrew, K. P. Shockley, K. A. Crutcher, "Disruption of spinal cord white matter and sciatic nerve geometry inhibits axonal growth *in vitro* in the absence of glial scarring," *BMC Neurosci.* **2**:8 (2001).
- [53]P. Schucht, O. Raineteau, M. E. Schwab, K. Fouad, "Anatomical correlates of locomotor recovery following dorsal and ventral lesions of the rat spinal cord," *Exp. Neurol.* **176**(1), pp. 143-153 (2002).
- [54]S. W. You, B. Y. Chen, H. L. Liu, B. Lang, J. L. Xia, X. Y. Jiao, G. Ju, "Spontaneous recovery of locomotion induced by remaining fibers after spinal cord transection in adult rats," *Restor. Neurol. Neurosci.* **21**(1-2), pp. 39-45 (2003).
- [55]F. Xie, B. Zheng, "White matter inhibitors in CNS axon regeneration failure," *Exp. Neurol.* **209**(2), pp. 302-312 (2008).

Table 4-1 Motor functional scores on the basis of an open-field test using BBB scale for the two groups: Control (SCI alone) and LISW application (SCI followed by application of 10 pulses of LISW generated at a laser fluence of 0.3 J/cm²). Scores are expressed as means \pm S.E.M (n = 4, each group). No significant differences were observed between the two groups.

Days after SCI	7	14	21
Control	6.4 \pm 1.1	9.3 \pm 1.6	11.4 \pm 1.6
LISW application	7.0 \pm 1.1	8.6 \pm 1.6	10.4 \pm 1.7

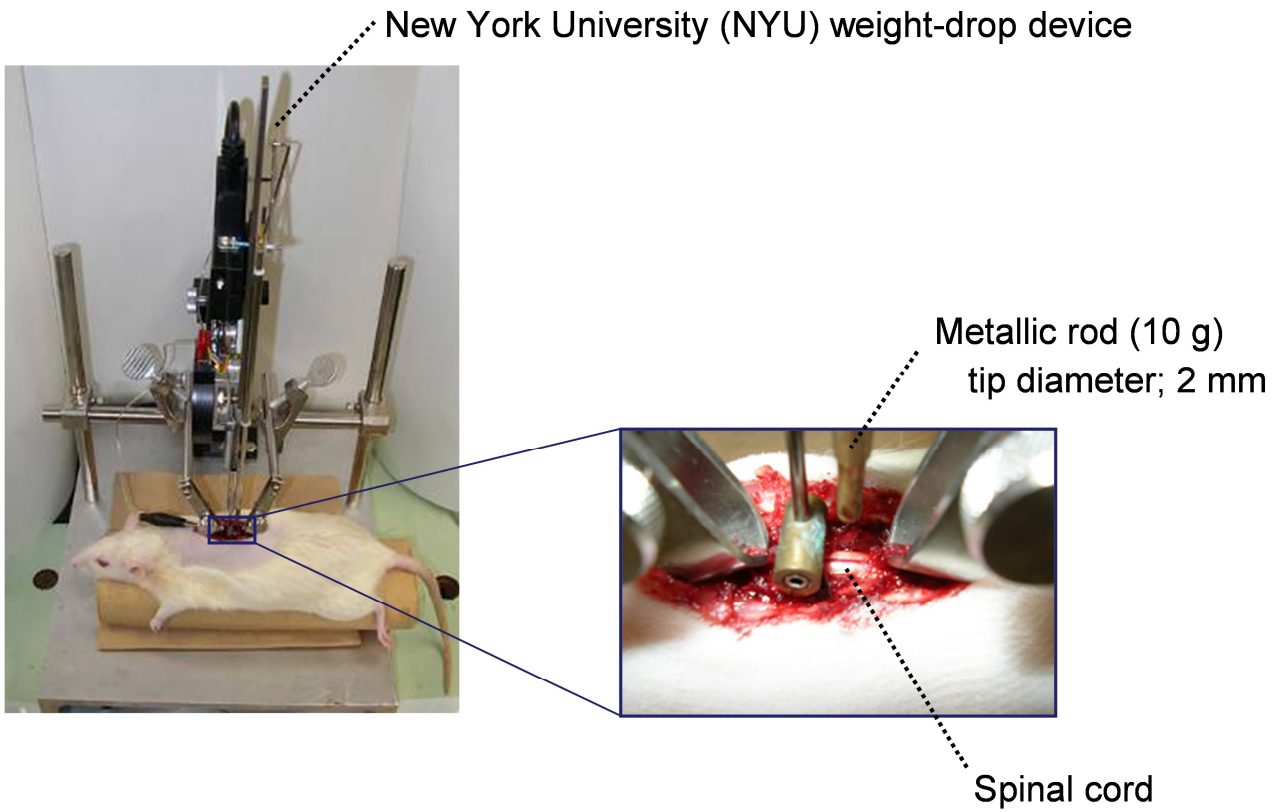


Fig. 4-1 NYU impactor equipment for production of spinal cord trauma.

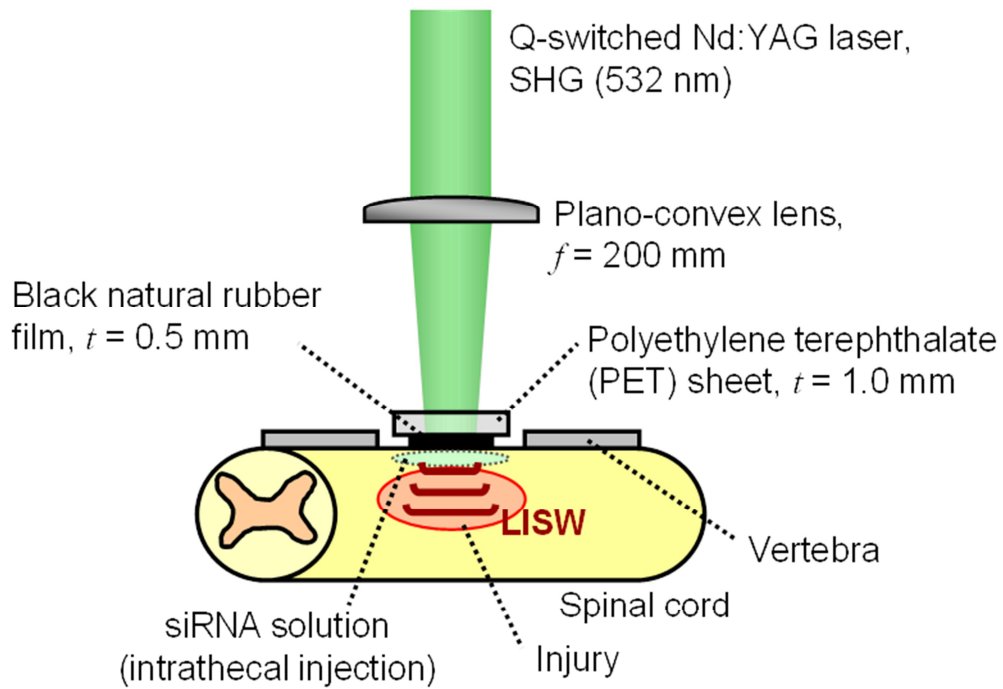


Fig. 4-2 Experimental arrangement for LISW-mediated siRNA delivery into rat injured spinal cord. After laminectomy exposing a tenth dorsal vertebra followed by making a spinal contusion, the solution of siRNA was intrathecally injected around the lesion, to which LISWs were applied.

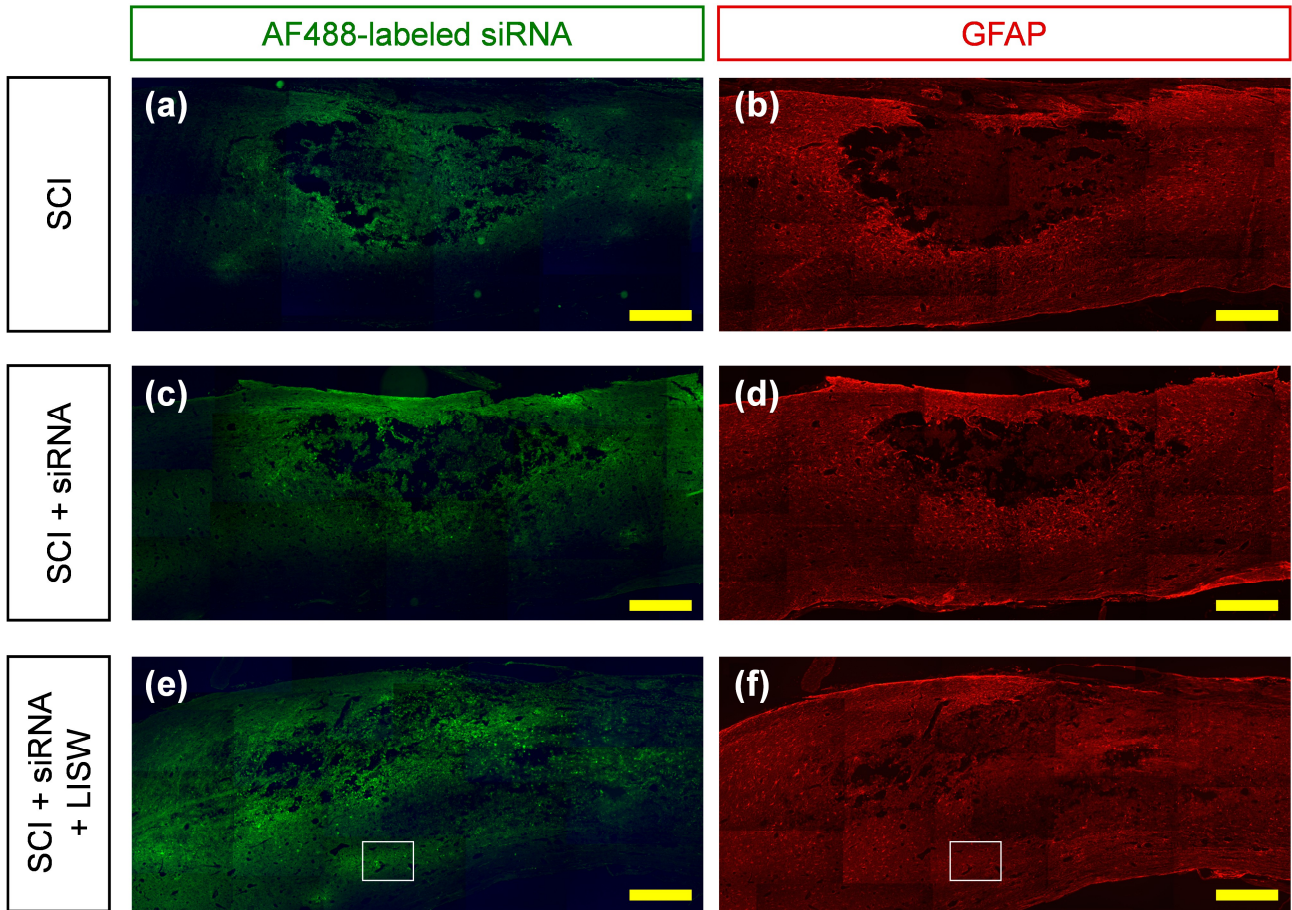


Fig. 4-3 Distributions of fluorescence-labeled siRNA (a, c, e) and GFAP expression (b, d, f) in sagittal sections of injured spinal cords at 5 days after trauma for the three groups: (i) SCI (a, b), (ii) SCI + siRNA (c, d), and (iii) SCI + siRNA + LISW (e, f). The enclosed area with the white lines in (e) and (f) are enlarged in the following figures (Fig. 4-4). The scale bars indicate 500 μ m.

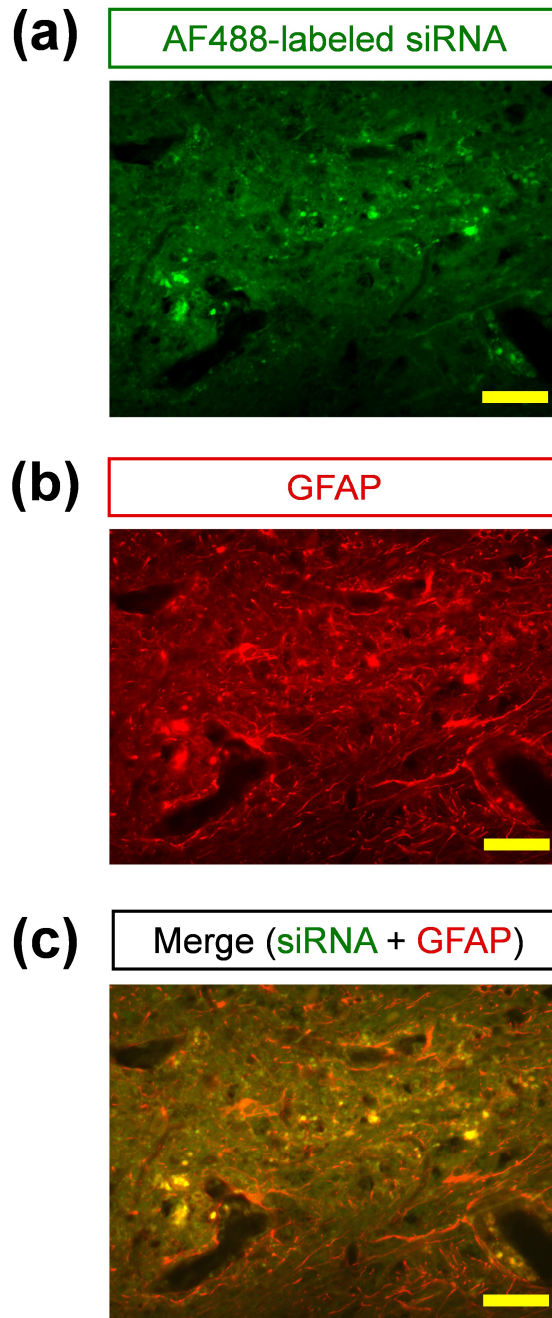


Fig. 4-4 Distributions of fluorescence-labeled siRNA (a) and GFAP expression (b) in sagittal sections of injured spinal cords at 5 days after trauma for the LISW application group (SCI + siRNA + LISW). The merged image (c) shows evident incorporation of siRNA into GFAP-positive astrocytes. The scale bars indicate 50 μ m.

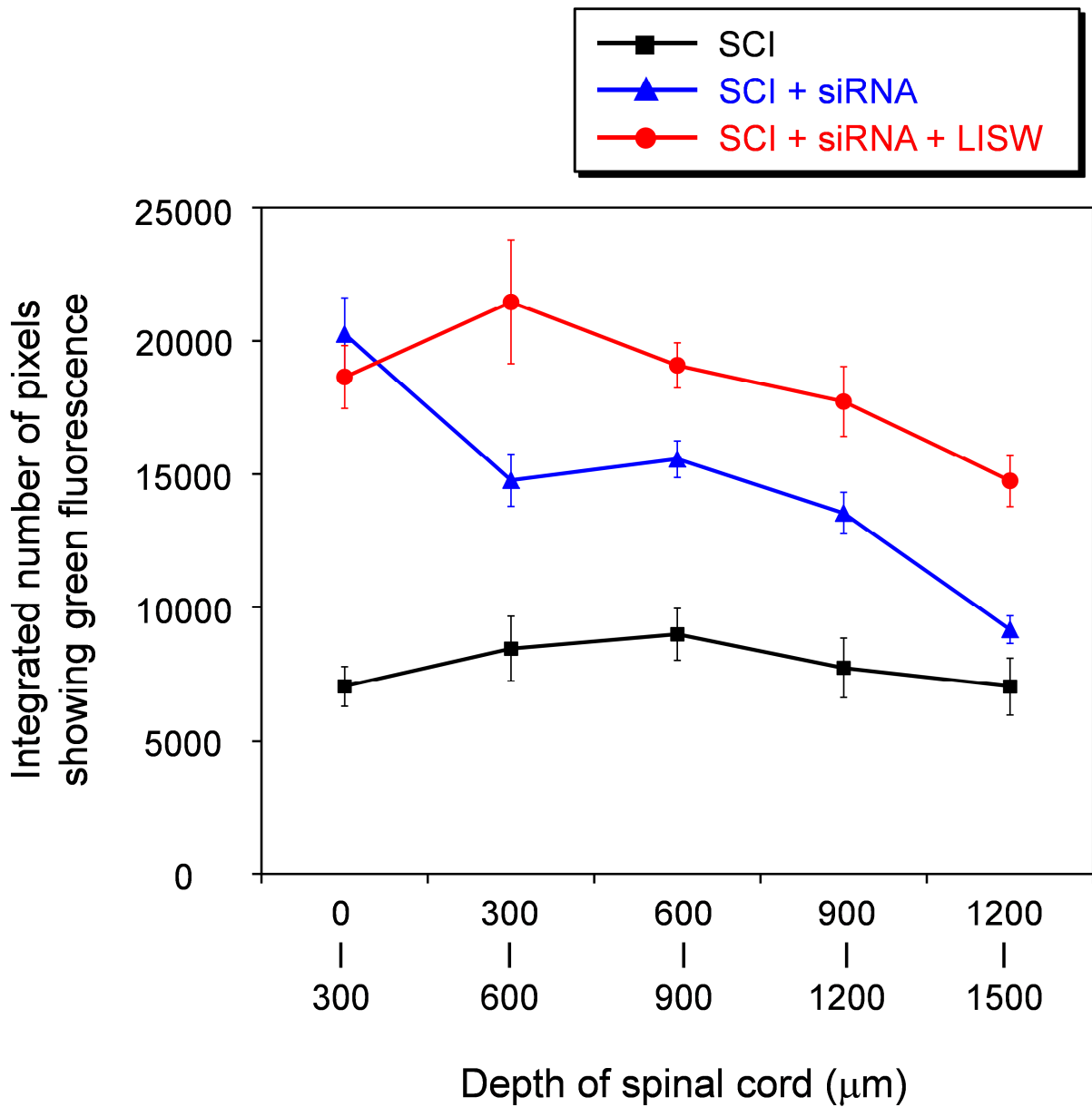


Fig. 4-5 Depth dependence of fluorescence intensity from the fluorescence-labeled siRNA in injured spinal cords. Values are expressed as means \pm S.E.M (n = 9, each group). The total number of pixels showing green fluorescence in the SCI alone group (SCI) indicates the level of background autofluorescence.

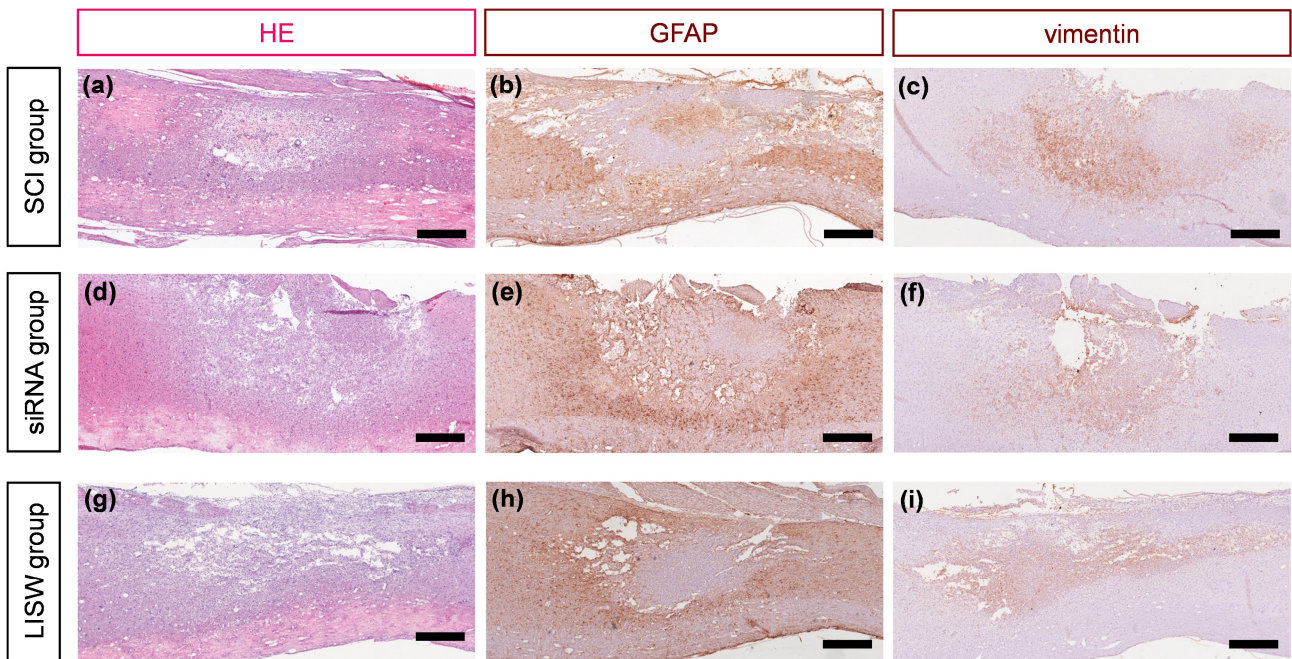


Fig. 4-6 Immunohistological images (HE: a, d, g; GFAP: b, e, h; vimentin: c, f, i) of longitudinal sections of injured spinal cords at 5 days after trauma for the three groups: (i) SCI group (a, b, c), (ii) siRNA group (d, e, f), and (iii) LISW group (g, h, i). The scale bars indicate 500 μ m.

