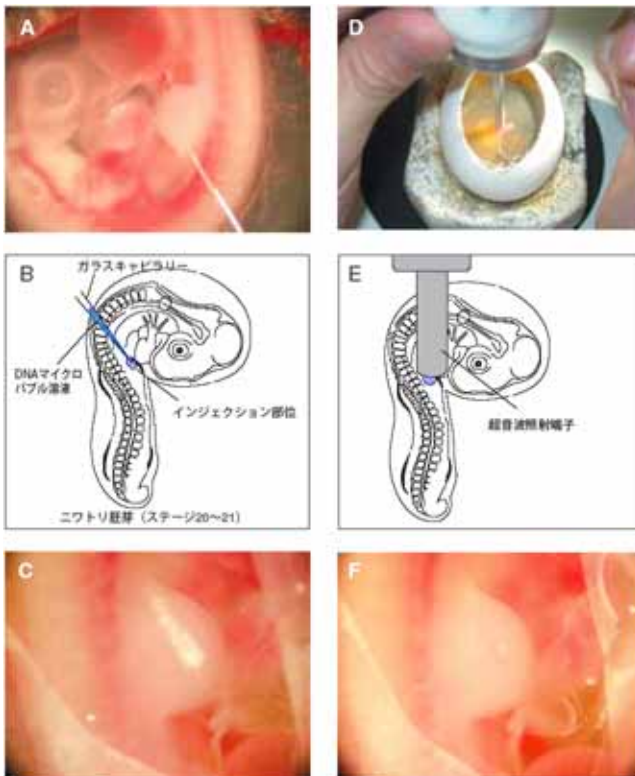


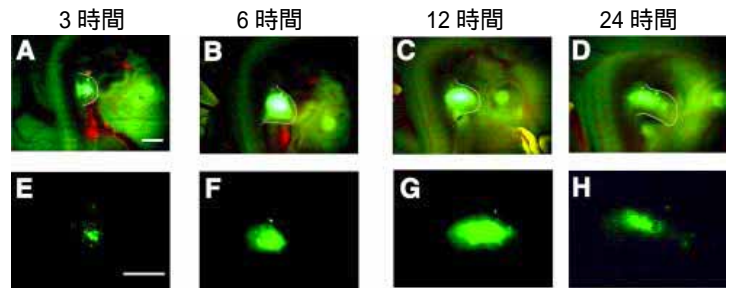
# アプリケーション (ソニトロン 2000・ソノポール 4000)

## ソノレーション法によるニワトリ胚への遺伝子導入 [文献 1]



### ソノレーション法の手順

A, B: DNA-マイクロバブル混合液をガラスキャピラリーを用いてニワトリ胚肢芽へインジェクションする。  
 C: インジェクションした領域はマイクロバブルにより白っぽく見え、可視化できる。  
 D, E: 超音波照射端子 (Ultrasound probe) を用いて (写真は経 3 mm の端子)、超音波を照射する。  
 F: 導入終了。白っぽく見えていたマイクロバブルは破裂し、消失する。

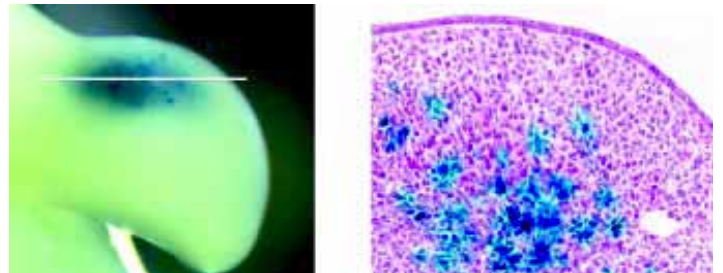


### GFP 遺伝子導入後の発現の経時的变化

ニワトリ胚ステージ 20~21 の肢芽間葉へ pEGFP を導入した。

A, E: 導入後、3 時間後にはすでに発現が見られる。  
 B, F: さらに 6 時間後には発現が強くなる。  
 C, G: 12 時間後には発現のピークに達する。  
 D, H: 24 時間後には発現は次第に弱くなるが、少なくとも発現は 48 時間持続する。