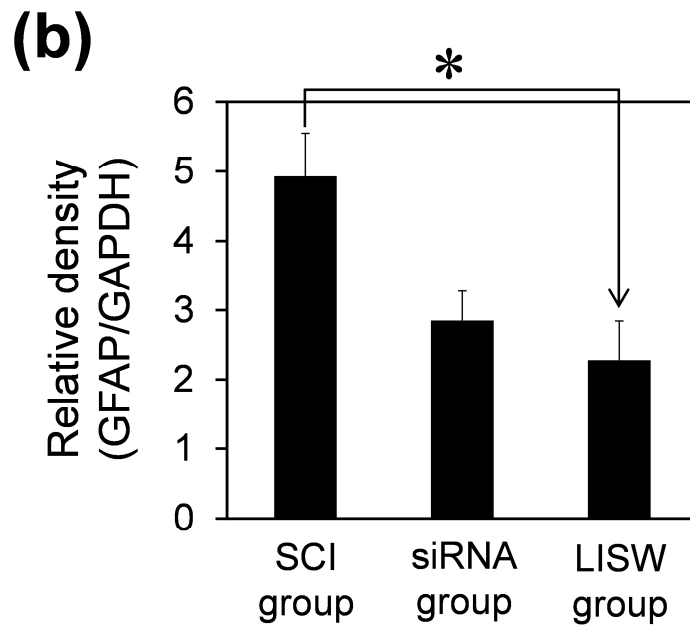
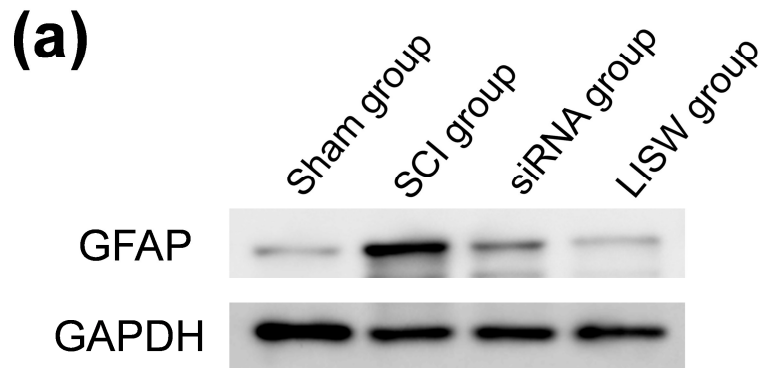


Fig. 4-7 Results of western blot analysis of GFAP expressions in 10-mm longitudinal spinal tissue segments centered on the injury site at 5 days after SCI. Results of the relative densities are expressed as means + S.E.M (n = 4, each group). * depicts $P < 0.05$.

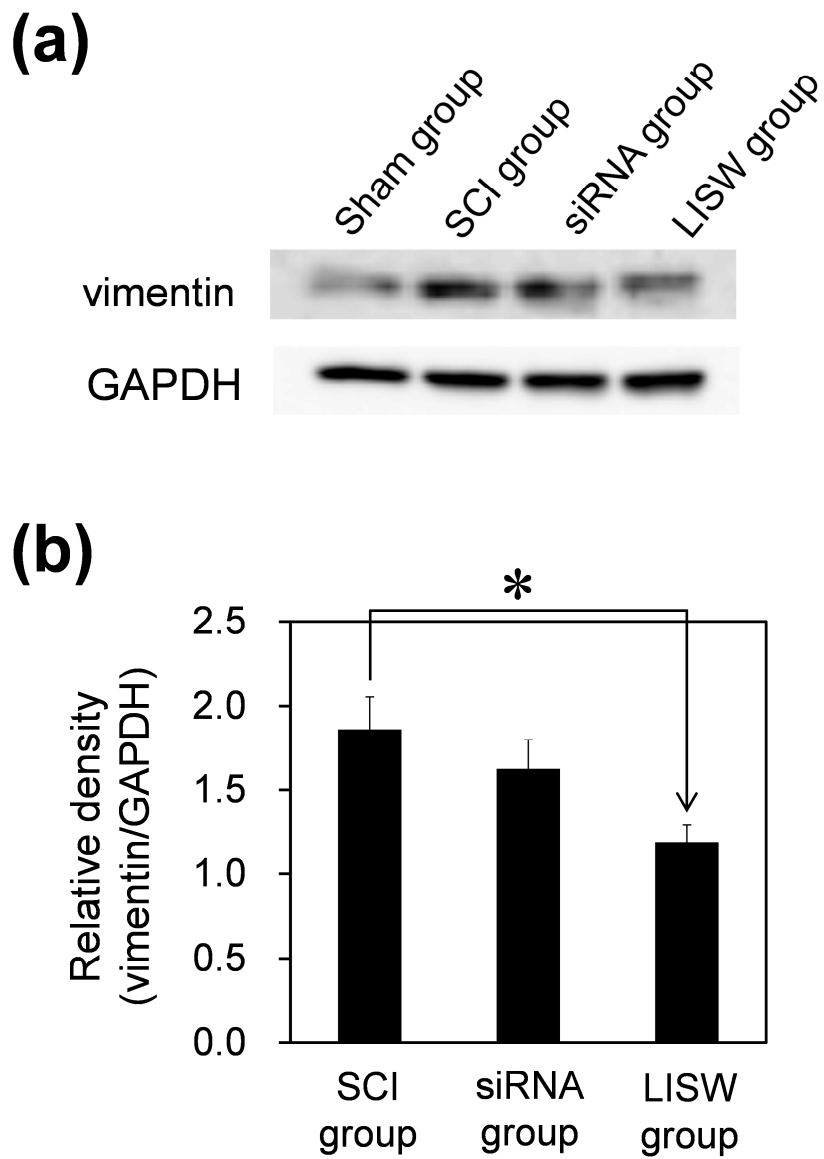


Fig. 4-8 Results of western blot analysis of vimentin expressions in 10-mm longitudinal spinal tissue segments centered on the injury site at 5 days after SCI. Results of the relative densities are expressed as means + S.E.M (n = 4, each group). * depicts $P < 0.05$.

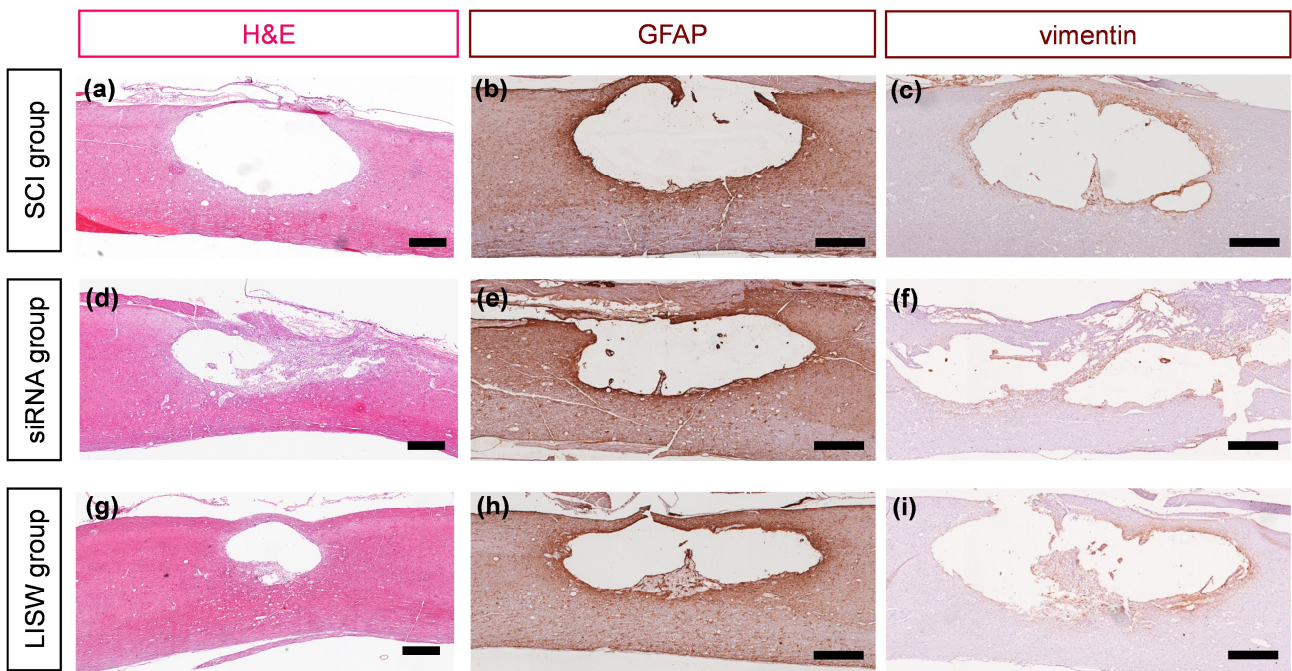


Fig. 4-9 Immunohistological images (HE: a, d, g; GFAP: b, e, h; vimentin: c, f, i) of longitudinal sections of injured spinal cords at 21 days after trauma for the three groups: (i) SCI group (a, b, c), (ii) siRNA group (d, e, f), and (iii) LISW group (g, h, i). The scale bars indicate 500 μm .

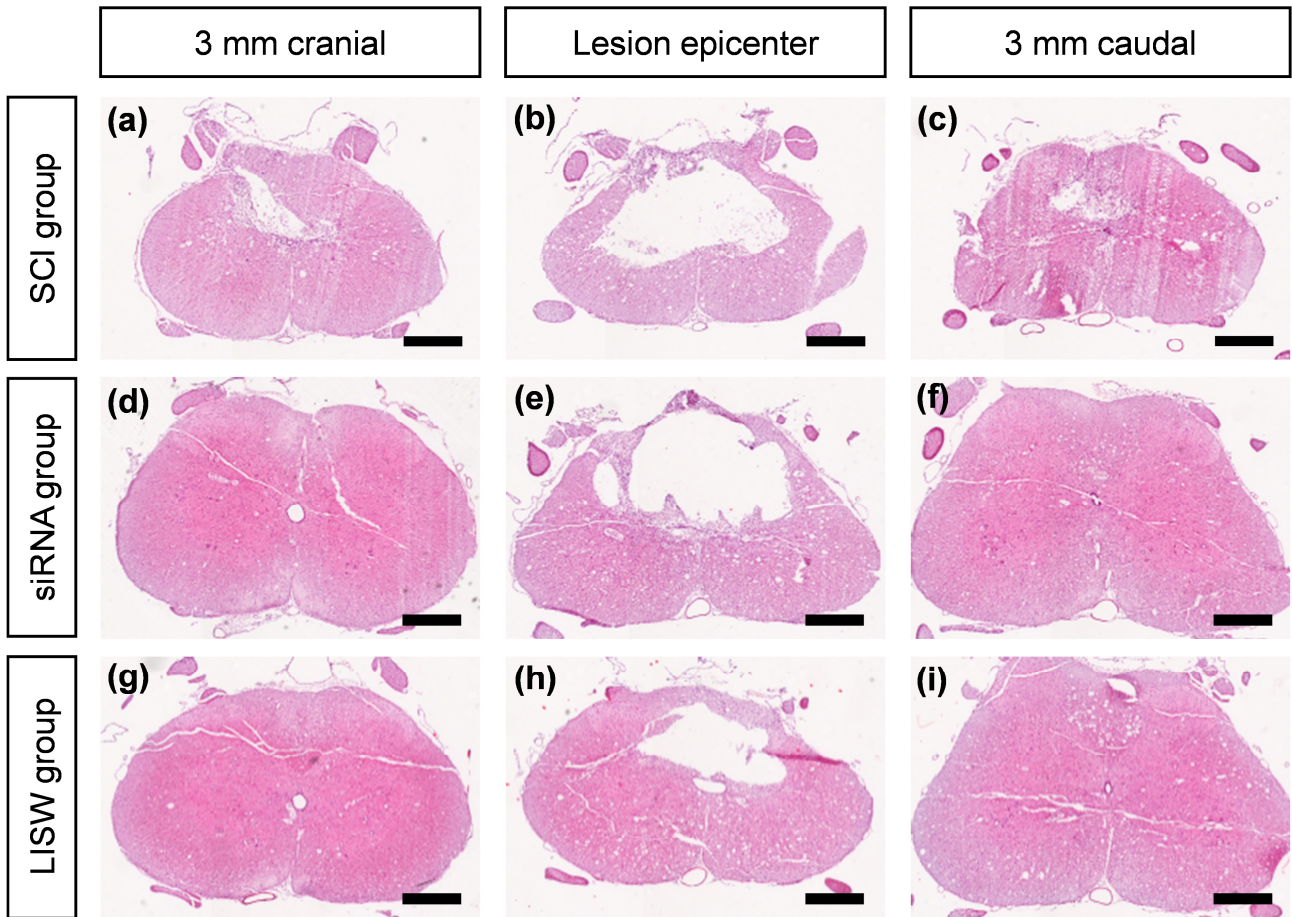


Fig. 4-10 Histological images (HE staining) of axial sections at 21 days after injury for the three groups: (i) SCI group (a, b, c), (ii) siRNA group (d, e, f), and (iii) LISW group (g, h, i). The sections are located at the lesion epicenter (b, e, h) and at 3 mm cranial (a, d, g) and caudal (c, f, i) to the epicenter. The scale bars indicate 500 μ m.

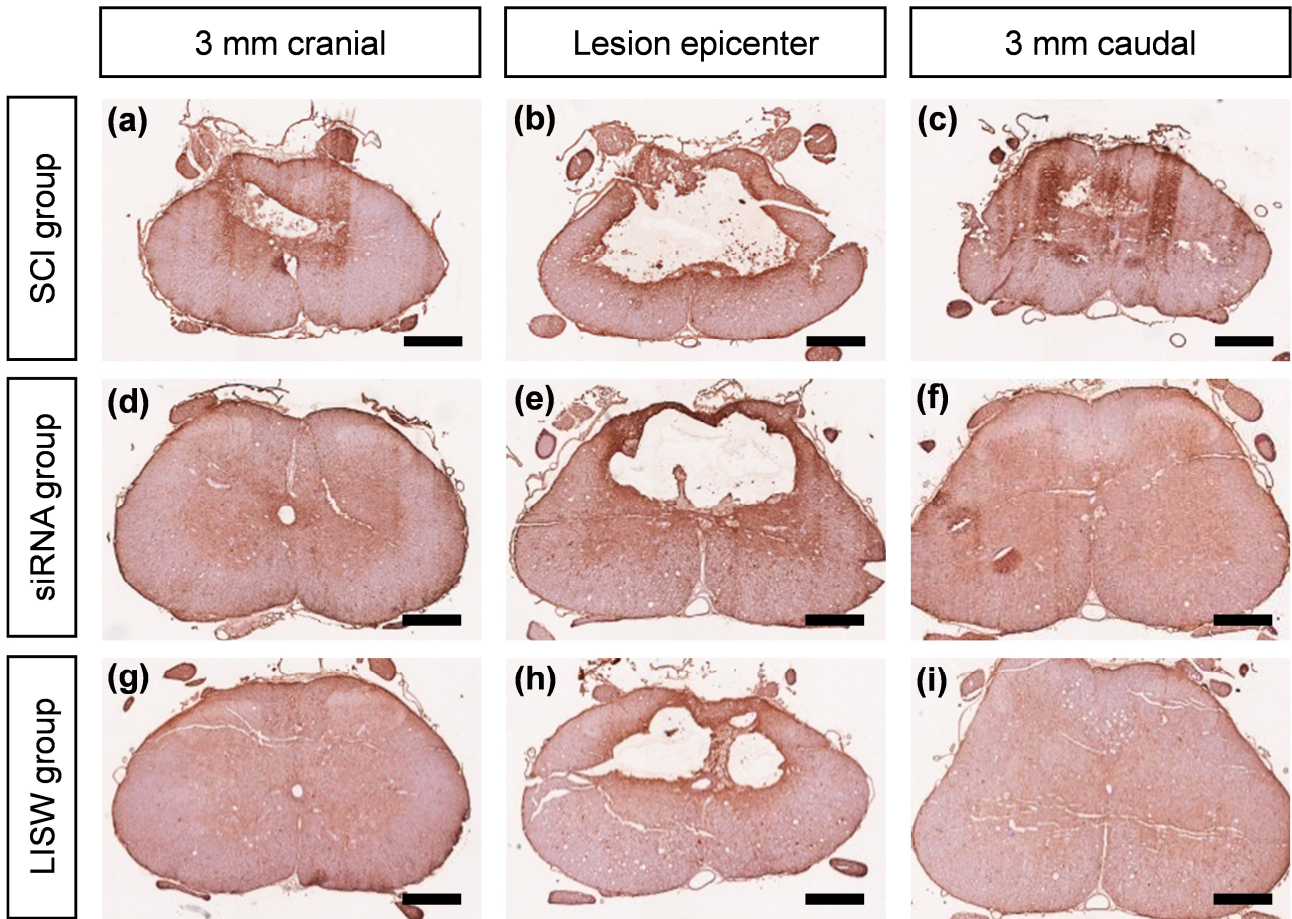


Fig. 4-11 Immunohistological images (GFAP) of axial sections at three weeks after injury for the three groups: (i) SCI group (a, b, c), (ii) siRNA group (d, e, f), and (iii) LISW group (g, h, i). The sections are located at the lesion epicenter (b, e, h) and at 3 mm cranial (a, d, g) and caudal (c, f, i) to the epicenter. The scale bars indicate 500 μm .

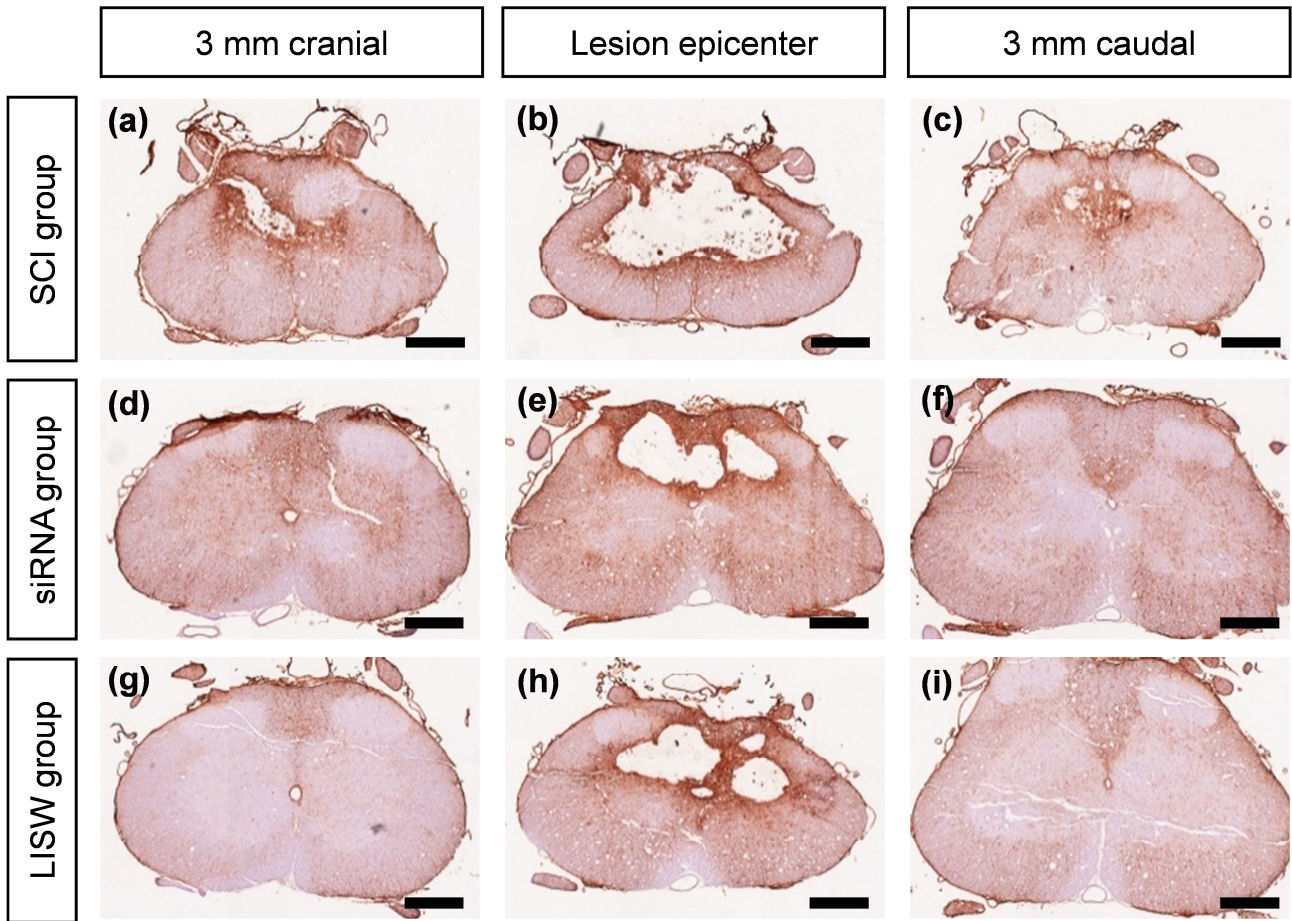


Fig. 4-12 Immunohistological images (GFAP) of axial sections at three weeks after injury for the three groups: (i) SCI group (a, b, c), (ii) siRNA group (d, e, f), and (iii) LISW group (g, h, i). The sections are located at the lesion epicenter (b, e, h) and at 3 mm cranial (a, d, g) and caudal (c, f, i) to the epicenter. The scale bars indicate 500 μm .

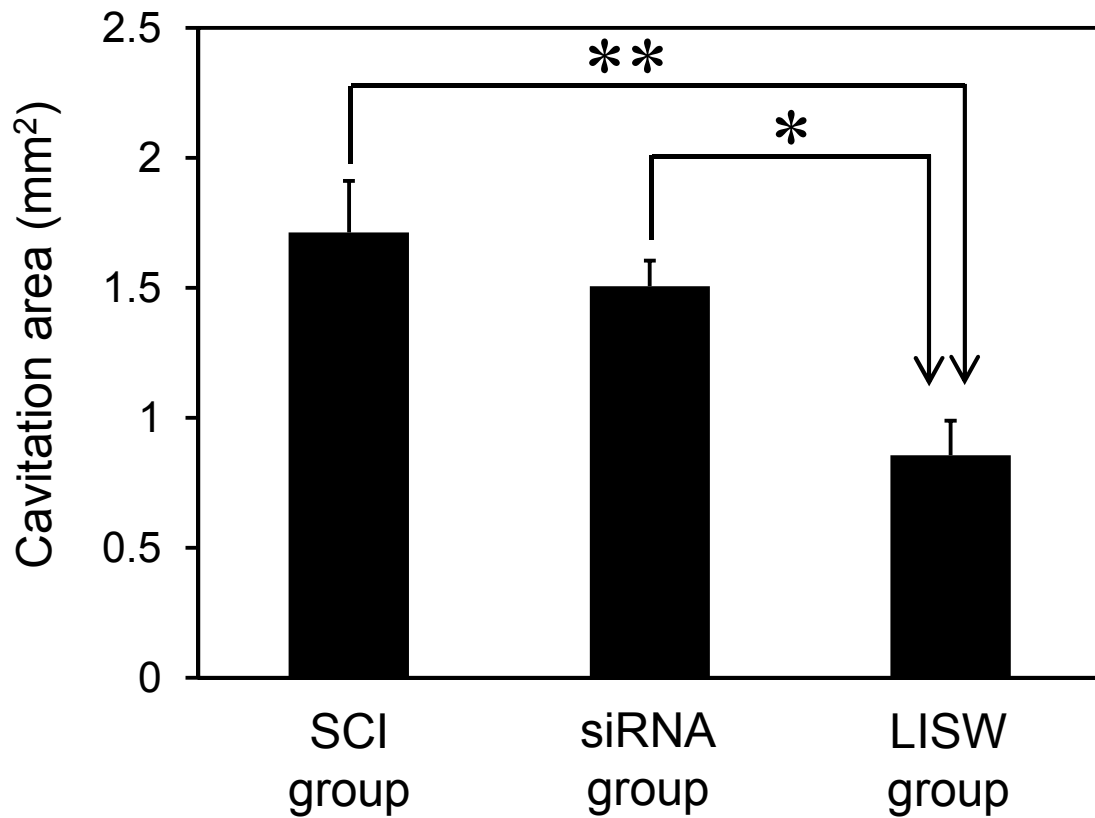
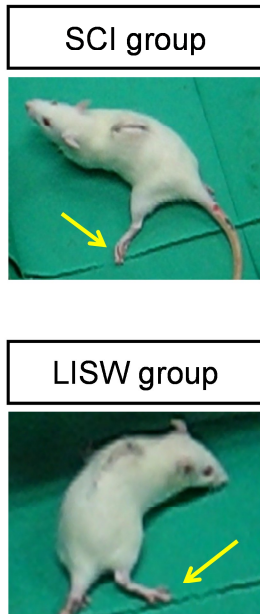


Fig. 4-13 Results of quantitative analysis of the area of cavitory lesions in the spinal cords on the basis of histological images (Fig. 4-9). Values are expressed as means \pm S.E.M (n = 9, each group). The spinal cords of the LISW group showed comparatively smaller glial scars and the cavitation area was significantly reduced compared with those of the SCI group (** $P < 0.01$) and the siRNA group ($*P < 0.05$).

(a)



(b)

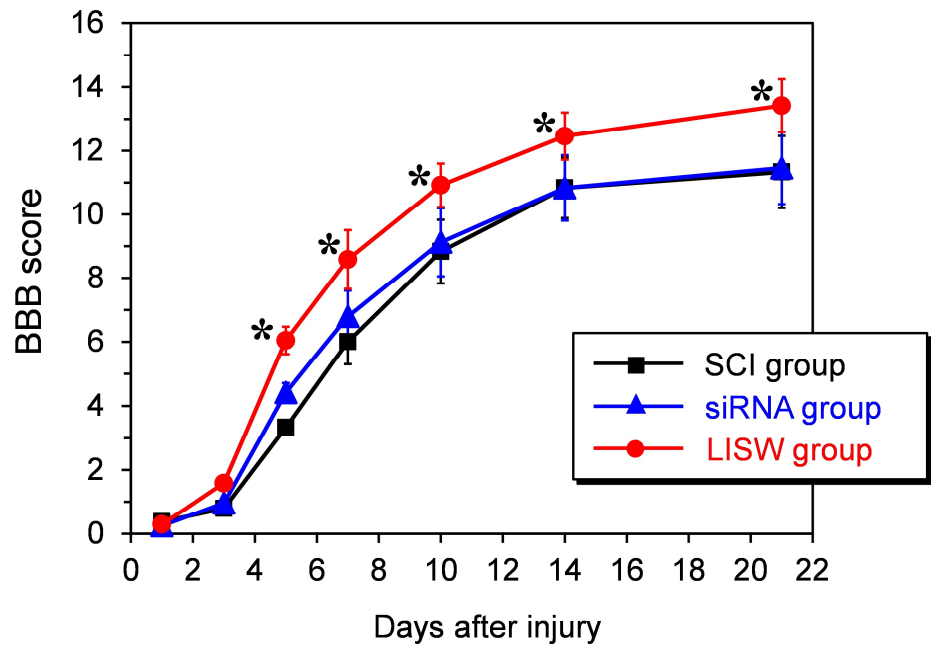


Fig. 4-14 Evaluation of motor functions in the hind limbs on the basis of an open-field test using BBB scale. (a) A rat in the SCI alone group showed a severe hindlimb paralysis at 5 days after operation, almost dragging his hindlimb (arrow). In contrast, a rat of the LISW group showed relatively extensive movements of all three joints of the hind limbs at the same day point (arrow). (b) BBB scores at different time points after SCI. Values are expressed as means \pm S.E.M (n = 12, each group). Asterisks mean significant differences compared with the values in the other two groups ($*P < 0.05$).

第 5 章

光ファイバ式遺伝子導入デバイスの開発とその特性評価

5.1 はじめに

内視鏡的あるいは経カテーテル的遺伝子導入技術の開発は、遺伝子治療学に残された重要課題の一つである。遺伝子治療の根幹技術となる遺伝子導入法にレーザーを用いる利点として、光ファイバと組み合わせた経カテーテル的応用が可能であることが挙げられる。レーザー光の直接照射による細胞への遺伝子導入では、光ファイバで伝送したフェムト秒レーザーパルスを経カテーテル的に培養細胞に照射し、レポーター遺伝子の発現が得られることが複数報告されている[1-3]。例えば、2008年、Tsampoulaらはフッ化水素とフッ化アンモニウム混合溶液を使った化学エッチング法[4]によってファイバ端面を円錐レンズ状に加工し、導光したレーザーを細胞膜上に集光することでチャイニーズハムスター卵巣細胞へのレポーター遺伝子の導入を行っている[1]。2010年には、同グループのMaらが、紫外線硬化ポリマーのマイクロレンズを端面に取り付けた光ファイバと、その周囲にプラスミドDNA溶液を拡散させるマイクロ流体ノズルを組み合わせたプローブ型装置で、より高効率な遺伝子導入ができることを報告している[2]。さらに、2011年、ファイバ端面にその端面を底面とする円錐レンズをアレイ状に配置することで焦点位置が複数になり、広範囲における選択部位の培養細胞に対してレポーター遺伝子導入が達成できることを示している[3]。以上は最近報告された光ファイバを用いた遺伝子導入の研究事例であるが、導入対象はいずれも培養細胞であるため、*in vivo*で応用する場合の装置の操作性と遺伝子導入部位の選択性は不明である。

LISWによる遺伝子導入法では、一回の適用で遺伝子導入できる細胞数が多く、かつ応力波が光よりも高効率に生体内を伝搬するため、*in vivo*において深部組織への適用が可能である。第3章と第4章では、LISWによる遺伝子導入法を用いて、健常ラット脊髄でのレポーター遺伝子の発現と脊髄損傷モデルラットの遺伝子治療効果を実証し、本遺伝子導入技術の有用性を示した。今後、本方法を臨床現場で用いる際、高い操作性を実現するために経カテーテル的遺伝子導入技術が必要になることが想定される。現在、脊椎内視鏡下手術をはじめとする脊椎・脊髄疾患の低侵襲外科手術が広く知られており、柔軟に治療部位を制御できる経カテーテル的遺伝子導入デバイスは、脊髄損傷の遺伝子治療でも必要になると考えられる。本章では、まずLISW発生に必要なナノ秒パルスレーザーの光ファイバ伝送について述べた後、経カテーテル的遺伝子導入デバイスの作製とそれを用いて発生させたLISWの圧力特性を評価する。そして、ラットの皮膚と脊髄を対象としてレポーター遺伝子の導入実験を行い、その発現特性を評価し、経カテーテル的遺伝子導入デバイスとしての有用性を検討する。

5.2 ナノ秒パルスレーザーの光ファイバ伝送

ナノ秒パルスレーザーの光導波には、多関節ミラー方式と光ファイバを利用するものがある。ファイバ材料に対する光吸収率が大きい波長のレーザー(例えば石英と CO₂ レーザ光の組み合わせ)や、高強度のために非線形光学の問題がなければ、より柔軟な操作が可能な光ファイバ方式が医療応用として多く用いられている[5]。最近では撮像用光ファイバもしくは超小型撮像素子、照明用光ファイバとともに、治療・診断のためのレーザー照射用光ファイバを備えた細径内視鏡の開発が進んでいる。そこで、光ファイバ伝送されたレーザー光によって LISW を発生させれば遺伝子導入への応用が可能であり、この方式は臨床現場への適応性も高いと考えられる。

LISW による遺伝子導入法を経カテーテル的に応用するためには、高出力(MW オーダー)のナノ秒パルスレーザーの光ファイバ伝送が必要となる。しかし、ピークパワーが数 MW 以上のパルス光を石英ガラスファイバに入射すると、非線形光学効果の自己集束および多光子吸収によりファイバのコアが損傷するため、高出力ナノ秒パルスレーザーの光伝送は容易でない[6-10]。例えば Sano らは、レンズアレイによって分割したレーザービームを異なる焦点でファイバ内に入射する光学系を用いて、コア径 0.6 mm の SI 型マルチモード石英ファイバに対し、入射エネルギー 27.9 mJ/pulse の Q スイッチ・Nd:YAG レーザの第 2 高調波(波長 532 nm, パルス幅 5 ns, 繰り返し周波数 10 Hz)を伝送できることを報告している[11-13]。また、石英ファイバではないが、Miyagi らの研究グループでは、内径 1 mm, 長さ 1 m の環状オレフィンポリマー(cyclic olefin polymer, COP)を内装した中空ファイバにより、パルスエネルギー 75 mJ, パルス幅 13 ns (ピークパワー約 6 MW に相当)の Nd:YAG レーザ基本波(1.06 μm)を、ファイバの損傷なく伝送できたと報告している[14-16]。

LISW を用いた遺伝子導入においては、プラズマ発生に必要なエネルギーを伝送した上で、そのプラズマ膨張を空間的に閉じ込めることで高圧力を発生できる(2.5.2 項を参照)。そこで、本実験では特殊な光学系を用いなくとも、ターゲットの選定によって遺伝子導入を達成しうる圧力特性が得られると考え、光通信用の石英ファイバを用い、ナノ秒パルスレーザー光を安定伝送できる最大強度および出射角について調べた。以下の実験ではステップインデックス(step index, SI)型のファイバを用いた。理由は、グレーデッドインデックス(graded index, GI)型では一般的にコア材料にゲルマニウムを添加しており、純粋石英の SI 型の方が耐光強度が高いためである[17]。

5.2.1 実験方法

Figure 5-1 に実験構成図を示す. 光源には Q スイッチ・Nd:YAG レーザ(HOYA Continuum, Surelite I)の第 2 高調波(波長 532 nm, パルス幅 6 ns)を用いた. レーザ光の伝送に用いるファイバには, 長さ 1 m の SI 型マルチモード石英ファイバ(コア径 1 mm, コーティング径 1.4 mm, 開口数 0.39, FT-1.0-UMT, THORLABS)を用いた. この光ファイバは, 経カテーテル的応用を目的とするため, ナノ秒レーザー光を伝送可能で, コア径ができるだけ細く曲げ強度の高いものを選定した. さらに入射光エネルギーの結合損失を小さくするため, ファイバの開口数は大きく, 焦点距離の長いレンズ($f=400$ mm)を併せて選定した. レーザからの出射光を $f=400$ mm の平凸レンズで集光した場合, レーザエネルギーが 50 mJ を越えても空中での光学的絶縁破壊は生じなかった. ファイバ内での集光を避けるため, レーザパルス焦点より後方の位置(平凸レンズから光ファイバ端面までの距離は約 45 cm)において光ファイバに結合した. 入射パルスエネルギーは可変アッテネータを用いて変化させた. 各入射パルスエネルギーにおいて 5 パルス平均の出射パルスエネルギーを 3 回ずつ測定した. 計測はファイバが直線状の場合(Fig. 5-1 (a))と曲げ角度 270° (曲率半径 12~15 cm) (Fig. 5-1 (b))の場合の 2 通りで行った. また, 伝送レーザー光の出射角を計測するため, ファイバ端から距離 0, 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14 mm の位置に, 出射軸に対して垂直面になるようバーンペーパー(Polaroid 667)を配置し, レーザのビームパターンを取得した(ファイバは直線状).

5.2.2 結果と考察

光ファイバを直線状または曲げて配置したときの入出力エネルギー特性を Figure 5-2 に示す. 入射パルスエネルギーが約 15 mJ まで, ファイバの破損と出力エネルギーの低下は見られなかった. ファイバが直線状の場合, 入射エネルギーに対する出射エネルギーの割合(伝送効率)は 84.5%から 88.7%であり, 平均値は 86.7%であった. 一方, 曲げ角度 270° (曲率半径 12~15 cm)の場合, 伝送効率は 82.9%から 86.1%であり, 平均値は 84.7%であった. 曲げた場合の伝送効率の若干の低下は, 放射損失(コアとクラッドとの境界面への光の入射角が変化し, 臨界角以上の光が放射することにより生ずる損失)によるものと考えられる. 曲げ状態の場合, 入射パルスエネルギーを 17.1 mJ としたときに 1 パルスで入射端面より数 cm 内部でファイバの破損が生じ, 2 パルス目以降の出射エネルギーは次第に減弱した. このとき伝送効率は 77.3%まで低下した.

本実験で用いた光ファイバのコア径は 1 mm であり、レーザの入射エネルギーが 17.1 mJ のとき入射端面のレーザ強度は 0.36 GW/cm^2 である(ピークパワーは 2.85 MW). 光ファイバの損傷が入射端から 2 ~ 3 cm 内部(コア内)に見られたのは、入射光がコア内部で自己集束し、レーザ強度が入射端面の強度よりも大きくなったためと考えられる. 安定なエネルギー伝送には 17.1 mJ 未満のパルスレーザエネルギーで入射する必要があることがわかった. しかし、損傷閾値はファイバ端面の傷や汚れなどによって変化するため、より低いパルスエネルギーを用いることが望ましい.

Figure 5-3 に、ファイバ端からの出射されたレーザ(平均エネルギーは 3.7 mJ)のビームパターンとそれより求めたビーム直径の出射端からの距離依存性を示す. ファイバ端面から出射直後(0 mm)のビーム直径はコア径と同じ 1 mm であったが、10 mm でビーム直径は 2 mm であった. グラフの直線は一次関数で近似したものである. 例えばファイバ端から出射されたパルスエネルギーが 10 mJ の場合、スポット径 1 mm (ファイバ端面)でフルエンス 1.3 J/cm^2 、スポット径 2 mm (ファイバ端からの距離 10 mm)でフルエンス 0.3 J/cm^2 となる.

5.3 光ファイバ式遺伝子導入デバイスの開発と特性評価

LISW による遺伝子導入法を、光ファイバを用いて経カテーテル的に応用するためには、光ファイバの先端に光吸収体を配置する必要がある. 光ファイバの先端で応力波を発生する方法としては、ファイバ端に光吸収体を付着させる方法がこれまでに報告されている. Nose らは、石英ファイバ(外径 1 mm)を用いて伝送した波長 1064 nm の Q スイッチ・Nd:YAG レーザ光(パルス幅 12 ns)を出射端面に付着させたアルミニウム粒子に吸収させることで数百 MPa の圧力が発生できることを報告している[18]. また、Ho:YAG レーザ光(波長 2.1 μm , パルス幅 350 μs)の水に対する吸収率が高いことを利用して、そのレーザ照射で発生する気泡を駆動源とする液体ジェット流および応力波の発生装置(光ファイバ式デバイス)が開発されている[19-27]. 血栓破碎および組織切開への応用として、東北大学病院を中心に神経腫瘍、脳内出血をはじめとする臨床応用が行われている. しかし、プラズマ発生は伴わず、発生する応力波は水のアブレーションによって発生する気泡の膨張力によるため、得られる圧力は本研究の目的である遺伝子導入が達成しうる特性として十分ではない. 例えば、ファイバ端からの出射レーザパルスのエネルギーが 400 mJ 以上でも、ピーク圧力は数百 kPa 程度と低い[26]. そのため、アブレーションによって発生する気泡の出射口を小さくすることで高い圧力を得る工夫がなされている[27]. 本実験では、5.2 項で述べた、光ファイバを用いて伝送されたナノ秒レーザ光を用いて、LISW を発生するデバイスを次の通り作

製した。

5.3.1 実験方法

パイレックス細管の一端に光吸収体を熱収縮チューブで固定し、同細管の他端よりファイバを挿入する構造のデバイスを作製した(Fig. 5-4)。光吸収体としては、第2章で述べたのと同じ、厚さ 0.5 mm の黒色天然ゴム板を使用した。同ゴム板にプラズマ閉じ込め用の透明ポリエチレンテレフタレート(PET, 厚さ 1.0 mm)をアクリル樹脂用接着剤で接着した。Figure 5-4 (b)と(c)に示すように、PET シート(PET disk)の有無にかかわらず、先端部の最大外径は 2.7 mm である。このサイズは一般消化器内視鏡のルーメンに適用可能な太さ(< 3 mm)である。このデバイスを用いて発生させた LISW を以下、光ファイバ式 LISW と呼ぶ。

光ファイバ式 LISW の発生方法は、5.2.1 項と同様に、Q スイッチ・Nd:YAG レーザ(HOYA Continuum, Surelite I)の第2高調波(波長 532 nm, パルス幅 6 ns)を、平凸レンズ($f=400$ mm)を用いて SI 型マルチモード石英ファイバ(コア径 1 mm, コーティング径 1.4 mm, 開口数 0.39, FT-1.0-UMT, THORLABS)に結合し、出射端に上述のデバイスを取り付けた。このときの光ファイバの長さは 1 m, 曲げ角度 270° (曲率半径 12~15 cm)とした。

光ファイバ式 LISW の圧力時間特性の測定方法は、2.4.3 項で述べたのと同様である。ハイドロフォンの検出面に超音波ゼリー(Echo Jelly, アロカ)を介して上述のデバイスのターゲット(ゴム板)下面を接触させ、ファイバ伝送されたパルスレーザー光を照射して LISW を発生させた。黒色ゴム表面におけるレーザースポット径は 1 mm とした。光ファイバの損傷閾値(パルスエネルギー約 17 mJ)より十分低く、光吸収体表面でのレーザー生成プラズマを引き起こせる条件(2.5.1 項よりフルエンス 0.3 J/cm^2 以上)として、フルエンス 0.5 J/cm^2 と 1.0 J/cm^2 (パルスエネルギーはそれぞれ 3.9 mJ と 7.9 mJ)を選定した。また、同一ターゲットへの繰り返しレーザー照射で圧力特性がどう変化するかを調査するため、同一ターゲットを用い、1, 2, 5, 10 パルス目の LISW の圧力時間特性を測定した。本計測においてパルスとパルスの時間間隔は約 15 秒としたが、短縮可能である。2.4.3 項と同様に、LISW の圧力特性の指標となるピーク圧力、圧力上昇速度、圧力積分値を求めた。

次に、2.4.4 項と同様にシャドウグラフ法を用いて、光ファイバ式 LISW の波面の可視化を行った。実験装置図を Figure 5-5 に示す。皮膚、筋肉、脊髄などの軟組織の音響ファントムとして 25°C の純水(音響インピーダンス $1.5 \times 10^6 \text{ Ns/m}^3$ [28])を用いた。照明用の光源には、ローダミン 6G に Q スイッチ・Nd:YAG レーザ(Brilliant b, Quantel)の第2高調波(波長 532 nm, パルス幅 6 ns)を平凸レンズ($f=20$ mm)で集光照射して発生させた点光源を用いた。

点光源からの光を平凸レンズ($f=150\text{ mm}$)によって平行光にした後、外寸法 $10\text{ cm}\times 10\text{ cm}\times 10\text{ cm}$ (壁厚 2 mm)の亚克力製水槽内を透過させ、さらに平凸レンズ($f=150\text{ mm}$)で集光し、高速度カメラ(FASTCAM SA3 model 120K-M2, フォトロン)で撮影した。パルス遅延器(DG535, 東京インスツルメンツ)を用い、LISW 発生のためのレーザと照明用レーザに $3\text{ }\mu\text{s}$ のパルス遅延を発生させ、光ファイバ式 LISW の波面の形状を撮影した。

5.3.2 結果と考察

Figure 5-6 に光ファイバ式 LISW の圧力時間波形を示す。(a)は PET シートなし、フルエンス 1.0 J/cm^2 で発生させた光ファイバ式 LISW の 1, 2, 5, 10 パルス目の圧力時間波形である。(b)と(c)は PET シートありで、それぞれフルエンス 0.5 J/cm^2 と 1.0 J/cm^2 で発生させた光ファイバ式 LISW の 1, 2, 5, 10 パルス目の圧力時間波形である。ピーク圧力、圧力上昇速度、および圧力積分値のパルス数依存性を Figure 5-7 に示す。PET シートなしの場合(フルエンス 1.0 J/cm^2)、ピーク圧力は 1 パルス目 14.9 MPa 、10 パルス目 6.9 MPa であり、圧力積分値は 1 パルス目 $0.83\text{ Pa}\cdot\text{s}$ 、10 パルス目 $0.33\text{ Pa}\cdot\text{s}$ であった。後述の PET シートありの場合と比べると、複数パルス照射時の圧力の低下は小さい。しかし 1 パルス目でもピーク圧力は 15 MPa 程度と低い値であった。これは、ファイバ端面とターゲットのゴムシートを接着、あるいはファイバ端面によるゴムの押圧をしていないことから、プラズマ閉じ込め効果を果たさず、ピーク圧力が小さくなっていると考えられる。PET シートありの場合、フルエンス 1.0 J/cm^2 のとき、ピーク圧力は 1 パルス目 48.5 MPa 、10 パルス目 8.6 MPa であった。この減少は 2 パルス目以降ではレーザターゲットの黒色ゴムと PET シートが剥離してプラズマ閉じ込め効果が減弱するためと考えられる。LISW による遺伝子導入法では、第 3 章でも述べたように、ピーク圧力、圧力の時間積分値、圧力上昇速度が遺伝子導入効率に關与する[29-36]。これらの圧力特性のパルス依存性を見ると、ピーク圧力に比べて圧力の時間積分値は緩やかに減少していくことがわかる。圧力積分値は 1 パルス目 $5.3\text{ Pa}\cdot\text{s}$ 、10 パルス目 $2.5\text{ Pa}\cdot\text{s}$ であった。そのため、複数パルス照射でも遺伝子導入に寄与する可能性が考えられる。この結果に基づき、次項の遺伝子導入実験では、10 パルスまでの光ファイバ式 LISW の適用を 1 セッションとして、ターゲットを交換することとした。

Figure 5-8 に光ファイバ式 LISW の波面を可視化した画像を示す。幾何的な拡がりを伴っているものの、ターゲット直下では明瞭な波面が観察され、一定の指向性を有しながら伝搬していることがわかった。これより、第 2 章と第 3 章で述べたことと同様に、光ファイバ式 LISW も、生体深部に対して部位選択的に作用させることができると考えられる。し

かし、コア径(スポット径)が小さいほど LISW の拡がり減衰は大きくなるため、遺伝子導入の目標深度によってはスポット径をより広く設定する必要がある。

5.4 光ファイバ式遺伝子導入デバイスを用いた遺伝子導入実験

5.4.1 実験方法

5.3 節で述べたデバイスを用いて、遺伝子導入のテストベッド(test tissue)としてラット皮膚を対象にレポーター遺伝子の導入実験を行い、光ファイバ式 LISW による遺伝子導入の発現特性を評価した。次に、脊髄への標的遺伝子導入が可能であるかを調べるため、健常ラット脊髄を対象に光ファイバ式 LISW によるレポーター遺伝子の導入実験を行った。

5.4.1.1 ラット皮膚への遺伝子導入実験

光ファイバ式 LISW による遺伝子導入の発現特性を評価するため、ラット皮膚を対象にルシフェラーゼもしくはEGFP発現遺伝子をコードしたプラスミドDNAの導入実験を行った。ここで用いたプラスミドDNAの詳細は3.4.1項で述べた通りである。遺伝子導入対象としてSprague-Dawleyラット(日本エスエルシー、オス、体重330~380g)を用いた。麻酔としてペントバルビタール50mg/kgを腹腔内投与し、背部を剃毛、除毛した。27ゲージの注射針を装着したマイクロシリンジを用いて、プラスミドDNA溶液を皮内に注入した。このときルシフェラーゼとEGFP発現遺伝子の濃度と注入量はそれぞれ1.0µg/µl, 10µl, および2.0µg/µl, 20µlとした。その上部に、5.3.1項で述べたデバイスを用いて光ファイバ式 LISW を適用した(Fig. 5-9)。このとき、黒色天然ゴム下面と皮膚表面の間には音響結合剤として超音波ゼリー(Echo Jelly, アロカ)を塗布した。レーザフルエンスは1.0J/cm²で一定とし、10パルスの照射(1セッション)ごとにターゲットを交換した。

ルシフェラーゼ発現遺伝子の導入実験では、光ファイバ式 LISW を、(i)PETシートなし、3セッション、(ii)PETシートあり、1セッション、(iii)PETシートあり、3セッションの3条件で適用した。これらの3条件は、PETシートの有無およびセッション数での発現レベルの違いを調査するために選定した。遺伝子発現レベルの定量評価には、ルシフェラーゼアッセイキット(E1500, Promega)を用いた。遺伝子導入から24時間後、直径5mmの生検トレパンにより皮膚組織を採取し、あらかじめ1.5mlチューブに用意された1000µlの細胞溶解液に浸し、剪刀によって細かく切断、均一化した。この遺伝子発現の評価時間(24

時間後)は、これまで報告されている LISW を用いた皮膚組織への遺伝子導入実験の結果に基づき決定した[33, 36, 37]. 同サンプルを遠心(150×100 rpm, 15 分)した後、上澄み 20 μ l を 5 ml ラウンドチューブに移し、100 μ l のルシフェリンを滴下した. 攪拌後、ルミノメータにて、10 秒間の化学発光量をルシフェラーゼ活性として測定した. プラスミド DNA 注入のみ(Control 群)と上述した 3 条件の光ファイバ式 LISW 適用群の計 4 条件につき、それぞれラット 8 匹を対象に実験を行った. データはクラスカル・ウォリス(Kruskal-Wallis)検定による比較を行い、多重比較にはシェッフェ(Scheffe)の方法を用いた. $P < 0.05$ を統計学的に有意であるとした.

EGFP 発現遺伝子の導入実験では、上述のプラスミド DNA 溶液の注入部位に、レーザーフルエンス 1.0 J/cm², PET シートあり、3 セッションの光ファイバ式 LISW を 1 箇所または 2 箇所適用した. 遺伝子導入から 24 時間後、ペントバルビタール 50 mg/kg の腹腔内投与による麻酔下に、直径 8 mm の生検トレパンを用いて皮膚組織を採取した. 自家蛍光を発する角質をテープストリッピングにより剥離し、4%パラホルムアルデヒドリン酸緩衝溶液中で約 16 時間組織固定を行った. 固定後、蛍光顕微鏡(Axiovert 200, Carl Zeiss)を用いて、皮膚上面より波長 465 ~ 505 nm で励起し、波長 515 ~ 565 nm のバンドパスフィルタを挿入して EGFP の蛍光分布を観察した.

5.4.1.2 健常ラット脊髄への遺伝子導入実験

Sprague-Dawley ラット(日本エスエルシー, メス, 体重 240 ~ 280 g)を対象に、光ファイバ式 LISW による健常ラット脊髄への遺伝子導入実験を行った. ペントバルビタール 50 mg/kg の腹腔内投与による麻酔下に、第 10 胸椎の椎弓切除を施し、胸髄硬膜を露出させた. 固定台を用いて、胸髄硬膜を露出したラットおよび 27 ゲージの注射針を装着したマイクロシリンジを固定した. マイクロシリンジは、ラット前頭面に対して垂直な方向から、下位の脊髄が走行する方向に対して 10° 傾斜させ、正中からの左に距離 1 mm, 硬膜からの深さ 2 mm の脊髄実質に刺入し、EGFP 発現遺伝子のプラスミド DNA 溶液(濃度 5.0 μ g/ μ l)を 10 μ l 注入した. 注入速度は、髄内の液圧(動圧)が過度に上昇するのを防ぐために 5 μ l/min 未満とした. 光ファイバ式 LISW の適用方法は先述のラット皮膚の場合と同様とし、プラスミド DNA 溶液を注入した胸髄の硬膜上に光ファイバ式 LISW (レーザーフルエンス 1.0 J/cm², PET シートあり、3 セッション)を適用した.

遺伝子導入から 48 時間後、ペントバルビタール 50 mg/kg の腹腔内投与による麻酔下に、4%パラホルムアルデヒドリン酸緩衝溶液(200 ml)による灌流固定を行った. 灌流固定後、

椎弓切除部分(遺伝子導入の標的部位である第10胸椎下)の組織を中心に長さ約10 mmの脊髄を切り出し、灌流固定時と同じ組織固定液で後固定を約16時間行った。固定後、ラット皮膚の場合と同様に、EGFPの蛍光分布を観察した。

5.4.2 結果と考察

ラット皮膚へのルシフェラーゼ発現遺伝子の導入実験の結果を Figure 5-10 に示す。PETシートなし、3セッションのときのルシフェラーゼ活性は、非適用群(プラスミド DNA 注入のみでレーザー照射なし)のときと比べて約11.7倍増大していることがわかった($P < 0.05$)。PETシートありの場合、1セッションのときのルシフェラーゼ活性は非適用群に対して統計学的な有意差がなかったものの、3セッション適用時には、非適用群に比して約20.9倍のルシフェラーゼ活性が得られた($P < 0.01$)。5.3.2項で述べた結果より、PETシートなしとありでは、ピーク圧力は1パルス目にそれぞれ14.9 MPaと48.5 MPaであった。よって、ピーク圧力が小さいPETシートなしの場合でも、3セッション適用すれば、1セッションのPETありの場合よりも高いルシフェラーゼ活性が得られていることがわかる。遺伝子発現効率がレーザーパルス数に依存することは、3.6.1項の健常ラット脊髄に対するEGFP発現遺伝子の導入実験でも観察されていた。同様に、LISWによる遺伝子導入法では、*in vitro*, *in vivo*によらず他の報告でも同様に遺伝子発現レベルのパルス数依存性が報告されている[23, 24, 26]。これは、3.6.1項の考察で述べたのと同様に、先発のLISW適用で細胞膜の透過性亢進性が上がった状態で、後発のLISWによってプラスミド DNA 溶液に流速が生じて細胞内に取り込まれるプラスミド DNA の数が増えるためと考えられる。この点は、今後詳細な検討が必要である。以下のEGFP発現遺伝子の導入実験では、上述の結果に基づき、最も高いルシフェラーゼ活性が得られたPETシートあり、3セッションの光ファイバ式LISWを適用している。

Figure 5-11 にラット皮膚におけるEGFPの発現分布を示す。皮膚表面を直上から見たときの写真であり、緑色蛍光がEGFPの発現を示している。光ファイバ式LISWの適用部位が1箇所の場合(Fig. 5-11 (a))と2箇所の場合(Fig. 5-11 (b))で、遺伝子発現部位はどちらもLISWを適用した直径約1 mmの円形の領域内に限定されていた。これは、Figure 5-9の波面の可視化実験結果でも示した通り、面波源(直径1 mm)で発生させた光ファイバ式LISWが一定の指向性を有しながら圧力を作用させることができたためと考えられる。Figure 5-11 (b)では、およそ1 mm程度離れた2点でそれぞれ緑色蛍光が観察され、遺伝子導入部位を精密に制御できていることを示した。生体組織を対象として、約1 mmの間隔で遺伝子発

現部位を選択的に得られる遺伝子導入技術は、著者の知る限りで現在までに報告されていない。これより、本方法を用いることで今までの *in vivo* 遺伝子導入技術にない部位選択的な遺伝子導入が可能であることがわかった。

Figure 5-12 に健常ラット脊髄における EGFP の発現分布を示す。背景光の蛍光強度が高いものの、光ファイバ式 LISW を適用した部位(おおよそ破線で囲まれた部位)の中で EGFP 由来の緑色蛍光が観察された。EGFP の発現は、LISW 適用部位の周辺にも点在して見られた。これは、遺伝子導入から 48 時間の間に起きた細胞移動、または 3.5.2 項で述べたのと同様に、発現した EGFP が脳脊髄液中に流出しているためと考えられる。脊髄を対象とした遺伝子導入の報告の中で、部位選択的な遺伝子発現が得られているのは超音波を用いた方法である[38, 39]。マイクロバブルを併用した超音波法によるラット脊髄へのレポーター遺伝子の導入実験では、直径 5 mm のプローブを直接脊髄に接触させ、照射部位周辺の髄膜細胞での遺伝子発現を得ている[38]。本実験で用いた光ファイバ式遺伝子導入デバイスの最大外径は 2.7 mm (LISW の発生源は直径 1 mm)であり、部位選択性に加え、従来技術では実現されていない細径化された遺伝子導入装置と言える。実用上、このサイズは一般消化器内視鏡のルーメンに適用可能な太さであり、他の内視鏡イメージング装置との組み合わせとしても応用できる潜在的能力がある。

第 4 章で述べた脊髄損傷モデルラットの遺伝子治療では、スポット径が 3 mm、フルエンスが 0.3 J/cm^2 (パルスエネルギー 21 mJ) の LISW をラットの脊髄に適用した。LISW の発生スポット径は、ファイバ端からターゲットまでの距離を変化させることで調節できるが、遺伝子導入に必要とされる圧力特性を得るためには伝送可能なパルスエネルギーが高い方が望ましい。仮に、ヒト脊髄(実質の太さは 10~15mm)への適用を想定してスポット径が 5 mm、フルエンスが 0.3 J/cm^2 の LISW をファイバ出射端付近で発生させる場合、伝送するパルスエネルギーは 59 mJ となる。本実験で用いた光ファイバの伝送特性からは、このパルスエネルギーを伝送することは難しく、ナノ秒レーザーパルスのファイバ伝送技術の改善(これまでの研究例は 5.2 項を参照)が臨床応用に向けて必要となると考えられる。

5.5 まとめ

LISW を用いた遺伝子導入法では、光ファイバを用いた経カテーテル的または内視鏡的な遺伝子治療への応用が期待される。本章では、LISW を発生させるための最大外径 2.7 mm のプローブ型デバイスを作製し、光ファイバ式 LISW によるレポーター遺伝子の導入を試み、遺伝子導入デバイスとしての有用性について検討した。その結果、遺伝子導入の達成

に必要とされる圧力特性，および遺伝子発現部位の標的性が得られることがわかった．遺伝子導入効率と操作性を上げるために，光ファイバの伝送エネルギーを上げること(例えば中空ファイバの利用など)，プローブの交換を簡単にする工夫等が今後は必要であるが，遺伝子導入デバイスとしての有効性は示せたと言える．現在，脊椎内視鏡下手術をはじめとする脊椎および脊髄の疾患の低侵襲外科手術が一般的になり始め，柔軟に治療部位を制御できる経カテーテル的遺伝子導入デバイスは，脊髄損傷の遺伝子治療でも必要になることが想定される．そのため，本章で述べた経カテーテル的遺伝子導入デバイスの開発は，LISWによる遺伝子導入法を用いた脊髄損傷の遺伝子治療の臨床現場における実現に向けた breakthrough である．

参考文献 第5章

- [1] X. Tsampoula, K. Taguchi, T. Cizmár, V. Garces-Chavez, N. Ma, S. Mohanty, K. Mohanty, F. Gunn-Moore, K. Dholakia, “Fibre based cellular transfection,” *Opt. Express* **16**(21), pp. 17007-17013 (2008).
- [2] N. Ma, P. C. Ashok, D. J. Stevenson, F. J. Gunn-Moore, K. Dholakia, “Integrated optical transfection system using a microlens fiber combined with microfluidic gene delivery,” *Biomed. Opt. Express* **1**(2), pp. 694-705 (2010).
- [3] N. Ma, F. Gunn-Moore, K. Dholakia, “Optical transfection using an endoscope-like system,” *J. Biomed. Opt.* **16**(2), pp. 028002/1-7 (2011).
- [4] S. K. Eah, W. Jhe, Y. Arakawa, “Nearly diffraction-limited focusing of a fiber axicon microlens,” *Rev. Sci. Instrum.* **74**(11), pp. 4969-4971 (2003).
- [5] (財)医療機器センター, 医療機器の基礎知識・第2版 (薬事日報社, 2008)
- [6] S. W. Allison, G. T. Gillies, D. W. Magnuson, T. S. Pagano, “Pulsed laser damage to optical fibers,” *Appl. Opt.* **24**(19), pp. 3140-3145 (1985).
- [7] W. H. Trott, K. D. Meeks, “High-power Nd:glass laser transmission through optical fibers and its use in acceleration of thin foil targets,” *J. Appl. Phys.* **67**(7), pp. 3297-3301 (1990).
- [8] B. Richou, I. Schertz, I. Gobin, J. Richou, “Delivery of 10-MW Nd:YAG laser pulses by large-core optical fibers: dependence of the laser-intensity profile on beam propagation,” *Appl. Opt.* **36**(7), pp. 1610-1614 (1997).
- [9] 金沢祐孝, “Nd:YAG レーザー光のファイバによる伝送技術”, *レーザー研究* **27**(3), pp. 151-155 (1999).
- [10] C. H. Fan, J. P. Longtin, “Modeling optical breakdown in dielectrics during ultrafast laser processing,” *Appl. Opt.* **40**(18), pp. 3124-3131 (2001).
- [11] 依田正樹, 佐野雄二, 向井成彦, T. Schmidt-Uhlig, G. Marowsky, “光ファイバによる 20 MW レーザーパルスの伝送とその応用,” *レーザー研究* **28**(5), pp. 309-313 (2000).
- [12] T. Schmidt-Uhlig, P. Karlitschek, M. Yoda, Y. Sano, G. Marowsky, “Laser shock processing with 20 MW laser pulses delivered by optical fibers,” *Eur. Phys. J. Appl. Phys.* **9**, pp. 235-238 (2000).
- [13] T. Schmidt-Uhlig, P. Karlitschek, G. Marowsky, Y. Sano, “New simplified coupling scheme for the delivery of 20 MW Nd:YAG laser pulses by large core optical fibers,” *Appl. Phys. B* **72**(2), pp. 183-186 (2001).

- [14] Y. Matsuura, K. Hanamoto, S. Sato, M. Miyagi, "Hollow-fiber delivery of high-power pulsed Nd:YAG laser light," *Opt. Lett.* **23**(23), pp. 1858-1860 (1998).
- [15] 松浦祐司, 宮城光信, "中空ファイバによるレーザー光伝送," *レーザー研究* **27**(3), pp. 173-177 (1999).
- [16] S. Sato, H. Ashida, T. Arai, Y. W. Shi, Y. Matsuura, M. Miyagi, "Vacuum-cored hollow waveguide for transmission of high-energy, nanosecond Nd:YAG laser pulses and its application to biological tissue ablation," *Opt. Lett.* **25**(1), pp. 49-51 (2000).
- [17] 佐竹武史, 林徳治, 石英ファイバによる YAG レーザエネルギーの伝送とその評価, レーザ加工機の最新技術 (レーザー熱加工研究会編, 1991).
- [18] H. Nose, H. Maeda, N. Yamamoto, M. Nakahara, "Effect of optical fiber output surface of laser induced shock wave and its application," *Jpn. J. Appl. Phys.* **43**(9A), pp. 6145-6151 (2004).
- [19] T. Asshauer, K. Rink, G. Delacretaz, "Acoustic transient generation by holmium-laser-induced cavitation bubbles," *J. Appl. Phys.* **76**(9), pp. 5007-5013 (1994).
- [20] T. Asshauer, G. Delacretaz, E. D. Jansen, A. J. Welch, M. Frenz, "Pulsed holmium laser ablation of tissue phantoms: Correlation between bubble formation and acoustic transients," *Appl. Phys. B* **65**(4-5), pp. 647-657 (1997).
- [21] T. Hirano, M. Komatsu, T. Saeki, H. Uenohara, A. Takahashi, K. Takayama, T. Yoshimoto, "Enhancement of fibrinolytics with a laser-induced liquid jet," *Lasers Surg. Med.* **29**(4), pp. 360-368 (2001).
- [22] T. Hirano, M. Komatsu, H. Uenohara, A. Takahashi, K. Takayama, T. Yoshimoto, "A novel method of drug delivery for fibrinolysis with Ho:YAG laser-induced liquid jet," *Lasers Med. Sci.* **17**(3), pp. 165-172 (2002).
- [23] A. Nakagawa, T. Hirano, M. Komatsu, M. Sato, H. Uenohara, H. Ohyama, Y. Kusaka, R. Shirane, K. Takayama, T. Yoshimoto, "Holmium: YAG laser-induced liquid jet knife: possible novel method for dissection," *Lasers Surg. Med.* **31**(2), pp. 129-135 (2002).
- [24] T. Hirano, H. Uenohara, M. Komatsu, A. Nakagawa, M. Satoh, H. Ohyama, K. Takayama, T. Yoshimoto, "Holmium:YAG laser-induced liquid jet dissector: a novel prototype device for dissecting organs without impairing vessels," *Minim. Invasive Neurosurg.* **46**(2), pp. 121-125 (2003).
- [25] Nakagawa, Y. Kusaka, T. Hirano, T. Saito, R. Shirane, K. Takayama, T. Yoshimoto, "Application of shock waves as a treatment modality in the vicinity of the brain and skull," *J. Neurosurg.* **99**(1), pp. 156-162 (2003).

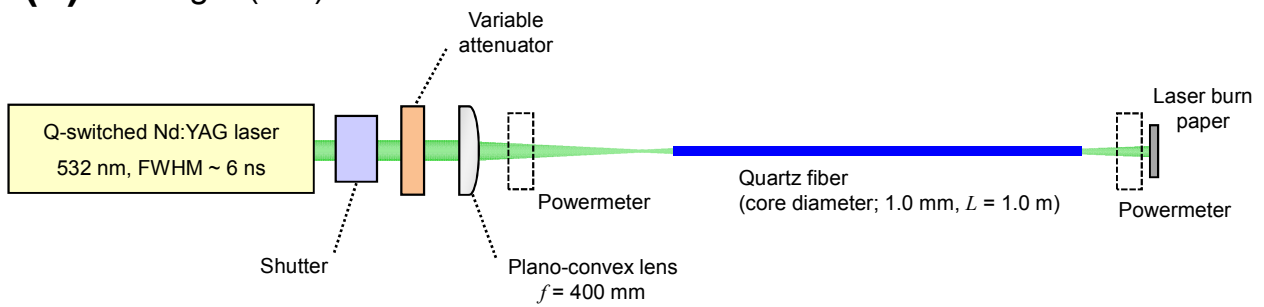
- [26] T. Ohki, A. Nakagawa, T. Hirano, T. Hashimoto, V. Menezes, H. Jokura, H. Uenohara, Y. Sato, T. Saito, R. Shirane, T. Tominaga, K. Takayama, "Experimental application of pulsed Ho:YAG laser-induced liquid jet as a novel rigid neuroendoscopic dissection device," *Lasers Surg. Med.* **34**(3), pp. 227-234 (2004).
- [27] 中川敦寛, 隈部俊宏, 小川欣一, 平野孝幸, 金森政之, 斎藤竜太, 渡辺みか, 橋本時忠, 中野徹, 亀井尚, 上之原広司, 高山和喜, 富永悌二, "パルス Ho:YAG レーザーを用いた微小ジェットの原理開発と臨床応用: 東北大学における医工産学連携の取り組み," *日本レーザー医学会誌* **30**(2), pp. 119-125 (2009).
- [28] 超音波便覧編集委員会, *超音波便覧* (丸善, 1999).
- [29] S. E. Mulholland, S. Lee, D. J. McAuliffe, A. G. Doukas, "Cell loading with laser-generated stress waves: the role of the stress gradient," *Pharm. Res.* **16**(4), pp. 514-518 (1999).
- [30] T. Kodama, M. R. Hamblin, A. G. Doukas, "Cytoplasmic molecular delivery with shock waves: importance of impulse," *Biophys. J.* **79**(4), pp. 1821-1832 (2000).
- [31] T. Y. Lin, D. J. McAuliffe, N. Michaud, H. Zhang, S. Lee, A. G. Doukas, T. J. Flotte, "Nuclear transport by laser-induced pressure transients," *Pharm. Res.* **20**(6), pp. 879-883 (2003).
- [32] A. G. Doukas, N. Kollias, "Transdermal drug delivery with a pressure wave," *Adv. Drug Deliv. Rev.* **56**(5), pp. 559-579 (2004).
- [33] M. Ogura, S. Sato, K. Nakanishi, M. Uenoyama, T. Kiyozumi, D. Saito, T. Ikeda, H. Ashida, M. Obara, "*In vivo* targeted gene transfer in skin by the use of laser-induced stress waves," *Lasers Surg. Med.* **34**(3), pp. 242-248 (2004).
- [34] M. Terakawa, S. Sato, H. Ashida, K. Aizawa, M. Uenoyama, Y. Masaki, M. Obara, "*In vitro* gene transfer to mammalian cells by the use of laser-induced stress waves: effects of stress wave parameters, ambient temperature, and cell type," *J. Biomed. Opt.* **11**(1), pp. 014026/1-7 (2006).
- [35] M. Terakawa, S. Sato, D. Saitoh, H. Tsuda, H. Ashida, H. Okano, M. Obara, "Enhanced angiogenesis in grafted skins by laser-induced stress wave-assisted gene transfer of hepatocyte growth factor," *J. Biomed. Opt.* **12**(3), pp. 034031/1-8 (2007).
- [36] S. Takano, S. Sato, M. Terakawa, H. Asida, H. Okano, M. Obara, "Enhanced transfection efficiency in laser-induced stress wave-assisted gene transfer at low laser fluence by increasing pressure impulse," *Appl. Phys. Express* **1**, pp. 038001/1-3 (2008).
- [37] K. Aizawa, S. Sato, M. Terakawa, D. Saitoh, H. Tsuda, H. Ashida, M. Obara, "Accelerated adhesion of grafted skin by laser-induced stress wave-based gene transfer of hepatocyte growth

factor,” *J. Biomed. Opt.* **14**(6), pp. 064043/1-9 (2009).

[38]M. Shimamura, N. Sato, Y. Taniyama, H. Kurinami, H. Tanaka, T. Takami, T. Ogihara, M. Tohyama, Y. Kaneda, R. Morishita, “Gene transfer into adult rat spinal cord using naked plasmid DNA and ultrasound microbubbles,” *J. Gene Med.* **7**(11), pp. 1468-1474 (2005).

[39]M. Takahashi, K. Kido, A. Aoi, H. Furukawa, M. Ono, T. Kodama, “Spinal gene transfer using ultrasound and microbubbles,” *J. Control. Release* **117**(2), pp. 267-272 (2007).

(a) Straight (0°)



(b) 270° bent

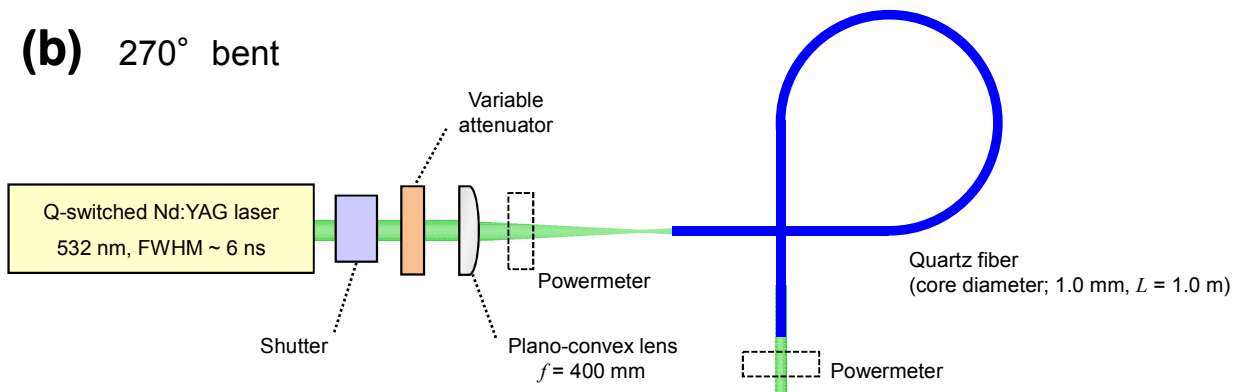
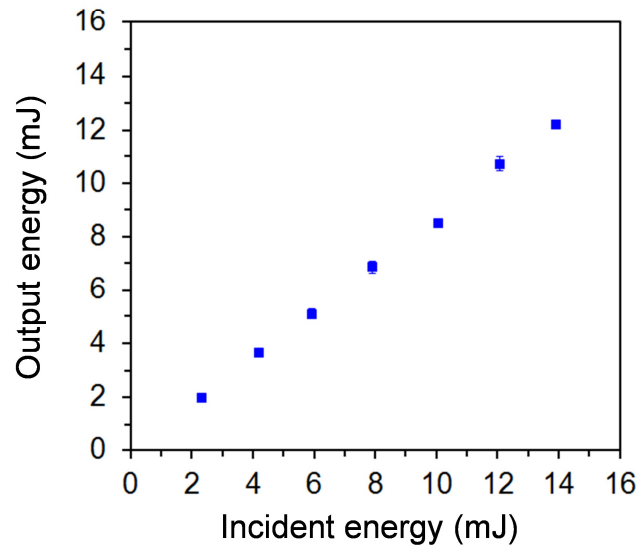


Fig. 5-1 Experimental arrangement for the measurement of optical transmittance in the quartz fiber.

(a) Straight (0°)



(b) 270° bent

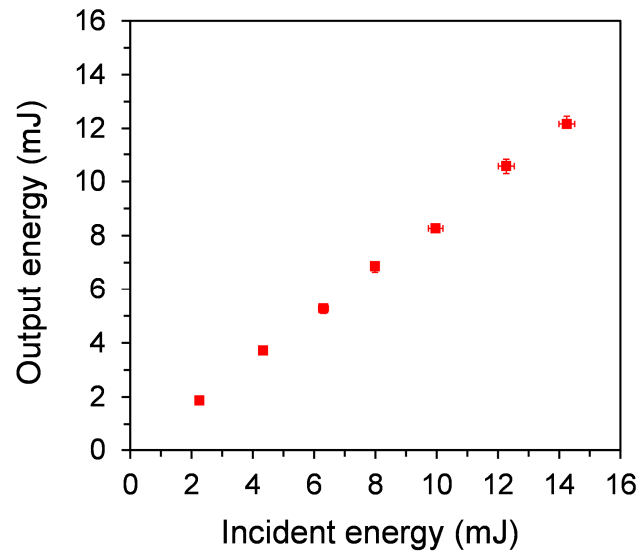


Fig. 5-2 Dependence of the transmitted laser energy and on the incident laser energy for (a) straight and (b) 270° bent waveguide conditions.

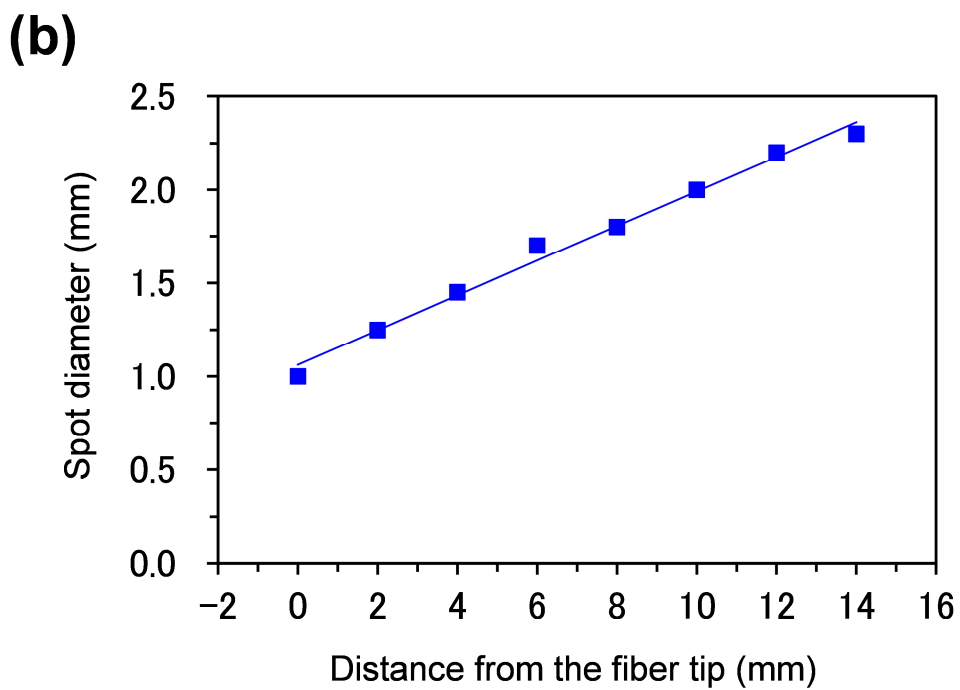
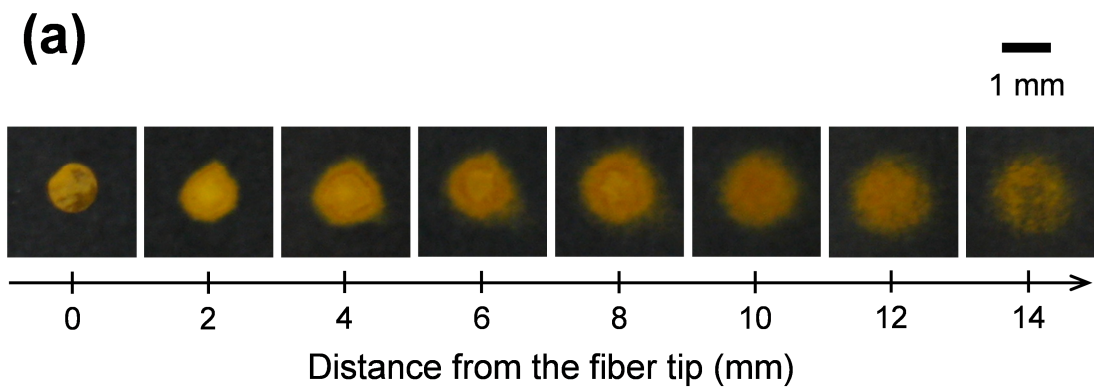


Fig. 5-3 Spot diameter of the laser pulse beams transmitted through straight waveguides in the fiber.
 (a) Ablation patterns taken on a photosensitized paper (b) Spot diameters as a function of distance from the fiber tip.

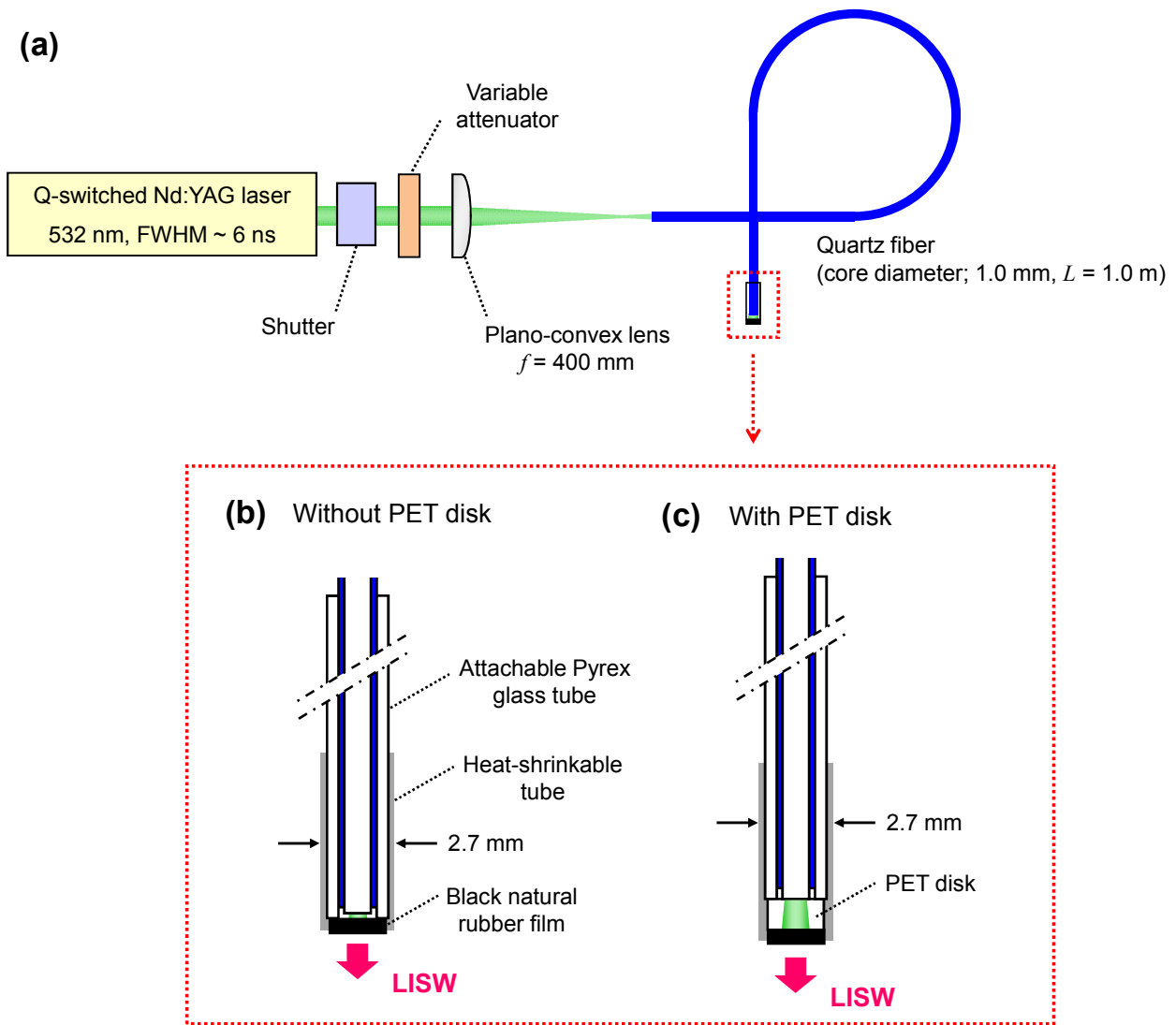


Fig. 5-4 (a) Experimental setup for the fiber-based LISW generation. Configuration of the fiber-based LISW generators: (b) without a PET disk and (c) with a PET disk.

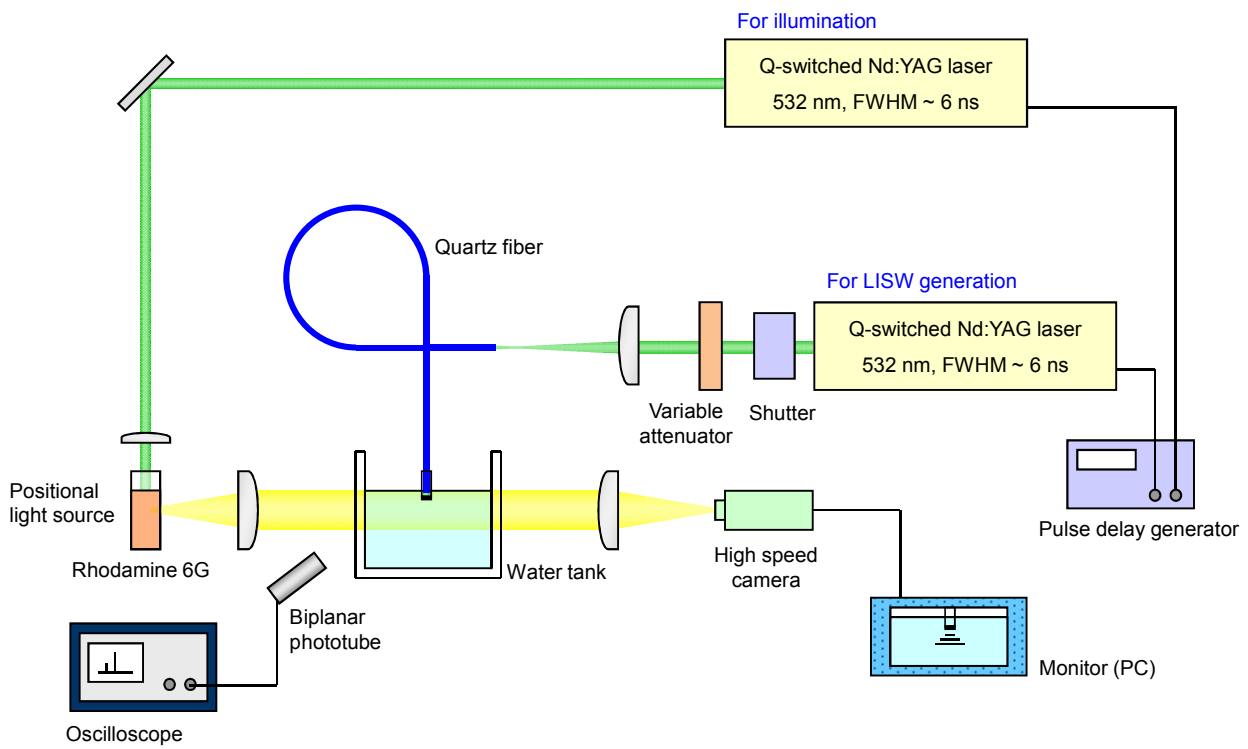
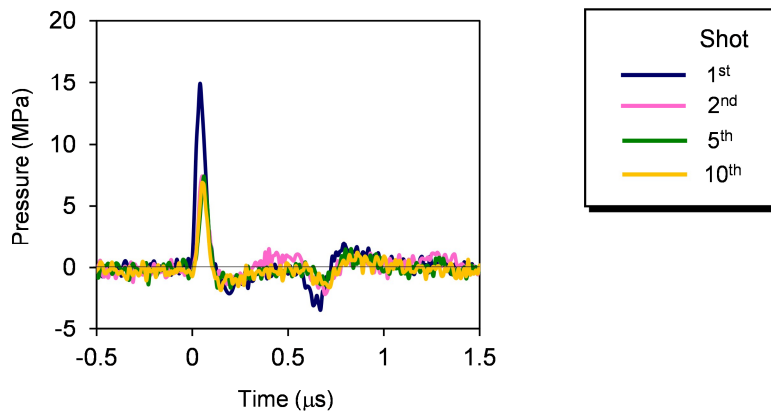
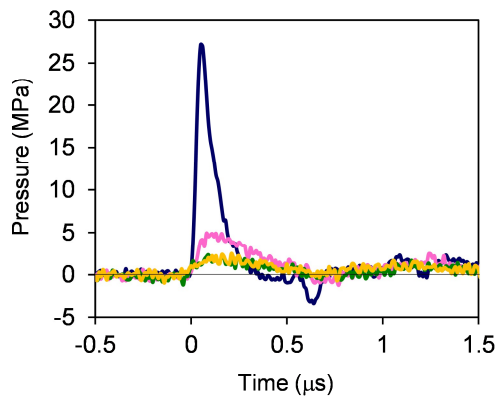


Fig. 5-5 Diagram of the experimental setup for visualization of the fiber-based LISW propagation through water.

(a) Laser fluence 1.0 J/cm² (without PET disk)



(b) Laser fluence 0.5 J/cm² (with PET disk)



(c) Laser fluence 1.0 J/cm² (with PET disk)

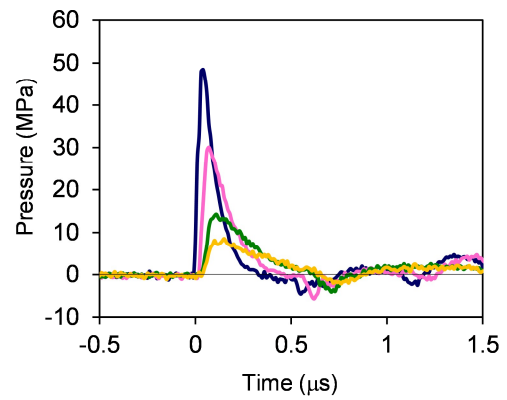


Fig. 5-6 Temporal pressure profiles of the fiber-based LISWs.

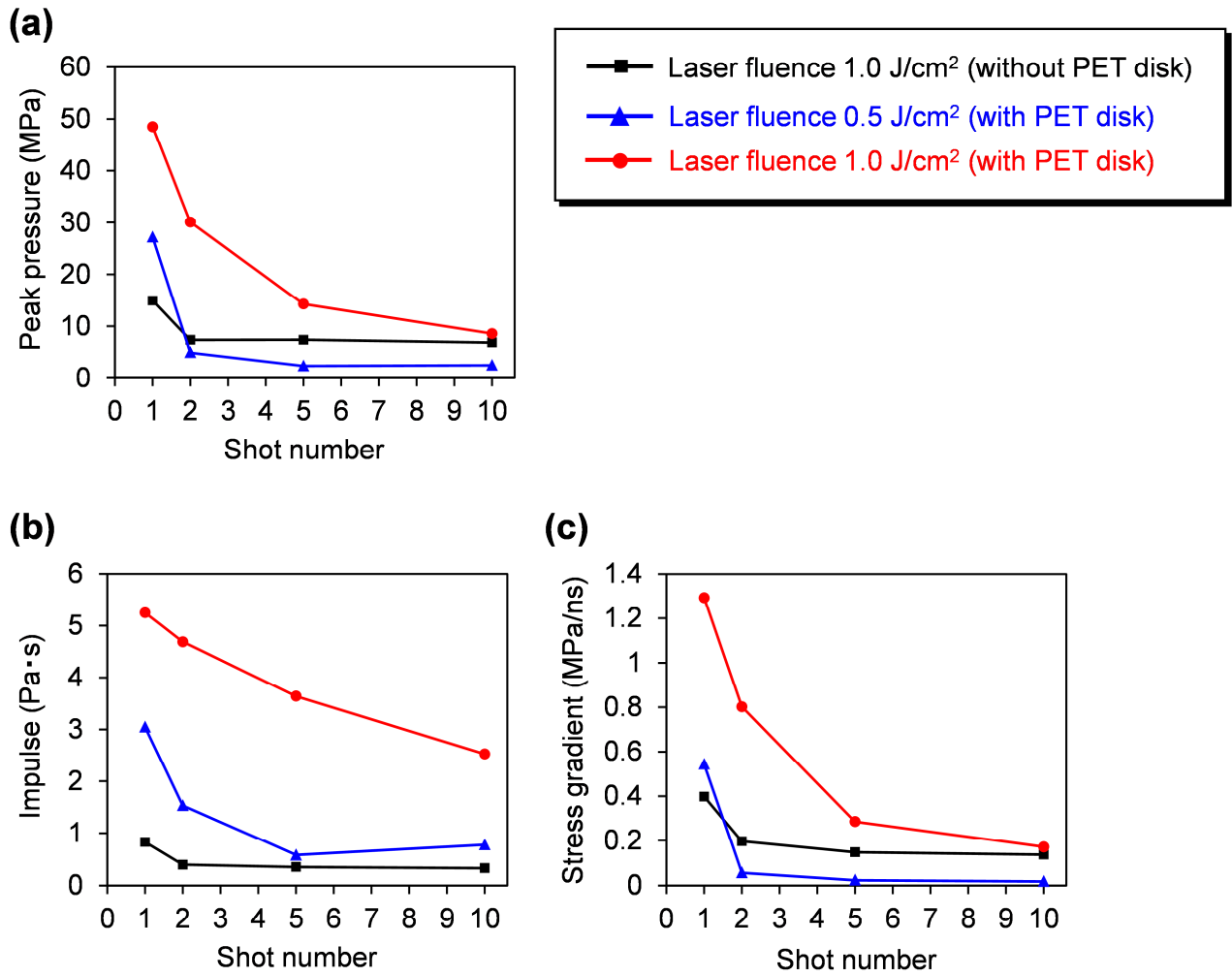


Fig. 5-7 Pressure characteristics of the fiber-based LISWs as a function of propagation distance.

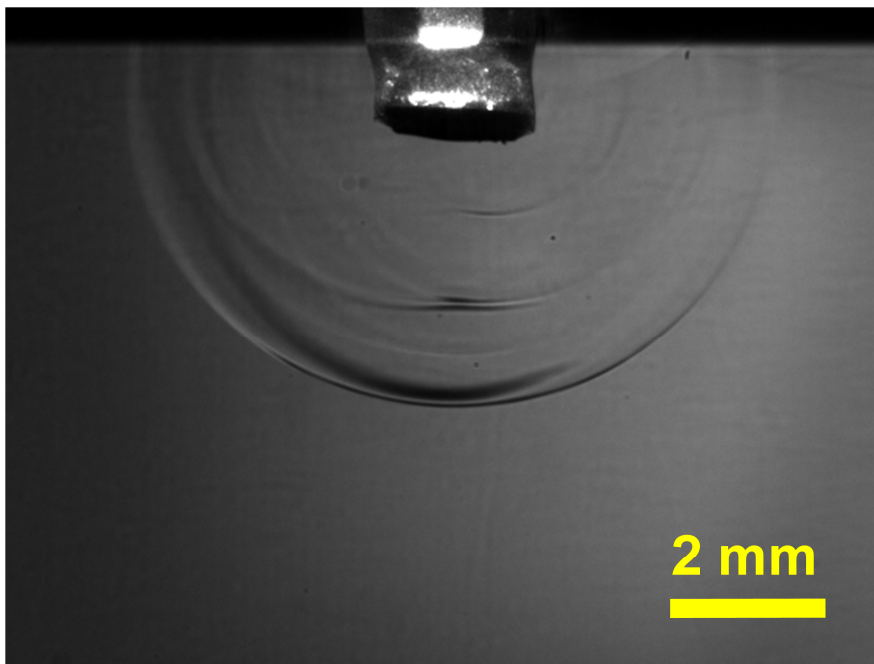


Fig. 5-8 Shadowgraph of the fiber-based LISW propagating through water at 3 μ s after laser irradiation.

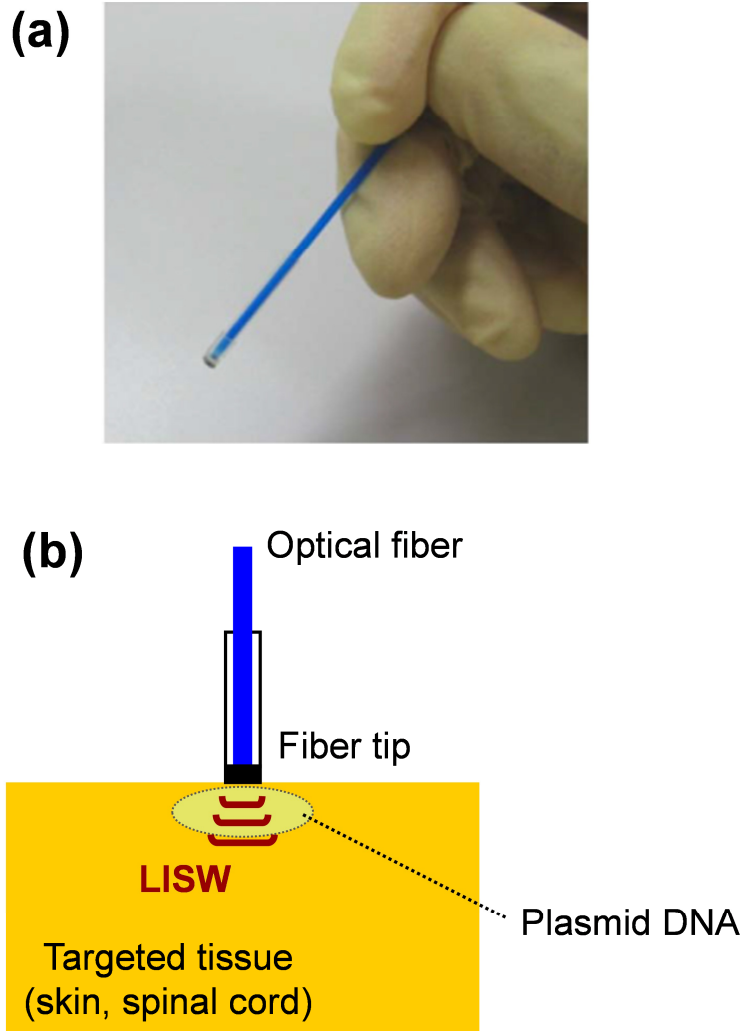


Fig. 5-9 (a) Photograph of gene transfer system mediated by the optical fiber-based LISW.
(b) Experimental configuration of the gene transfection.

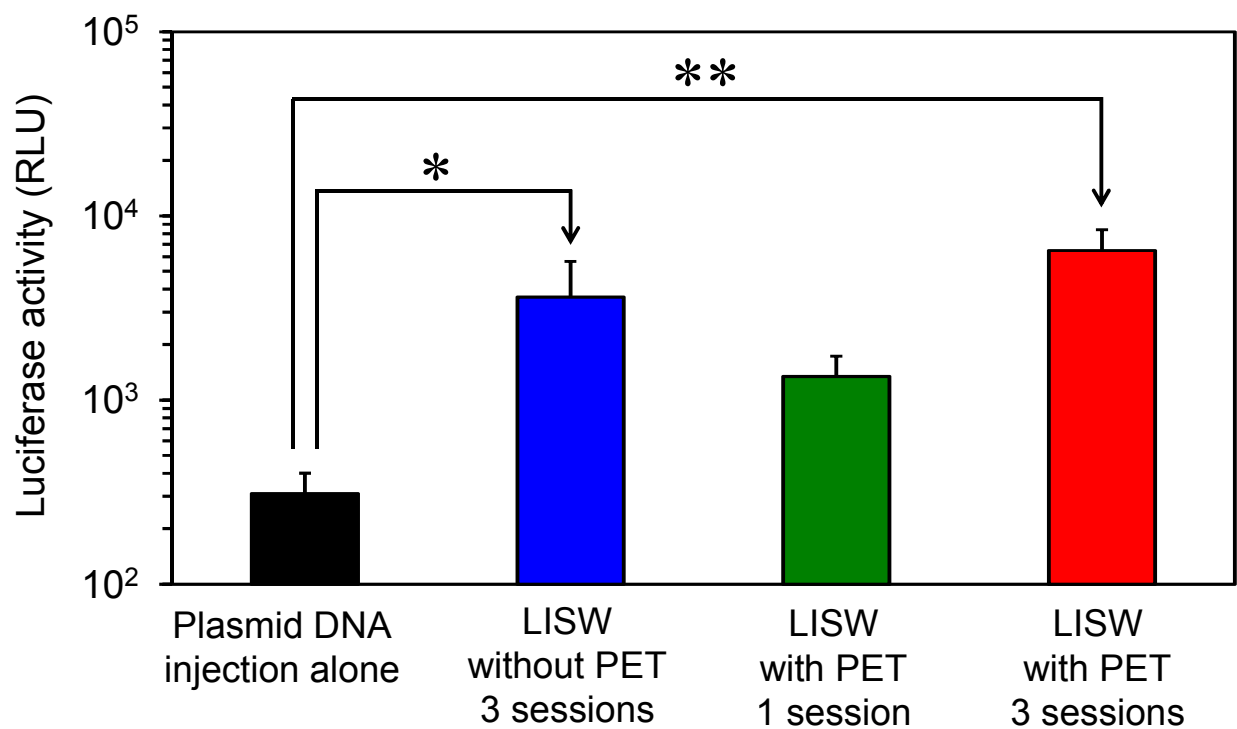


Fig. 5-10 Luciferase activities in rat skins at 24 hours after application of fiber-based LISWs; a laser target was exchanged every 10 laser pulses for efficient confinement of laser-induced plasma.

Values are expressed as means + standard error (n = 8). * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$.

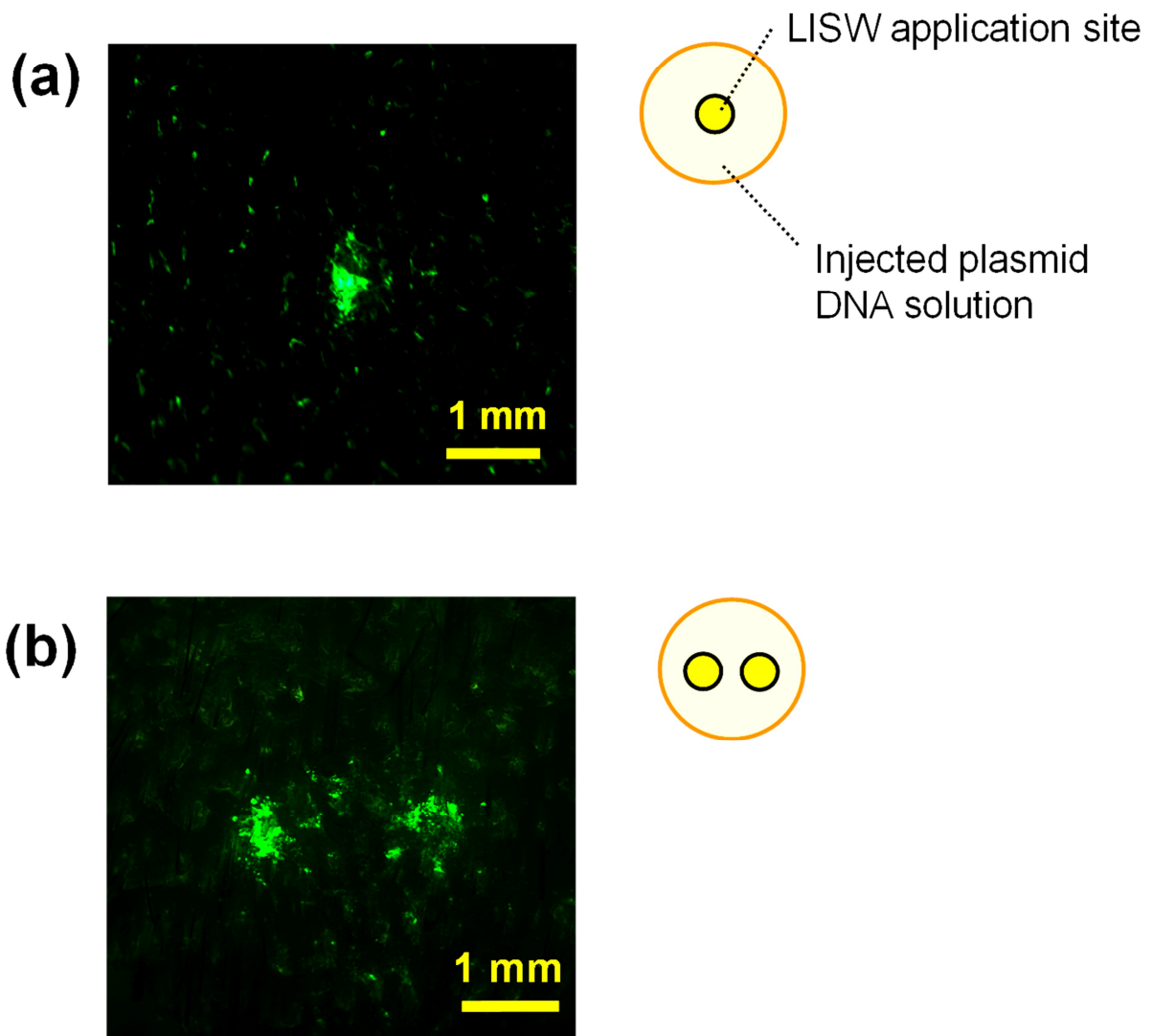


Fig. 5-11 Distribution of EGFP gene expression at 24 h after application of three sessions of LISWs. After plasmid injection, LISWs were applied to (a) one site and (b) two sites with the fiber tip.

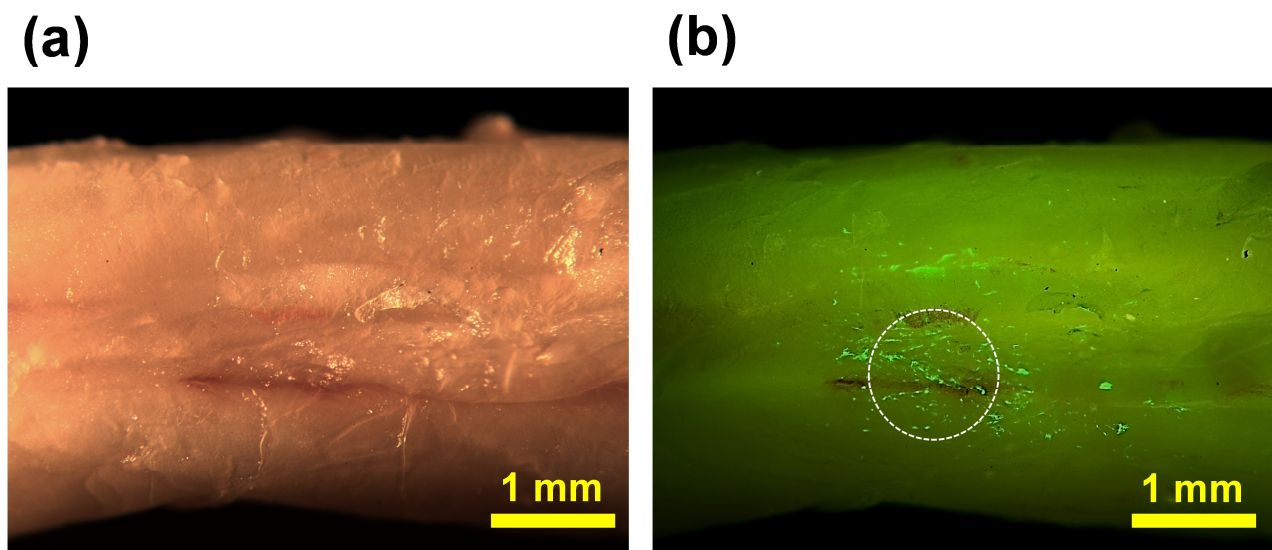


Fig. 5-12 Distribution of EGFP gene expression at 48 h after application of three sessions of LISWs.

(a) Stereomicroscopic view of dorsal part of thoracic spinal cord and (b) fluorescent stereomicroscopic image after LISW application. The dashed circle (1 mm diameter) indicates the LISW application area.

第 6 章

結論

6.1 はじめに

現在、日本には約 10 万人の脊髄損傷患者がいるとされているが、その中には若年層も多く、長年にわたる麻痺による日常生活の不自由さと精神的な負担に苦しんでいる。神経組織の再生能は他の生体組織と比べて極めて低いことから、現在までに脊髄損傷によって失われた機能を回復するための有効な治療法は確立されていないが、神経再生に関する近年の数多くの研究成果によれば、この脊髄損傷の治療法として遺伝子治療が有望視されている。ごく最近の報告では、神経軸索の伸長を阻害するグリア瘢痕の形成に関わる中間径フィラメントタンパク質の発現を抑制する siRNA を損傷脊髄のグリアに導入することで、破断した神経軸索を再生できることが示されている。しかし、より広範に神経路の再構築が必要となる運動機能改善を得ることは難しく、遺伝子治療の根幹技術となる遺伝子導入法には未だ技術的な課題がある。具体的には、治療対象が中枢神経系であるため、特に高い安全性、精密性、および時間的制御性が求められるが、これらの要求を満たす遺伝子導入技術は確立していない。さらに、脊髄は管状の椎骨で囲まれた神経組織であるために、同技術には生体深部への適用性も必要とされる。

本研究では、LISW による遺伝子導入技術に着目し、脊髄損傷後の運動機能改善を目的に研究を行った。レーザを用いる遺伝子導入法は、エネルギーの空間的・時間的制御性が高いことに加えて、光ファイバを用いることにより、操作性に富む経カテーテル的遺伝子治療を実現できるといった潜在能力を備えている。その中でも、固体材料へのパルスレーザ照射によって発生する応力波(LISW)を用いた遺伝子導入法は、一回の適用で遺伝子導入できる細胞数が多く、かつ応力波は光よりも高効率に生体内を伝搬するため、深部組織への適用が可能である。LISW による遺伝子導入法を用いて脊髄損傷の遺伝子治療を実現するため、最初に脊髄における LISW の伝搬特性を明らかにした。次に、これまで実証例のない LISW による脊髄への遺伝子導入を、健常ラット脊髄を対象とした実験により実証し、その遺伝子発現特性を調査した。ここで得られた特性に基づき、LISW による遺伝子導入法を用いて脊髄内に治療用遺伝子を導入し、脊髄損傷によって破断した神経軸索再生の促進を試みた。LISW によって、神経軸索の伸長を阻害するグリア瘢痕の形成の一端を担う中間径フィラメントタンパク質遺伝子に対する siRNA をアストロサイトに導入し、下肢運動機能の改善を実証した。さらに本技術を臨床現場で応用する目的で、光ファイバを用いた経カテーテル的遺伝子導入デバイスの開発とその特性の評価を行った。

以下に、本研究で得られた成果について各章ごとにまとめ、最後に総括する。

6.2 レーザ誘起応力波の発生と生体内伝搬(第2章)

第2章では、まず LISW の発生機構と生体内における LISW の伝搬理論について述べた。LISW は粗密波であることから、LISW による脊髄組織の局所への遺伝子導入するためには、その生体内伝搬の物理的特性を知ることが重要である。脊髄への LISW 適用方法は、臨床で頻繁に用いられている椎弓切除術を施した後の適用、および椎骨を介しての適用の2通りが考えられる。そこで、脊髄の音響特性を模擬したファントムを用いて、LISW 伝搬時の圧力特性の減衰特性と空間的拡がり調査した。その結果、椎弓切除をした上での適用では、面波源で発生させた LISW は指向性よく脊髄内を伝搬し、部位選択的に圧力が作用できることを示した。一方、椎骨を介して LISW を適用する場合は、椎骨内でのエネルギー減衰を考慮してレーザーパラメータを選ぶ必要があり、そのパラメータ選定時に必要となる圧力の減衰特性を提示した。得られた減衰特性(厚さ 2 ~ 3 mm のラット椎骨の伝搬でピーク圧力は 6.5%にまで減衰)からは、椎骨の一部を切削した上で椎骨を介して LISW を適用することが実用的と考えられた。

6.3 レーザ誘起応力波による健常ラット脊髄への部位選択的遺伝子導入(第3章)

LISW による遺伝子導入技術は、レーザーの高い空間制御性と応力波が備える深部侵達性から、部位選択的な脊髄損傷の遺伝子治療を実現するための有効な手段となり得る。しかし、これまでに報告されている LISW を用いた *in vivo* での遺伝子導入対象は、ラットの皮膚、顔面筋、およびマウス脳に限られており、脊髄組織への遺伝子導入は実証されていなかった。そこで第3章では、健常ラット脊髄を対象に、プラスミド DNA を注入後、LISW を適用し、標的部位選択的に遺伝子導入が可能であるかを調査した。最初に中枢神経系の構成細胞を概説し、続いてそれら細胞の膜透過性亢進に寄与する LISW の力学的作用を説明した。そして、第2章で述べた LISW の圧力伝搬特性の結果と併せて、脊髄への遺伝子導入を達成するための LISW の圧力特性を明らかにし、機能学的な損傷の評価から、安全に細胞膜の透過性を亢進しうる、低フルエンス(0.3 J/cm^2)、多パルス(10 パルス)の LISW が適していることを示した。さらに、胸髄節ごとの遺伝子発現レベルの評価により、部位選択的な脊髄への遺伝子導入が可能であることを示し、高いレベルでの発現が導入から 5 日後まで維持されることを示した。

6.4 レーザ誘起応力波を用いた siRNA 導入による脊髄損傷モデルラットの運動機能改善

(第4章)

第4章では、脊髄損傷モデルラットを対象に LISW による遺伝子導入を行い、損傷後に見られる運動機能障害が有意に軽減されることを示した。外傷性の脊髄損傷後、炎症反応によって活性化したアストロサイトは損傷部に集積し、未損傷のニューロンとグリアが壊死するのを防ぐためにグリア瘢痕を形成する。このとき神経保護効果を越えて過剰に集積したアストロサイトはグリア瘢痕の拡大に寄与し、神経軸索伸長の生理的、および物理的障壁を増大させている。そのため、LISW による遺伝子導入法を用いて、損傷部のアストロサイトに対してその細胞骨格タンパク質となる中間径フィラメントタンパク質(GFAP, vimentin)の発現を抑制する siRNA を導入し、瘢痕形成を抑えて神経路の再構成(神経再生)を試みた。損傷脊髄内の siRNA 分子の分布を調べるために行った蛍光標識 siRNA の導入実験から、LISW の適用により損傷脊髄の深部に存在する活性化アストロサイトへの導入が達成されていることが示された。そして、中間径フィラメントタンパク質に対する siRNA を導入した実験では、LISW を適用したラットにおいて、有意な組織空洞の縮減と下肢運動機能スコアの向上が見られた。すなわち、LISW による遺伝子導入技術で、損傷部位選択的に活性化アストロサイトに対して治療用 siRNA の導入が実現できたことで得られた結果と言える。

6.5 光ファイバ式遺伝子導入デバイスの開発とその特性評価(第5章)

第3章と第4章では、LISW による遺伝子導入法を用いて、健常ラット脊髄でのレポーター遺伝子の発現と脊髄損傷モデルラットの遺伝子治療効果を実証し、本遺伝子導入の有効性を示した。今後、本方法を臨床現場で用いる際、高い操作性を実現するために経カテーテル的遺伝子導入技術が必要になることが想定される。そこで第5章では、経カテーテル的遺伝子導入デバイスの開発とその特性の評価を行った。LISW を発生させるために最外径 2.7 mm のプローブ型デバイスを作製し、光ファイバ式 LISW によるレポーター遺伝子の導入を試み、その性能を評価した。その結果、遺伝子導入の達成に必要なとされる圧力特性、および遺伝子発現部位の標的性が得られることがわかった。現在、脊椎内視鏡下手術をはじめとする脊椎と脊髄の疾患の低侵襲外科手術が一般的になり始め、柔軟に治療部位を制御できる経カテーテル的遺伝子導入デバイスは、脊髄損傷の遺伝子治療でも必要になることが想定される。そのため、本章で述べた経カテーテル的遺伝子導入デバイスの開発は、LISW による遺伝子導入法を用いた脊髄損傷の遺伝子治療を臨床現場で実現するため

の breakthrough である。

6.6 総括

本研究は、LISW による遺伝子導入技術を用いた脊髄損傷の遺伝子治療を目的として行われた。脊髄の模擬組織を用いて行った LISW の伝搬特性計測から、脊髄への標的部位選択的な遺伝子導入を達成するために必要な圧力伝搬特性が得られていることを明らかにした。次に、ラットの健常脊髄を対象に LISW によるレポーター遺伝子の導入を実証し、発現部位の標的性と運動機能評価から本遺伝子導入技術の安全性を示した。これらの特性を基に、脊髄損傷モデルラットを対象に LISW による siRNA 導入を行い、損傷後に見られる運動機能障害が有意に軽減されることを示した。これは、RNA 干渉技術を用いた中間径フィラメントタンパク質の発現抑制による初めての運動機能改善の報告である。さらに、光ファイバを用いた経カテーテル的遺伝子導入デバイスの開発によって、LISW を用いた脊髄損傷の遺伝子治療の臨床現場での応用可能性を示した。まとめると、LISW による遺伝子導入法が、脊髄損傷の遺伝子治療を行う上で必要となる遺伝子導入効率、部位標的性、安全性、および臨床適用の可能性があることを明らかにした。

6.7 展望

遺伝子治療が有望視されているのは、脊髄損傷にとどまらない。高齢社会を迎えたことで増えるとされているアルツハイマー病とパーキンソン病、さらに筋萎縮性側索硬化症や脊髄小脳変性症などの難治性神経疾患に対する治療法として、遺伝子治療が期待されている。LISW による遺伝子導入法は、レーザーの高い空間制御性および経カテーテル的応用の適合性に加えて、深部組織への適用も可能である。再生能の乏しい神経組織を対象としたとき、遺伝子治療の根幹技術となる遺伝子導入法には、特に高い安全性、精密性、および時間的制御性が求められるため、本遺伝子導入法は上述の神経疾患治療に適した方法と言える。また、難聴の原因となる有毛細胞の機能障害の回復に遺伝子治療が有用であることが近年明らかにされているが、有毛細胞の存在する蝸牛は内耳に位置し、できる限り細径の遺伝子導入デバイスが必要となる。こうした空間的に治療が難しい生体部位に対して、光ファイバ式 LISW による内視鏡的および経カテーテル的遺伝子導入が実現できると考えられる。今後、分子生物学の進展とともに、多くの疾患について遺伝子治療の効果が期待される。それとともに、遺伝子導入技術に対する技術的な要求も高まることが予測される。

が、以上の特長から、LISW を用いた遺伝子導入法に向けられる期待も大きくなると考えられる。

レーザーの医療応用としては、生体組織の蛍光、吸収、散乱特性などを利用した多くの診断技術が知られている。例えば、ガン診断において、病変部と正常部の分子レベルでの内包量の差異に由来した自家蛍光の違いによって病変部を診断する方法が知られている(蛍光分光診断)。また、それら病変部と正常部の組織・細胞レベルでの主要な差異として挙げられるのは、細胞の形態、分布状態などの変化である。そのため、照射光の散乱状態に変化が生じ、それを捉えることで病変部を診断する技術(光散乱分光)も知られている。さらに、内因性物質の吸収スペクトルの違いを利用すれば、短パルスレーザーを照射したときに発生する熱弾性波を時間分解的に検出することで、内因性物質の空間分布を知ることができる(光音響トモグラフィ)。これらは、レーザーを使った生体診断技術のごく一例であるが、いずれもファイバによる導光で病変部の診断または内因性物質の検出が可能である。そのため、LISW による経カテーテル的遺伝子導入デバイスと、同一のファイバあるいは同一のカテーテルを通じて装置を一体に組み合わせることが可能である。こうした診断・治療一体型の医療装置は、診療時間の短縮と医療の高効率化を可能にする次世代医療技術として注目を集めており、医工学の分野において実用化が進められている構想である(治療(therapy)と診断(diagnostics)の合成した造語としてセラノスティクス(theranostics)と呼ばれている)。レーザーを用いた診断・治療一体型医療装置として、本遺伝子導入技術を組み合わせれば、例えば光で診断された腫瘍部位に対して LISW による遺伝子導入を行い、病変部を治療するような医療技術が期待できるであろう。これによって、遺伝子治療が必要な生体部位を確認しながら、同時に遺伝子導入を行えるようになり、全診療時間は大きく減らせるとともに治療成果の向上が望める。

一方で、LISW による遺伝子導入技術をヒト疾患に適用する際の課題もある。これまでの研究では、深さ 1.5 cm の生体組織へのレポーター遺伝子導入が可能であることが示されているが、ヒトへの適用時には健常部位への副作用を防ぐために、より深部で、かつ空間選択的な遺伝子治療が必要とされる。例えば、パーキンソン病のように脳の特定部位を治療対象とする場合、あるいは、肺、肝臓、および膵臓などの体内深部の特定箇所にてきたガンを治療する場合が挙げられる。その際、標的部位に必要な圧力特性を得るために、高フルエンスで発生させた LISW を体表からの適用する方法が考えられるが、生体浅部における組織損傷が副作用として問題となる。そこで、生体深部において応力波を集束させるために複数波源または音響レンズを用いる方法、または、経針的に生体深部まで LISW を伝搬させる方法などが考えられる。本研究で示した経カテーテル的応用に加え、上述のよ

うな LISW の集束および伝搬方法の工夫が今後達成されれば、本技術を用いた遺伝子治療の対象となる疾患はより一層拡大するであろう。

謝辞

本研究は、慶應義塾大学大学院理工学研究科総合デザイン工学専攻小原研究室において、小原 實 教授の御指導のもとに行われたものである。本研究を行うにあたり、多大なる御指導、御鞭撻を賜りました 小原 實 教授に心から深く感謝の意を表します。

本論文に対して多くの御指導と貴重な御助言を頂いた慶應義塾大学理工学部 荒井 恒憲 教授、同 齋木 敏治 教授、同 木下 岳司 准教授に心から深く感謝申し上げます。また、本研究を進めるにあたり多くの御助言を頂きました慶應義塾大学理工学部 寺川 光洋 助教には厚く御礼申し上げます。

防衛医科大学校防衛医学研究センター情報システム研究部門 佐藤 俊一 准教授には、常日頃より研究に関する御指導のみならず、研究に対する心構えや姿勢等、多くの貴重な御助言を頂戴し、感謝の念が絶えません。深く感謝申し上げます。また、共同研究の実施に御理解を下さいました同部門の 芦田 廣 教授、本研究に関して数多くの貴重な御助言を頂きました 川内 聡子 助教、コンピュータ環境の整備および組織染色の手技に関して大変お世話になりました 脇坂 仁 助教(現 防衛医科大学校病院医療情報部)に深く感謝致します。同部門の 菅原 摩利子 技官、関根 志保 技官(現 防衛医科大学校図書館)には、日々の研究活動を行う上で様々な御援助、御配慮を頂き、心より感謝致しております。防衛医科大学校脳神経外科学講座の 苗代 弘 准教授(現 所沢中央病院)をはじめ、同講座の 豊岡 輝繁 先生(現 久喜総合病院)、魚住 洋一 先生(現 総合上飯田第一病院)、小林 弘明 先生、竹内 誠 先生、長谷 公洋 先生、矢野 明子 技官には本研究に関して数々の有益な助言と実験手技の援助を頂きました。心より深く感謝申し上げます。防衛医科大学校防衛医学研究センター医療工学研究部門の 服部 秀美 助教には、研究設備の使用から実験手法に関するアドバイスまで多くの貴重な御助言を頂戴致しました。小原研究室共同研究員 医師 長谷川 真 先生(新百合ヶ丘ガーデンクリニック)には、臨床医の視点から数多くの御助言を頂戴致しました。厚く御礼申し上げます。

慶應義塾大学グローバル COE プログラム(情報・電気・電子分野)は、最先端の研究に従事し高い志をもつ博士課程の RA (Research Assistant)と共に研鑽し合う場を与えて下さるとともに、共同研究推進海外派遣(旧国際インターンシップ)制度で米国 Massachusetts General Hospital, The Wellman Center for Photomedicine の Prof. Michael R. Hamblin (Harvard Medical School)の御指導のもとで約5ヶ月間研究する機会を与えて下さいました。心から御礼申し上げます。特に拠点リーダーの慶應義塾大学理工学部 大西 公平 教授をはじめ、プロジェクトリーダーの 齋木 敏治 教授ほか、事業推進担当者の先生方に、改めて厚く御礼申し上げ

げます。共同研究の実施に御理解を下さり、国際インターンシップの間、直接御指導を賜りました Prof. Michael R. Hamblin には心より深く感謝致します。また、同研究センターでの研究留学の間に、本研究に関する数多くの有益な御助言を下さいました Prof. Apostolos Doukas, 田中 優砂光 先生, Dr. Pawel Mroz, Prof. Tianhong Dai, Dr. Weijun Xuan, Dr. Ying-Ying Huang の各位に心より感謝致します。

慶應義塾大学工学部小原研究室の諸兄、諸氏には公私にわたって配慮を頂きました。特に、防衛医科大学校での共同研究を遂行するにあたり、多くの御指導を頂きました 相澤和也 氏(現 陸上自衛隊開発実験団), 大塚 理沙 氏(現 パナソニック株式会社), 高野 慎太氏(現 株式会社日立製作所), 平尾 彰浩 氏(現 GE ヘルスケア・ジャパン株式会社)に厚く御礼申し上げます。また、研究室の同輩であり、互いに切磋琢磨して研究に励んできた 田中 悠人 氏(現 トヨタ自動車株式会社), 吉田 健 氏(現 トヨタ自動車株式会社), 矢田 善裕 氏(現 東洋エンジニアリング株式会社)に感謝致します。常日頃数えきれないほどの御協力を頂きました 秋山 琢也 氏(現 住友商事株式会社), 長谷川 博之 氏(現 アンリツ株式会社), 角井 泰之 氏, 村上 方美 氏(現 東海大学医学部), 島田 卓一郎 氏, 渡辺 了太 氏に御礼申し上げます。同研究室の全ての諸兄、諸氏に心より感謝の意を表します。

本研究を遂行するにあたり、特別研究員(DC1)として研究費や研究生活を財政面で支えて頂いた独立行政法人日本学術振興会に感謝致します。

最後に、大学院後期博士課程への進学を理解し、絶え間ない支援と協力を頂いた家族に深く感謝致します。

著者論文目録

1. 原著論文

1.1 本研究に関連する論文

1. Takahiro Ando, Shunichi Sato, Shinta Takano, Hiroshi Ashida, Minoru Obara, “Propagation characteristics of laser-induced stress wave in deep tissue for gene transfer,” *Applied Surface Science*, Vol. 255, No. 24, pp. 9898-9901 (2009).
2. Takahiro Ando, Shunichi Sato, Terushige Toyooka, Yoichi Uozumi, Hiroshi Nawashiro, Hiroshi Ashida, Minoru Obara, “Site-specific gene transfer into the rat spinal cord by photomechanical waves,” *Journal of Biomedical Optics*, Vol. 16, No. 10, pp. 108002/1-7 (2011).
3. Shunichi Sato, Takahiro Ando, Minoru Obara, “Optical fiber-based photomechanical gene transfer system for *in vivo* application,” *Optics Letters*, Vol. 36, No. 23, pp. 4545-4547 (2011).
4. Takahiro Ando, Shunichi Sato, Hiroshi Ashida, Minoru Obara, “Propagation characteristics of photomechanical waves and their application to gene delivery into deep tissue,” *Ultrasound in Medicine and Biology*, Vol. 38, No. 1, pp. 75-84 (2012).
5. Takahiro Ando, Shunichi Sato, Hiroshi Ashida, Minoru Obara, “Effects of pressure characteristics on transfection efficiency in laser-induced stress wave-mediated gene delivery,” *Applied Physics A*, *accepted for publication*.
(online publication: 06 September 2012, DOI: 10.1007/s00339-012-7212-z)
6. Takahiro Ando, Shunichi Sato, Terushige Toyooka, Hiroaki Kobayashi, Hiroshi Nawashiro, Hiroshi Ashida, Minoru Obara, “Photomechanical wave-driven delivery of siRNAs targeting intermediate filament proteins promotes functional recovery after spinal cord injury in rats,” *PLoS one*, *accepted for publication*.

1.2 その他の論文

1. Takahiro Ando, Weijun Xuan, Tao Xu, Tianhong Dai, Sulbha K. Sharma, Gitika B. Kharkwal, Ying-Ying Huang, Qiuhe Wu, Michael J. Whalen, Shunichi Sato, Minoru Obara, Michael R. Hamblin, “Comparison of therapeutic effects between pulsed and continuous wave 810-nm wavelength laser irradiation for traumatic brain injury in mice,”

PLoS one, Vol. 6, No. 10, pp. e26212/1-9 (2011).

2. Akihiro Kurita, Takeshi Matsunobu, Yasushi Satoh, Takahiro Ando, Shunichi Sato, Minoru Obara, Akihiro Shiotani, “Targeted gene transfer into rat facial muscles by nanosecond pulsed laser-induced stress waves,” *Journal of Biomedical Optics*, Vol. 16, No. 9, pp. 098002/1-5 (2011).
3. Qiuhe Wu, Weijun Xuan, Takahiro Ando, Tao Xu, Liyi Huang, Ying-Ying Huang, Tianhong Dai, Saphala Dhital, Sulbha K. Sharma, Michael J. Whalen, Michael R. Hamblin, “Low level laser therapy for closed-head traumatic brain injury in mice: effect of different wavelengths,” *Lasers in Surgery and Medicine*, Vol. 44, No. 3, pp. 218-226 (2012).
4. Hidemi Hattori, Yoshiko Amano, Yoshiko Habu, Takahiro Ando, Bonpei Takase, Masayuki Ishihara, “Angiogenesis following cell injection is induced by an excess inflammatory response coordinated by bone marrow cells,” *Cell Transplantation*, *accepted for publication*.
5. Weijun Xuan, Liyi Huang, Qiuhe Wu, Yi Xuan, Tianhong Dai, Takahiro Ando, Tao Xu, Ying-Ying Huang, Michael Hamblin, “Transcranial low-level laser therapy improves neurological performance in traumatic brain injury in mice,” *submitted to PLoS one*.

2. 総説論文

1. 安藤貴洋, 佐藤俊一, 苗代弘, 小原實, “フォトメカニカル波を用いた脊髄損傷の遺伝子治療,” *レーザー研究*, 第40巻, 第4号, pp. 259-264, 2012年.
2. 安藤貴洋, 佐藤俊一, 豊岡輝繁, 小林弘明, 苗代弘, 芦田廣, 小原實, “フォトメカニカル波を用いた siRNA 導入による脊髄損傷治療,” *日本レーザー医学会誌*, 第33巻, 第2号, pp. 97-103, 2012年.

3. 国際会議

1. Takahiro Ando, Shunichi Sato, Shinta Takano, Hiroshi Ashida, Minoru Obara, “Propagation characteristics of laser-induced stress wave in deep tissue for gene transfer”, 6th International Conference on Photo-Excited Processes and Applications (ICPEPA 2008), Sapporo, Japan (September, 2008).
2. Takahiro Ando, Shunichi Sato, Terushige Toyooka, Yoichi Uozumi, Hiroshi Nawashiro, Hiroshi Ashida, Minoru Obara, “Gene transfer into spinal cord by pulsed laser-induced stress wave,” The 4th Asian and Pacific Rim Symposium on Biophotonics (APBP 2009),

- Jeju, Korea (May, 2009).
3. Takahiro Ando, Shunichi Sato, Terushige Toyooka, Yoichi Uozumi, Hiroshi Nawashiro, Hiroshi Ashida, Minoru Obara, "Targeted gene transfer into rat spinal cord by laser-induced stress waves," Laser Tokyo 2009, Tokyo, Japan (November, 2009).
 4. Takahiro Ando, Shunichi Sato, Mitsuhiro Terakawa, Hiroshi Ashida, Minoru Obara, "Effects of laser parameters on propagation characteristics of laser-induced stress wave for gene transfer," SPIE Photonics West 2010 Biomedical Optics (BiOS 2010), San Francisco, CA, USA (January, 2010).
 5. Takahiro Ando, Shunichi Sato, Terushige Toyooka, Hiroaki Kobayashi, Hiroshi Nawashiro, Hiroshi Ashida, Minoru Obara, "*In vivo* siRNA delivery into injured spinal cord by photomechanical waves," 7th Asia-Pacific Laser Symposium (APLS 2010), Jeju, Korea (May, 2010).
 6. Takahiro Ando, Shunichi Sato, Terushige Toyooka, Hiroaki Kobayashi, Hiroshi Nawashiro, Hiroshi Ashida, Minoru Obara, "Efficient delivery of small interfering RNA into injured spinal cords in rats by photomechanical waves," SPIE Photonics West 2011 Biomedical Optics (BiOS 2011), San Francisco, CA, USA (January, 2011).
 7. Michael R. Hamblin, Weijun Xuan, Liyi Huang, Qiuhue Wu, Ying-Ying Huang Takahiro Ando, Tao Xu, "Mechanisms of action of transcranial LLLT for traumatic brain injury," The American Society for Laser Medicine and Surgery (ASLMS) 2011, Grapevine, TX, USA (March, 2011).
 8. Takahiro Ando, Shunichi Sato, Terushige Toyooka, Hiroaki Kobayashi, Hiroshi Nawashiro, Hiroshi Ashida, Minoru Obara, "Improved functional recovery of injured spinal cords by efficient siRNA delivery using photomechanical waves," 1st International Symposium on Access Spaces (IEEE-ISAS 2011), Yokohama, Japan (June, 2011).
 9. Takahiro Ando, Shunichi Sato, Hiroshi Ashida, Minoru Obara, "Effect of stress wave pulse by laser produced plasma upon the gene delivery efficiency," 11th International Conference on Laser Ablation (COLA 2011), Cancun, Mexico (November, 2011).
 10. Takahiro Ando, Shunichi Sato, Hiroaki Kobayashi, Hiroshi Nawashiro, Hiroshi Ashida, Michael R. Hamblin, Minoru Obara, "Effects of polarization in low-level laser therapy of spinal cord injury in rats," SPIE Photonics West 2012 Biomedical Optics (BiOS 2012), San Francisco, CA, USA (January, 2012).
 11. Takahiro Ando, Shunichi Sato, Satoko Kawauchi, Hiroshi Ashida, Minoru Obara, "Near-infrared laser irradiation upregulates gene expression after application of photomechanical wave," Conference on Laser Surgery and Medicine 2012 (CLSM 2012), Yokohama, Japan (April, 2012).

12. Takahiro Ando, Shunichi Sato, Satoko Kawauchi, Hiroshi Ashida, Minoru Obara, “*In vivo* optical fiber-based gene transfer mediated by photomechanical waves,” 8th Asia-Pacific Laser Symposium (APLS 2012), Huangshan, China (May, 2012).
13. Michael Hamblin, Weijun Xuan, Liyi Huang, Takahiro Ando, Qiuhe Wu, “Mechanisms of action of transcranial laser therapy for traumatic brain injury and beyond,” 36th Meeting of the American Society for Photobiology (ASP 2012), Montreal, Canada (June, 2012).

4. 国内会議

1. 安藤貴洋, 佐藤俊一, 高野慎太, 寺川光洋, 芦田廣, 小原實, “深部組織への遺伝子導入を目指したレーザー誘起応力波の伝搬特性,” 第8回レーザー学会東京支部研究会, 神奈川, 2008年3月.
2. 佐藤俊一, 相澤和也, 高野慎太, 安藤貴洋, 佐藤泰司, 苗代弘, 齋藤大蔵, 芦田廣, 小原實, “フォトメカニカル波を用いた細胞内分子デリバリー,” 第29回日本レーザー医学会総会, 東京, 2008年11月.
3. 佐藤俊一, 松延毅, 佐藤泰司, 塩谷彰浩, 齋藤大蔵, 芦田廣, 相澤和也, 安藤貴洋, 小原實, “フォトメカニカル波を用いた標的化遺伝子デリバリー,” 電気学会 光・量子デバイス研究会, 東京, 2009年2月.
4. 安藤貴洋, 佐藤俊一, 豊岡輝繁, 魚住洋一, 苗代弘, 芦田廣, 小原實, “レーザー誘起応力波を用いた脊髄への遺伝子導入における圧力特性依存性,” 第9回レーザー学会東京支部研究会, 東京, 2009年3月.
5. 安藤貴洋, 佐藤俊一, 豊岡輝繁, 魚住洋一, 苗代弘, 芦田廣, 小原實, “レーザー誘起応力波によるラット脊髄への局所遺伝子導入,” 第56回応用物理学関係連合講演会, 筑波, 2009年3月.
6. 佐藤俊一, 安藤貴洋, 魚住洋一, 苗代弘, 佐藤泰司, 松延毅, 塩谷彰浩, 芦田廣, 小原實, “フォトメカニカル波を用いた中枢神経系・筋組織への遺伝子デリバリー,” 第48回日本生体医工学会大会, 東京, 2009年4月.
7. 秋山琢也, 佐藤俊一, 安藤貴洋, 芦田廣, 小原實, “環状レーザービームを用いたレーザー誘起応力波による遺伝子導入の3次元標的化に関する基礎研究,” 日本光学会年次学術講演会 (OPJ) 2009, 新潟, 2009年11月.
8. 安藤貴洋, 佐藤俊一, 豊岡輝繁, 魚住洋一, 苗代弘, 芦田廣, 小原實, “脊髄損傷治療を目指したフォトメカニカル波による局所遺伝子導入,” レーザー学会学術講演会第30回年次大会, 大阪, 2010年2月.
9. 佐藤俊一, 佐藤泰司, 齋藤大蔵, 安藤貴洋, 寺川光洋, 小原實, “フォトメカニカル波の多彩な生体作用: 細胞刺激から遺伝子導入まで,” レーザー学会学術講演

会第 30 回年次大会，大阪，2010 年 2 月。

10. 安藤貴洋，佐藤俊一，豊岡輝繁，魚住洋一，苗代弘，芦田廣，小原實，“脊髄損傷治療に向けたフォトメカニカル波によるラット脊髄への標的化遺伝子導入，” 第 10 回レーザー学会東京支部研究会，東京，2010 年 3 月。
11. 上出大介，松延毅，佐藤泰司，神崎晶，安藤貴洋，佐藤俊一，塩谷彰浩，“フォトメカニカル波を用いた内耳組織への新しい遺伝子導入，” 第 20 回本耳科学会総会学術講演会，松山，2010 年 10 月。
12. 栗岡隆臣，松延毅，栗田昭宏，上出大介，佐藤泰司，神崎晶，安藤貴洋，佐藤俊一，塩谷彰浩，“レーザー誘起応力波によるラットの顔面筋への遺伝子導入，” 第 20 回本耳科学会総会学術講演会，松山，2010 年 10 月。
13. 秋山琢也，佐藤俊一，安藤貴洋，芦田廣，寺川光洋，“リング状フォトメカニカル波を用いた経血管的薬剤輸送の深さ制御，” 日本光学会年次学術講演会（OPJ）2010，東京，2010 年 11 月。
14. 栗田昭宏，松延毅，佐藤泰司，安藤貴洋，佐藤俊一，小原實，塩谷彰浩，“耳鼻咽喉科領域におけるレーザーを用いた遺伝子導入，” 第 31 回日本レーザー医学会総会，愛知，2010 年 11 月。
15. 安藤貴洋，佐藤俊一，芦田廣，小原實，“ファイバ式レーザー誘起衝撃波による遺伝子導入，” 平成 22 年度衝撃波シンポジウム，東京，2011 年 3 月。
16. 安藤貴洋，佐藤俊一，豊岡輝繁，小林弘明，苗代弘，芦田廣，小原實，“フォトメカニカル波を用いた siRNA 導入による脊髄損傷治療，” 第 32 回日本レーザー医学会総会，横浜，2011 年 11 月。
17. 安藤貴洋，Weijun Xuan，Tao Xu，Ying-Ying Huang，Sulbha K. Sharma，Gitika B. Kharkwal，佐藤俊一，小原實，Michael R. Hamblin，“頭部外傷の低出力レーザー治療におけるパルスと連続モード照射による治療効果の比較，” 日本光学会年次学術講演会（OPJ）2011，大阪，2011 年 11 月。
18. 佐藤俊一，安藤貴洋，苗代弘，小原實，“フォトメカニカル波を用いた光ファイバー型遺伝子導入システムの開発，” レーザー学会学術講演会第 32 回年次大会，仙台，2012 年 1 月。
19. 安藤貴洋，佐藤俊一，川内聡子，芦田廣，小原實，“フォトメカニカル波による遺伝子導入後の低出力近赤外レーザー照射による遺伝子発現量の向上，” 第 59 回応用物理学関係連合講演会，東京，2012 年 3 月。
20. 安藤貴洋，佐藤俊一，川内聡子，小林弘明，苗代弘，芦田廣，小原實，“脊髄損傷の低出力レーザー治療：偏光特性の影響，” 第 51 回日本生体医工学会大会，福岡，2012 年 5 月。

5. その他

5.1 ハンドブックの分担執筆

1. Takahiro Ando, Ying-Ying Huang, Michael R. Hamblin, “Low Level Laser/Light Therapy: LLLT for Stroke and Brain Disease,” Handbook of Photomedicine, Chapter 5 (Taylor and Francis, June, 2013). ISBN-13: 978-1439884690.

5.2 オンライン記事

1. Michael Hamblin, Ying-Ying Huang, Quihe Wu, Weijun Xuan, Takahiro Ando, Tao Xu, Sulbha Sharma and Gitika Kharkwal, “Low-level light therapy aids traumatic brain injury”, SPIE Newsroom, May 5, 2011.
DOI: 10.1117/2.1201102.003573

5.3 受賞

1. 安藤貴洋, 佐藤俊一, 高野慎太, 寺川光洋, 芦田廣, 小原實, “深部組織への遺伝子導入を目指したレーザー誘起応力波の伝搬特性,” 第8回レーザー学会東京支部研究会, 神奈川, 2008年3月. ポスター講演優秀賞.
2. 安藤貴洋, 佐藤俊一, 豊岡輝繁, 魚住洋一, 苗代弘, 芦田廣, 小原實, “脊髄損傷治療を目指したフォトメカニカル波による局所遺伝子導入,” レーザー学会学術講演会第30回年次大会, 大阪, 2010年2月. 優秀論文賞.
3. 安藤貴洋, 佐藤俊一, 豊岡輝繁, 小林弘明, 苗代弘, 芦田廣, 小原實, “フォトメカニカル波を用いた siRNA 導入による脊髄損傷治療,” 第32回日本レーザー医学会総会, 横浜, 2011年11月. 総会賞.
4. ベストプレゼンテーション賞, 慶應義塾大学グローバル COE 拠点「アクセス空間支援基盤技術の高度国際連携」ウィンターキャンプ, 2011年12月.
5. Best Student Paper Award, 慶應義塾大学グローバル COE 拠点「アクセス空間支援基盤技術の高度国際連携」および IEEE 東京支部, 2012年2月.
6. Excellent Achievement Award 2011 (Distinguished RA), 慶應義塾大学グローバル COE 拠点「アクセス空間支援基盤技術の高度国際連携」, 2012年2月.