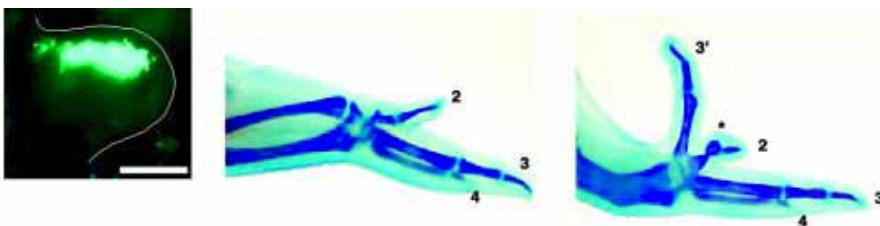
スケールバー: A, E とも 1mm



### LacZ 遺伝子のニワトリ胚肢芽への導入

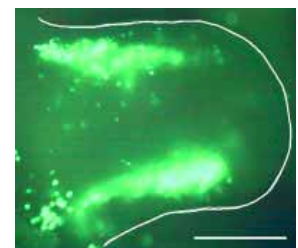
A: HH ステージ 20~21 の肢芽間葉に LacZ 遺伝子を導入し、12 時間後にガラクトシダーゼの検出を行った。白線は B の切片の位置を示す。

B: ガラクトシダーゼポジティブな細胞 (青) は肢芽間葉内においてパッチ状に検出される。



### 過剰指の誘導

A: HH ステージ 20~21 の肢芽間葉へ pEGFP のみ及び、pEGFP と pCAGGS-cShh の co-injection を行い、12 時間後 GFP の検出を行った。  
 スケールバー: 1mm  
 B: GFP 遺伝子のみを導入した肢芽は正常な翼を形成した。  
 C: pEGFP と pCAGGS-cShh の co-injection を行った肢芽は過剰な第三指 (3) が誘導された。数字は指の番号を示す。\*: 余剰な軟骨の断片



### 肢芽間葉への連続遺伝子導入

HH ステージ 20~21 の肢芽間葉の前方へ遺伝子を導入した後、連続して後方にも遺伝子を導入した。12 時間後、肢芽の前方と後方の間葉に GFP の発現を確認した。  
 スケールバー: 1mm

熊本大学生命資源研究・支援センター・動物資源開発研究部門 (CARD) 太田将氏・山田源先生 提供  
 秀潤社「細胞工学 Volume 23, Number 1, 248-251 ページ, 2004 年 1 月号」転載

## アプリケーション (ソニトロン 2000・ソノポール 4000)

### ソノレーション法によるマウス胚の外生殖器、ニワトリ胚の肢芽への遺伝子導入 [文献 2]



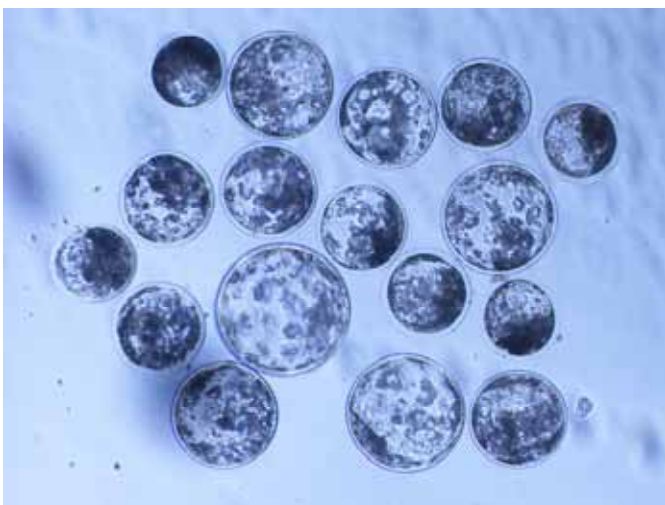
マウス胚の外生殖器 (E13.5) に GFP 遺伝子 (pCAGGS-GFP) を導入し、12 時間の器官培養後、GFP 発現を観察した。



ニワトリ胚の肢芽 (day3) に GFP 遺伝子 (pCAGGS-GFP) を導入し、24 時間後、GFP 発現を観察した。

熊本大学生命資源研究・支援センター・動物資源開発研究部門 (CARD) 太田将氏 提供

### 超音波を用いたブタ卵子活性化法 [文献 3]



超音波によって活性化した卵母細胞から発育したブタの胚盤胞

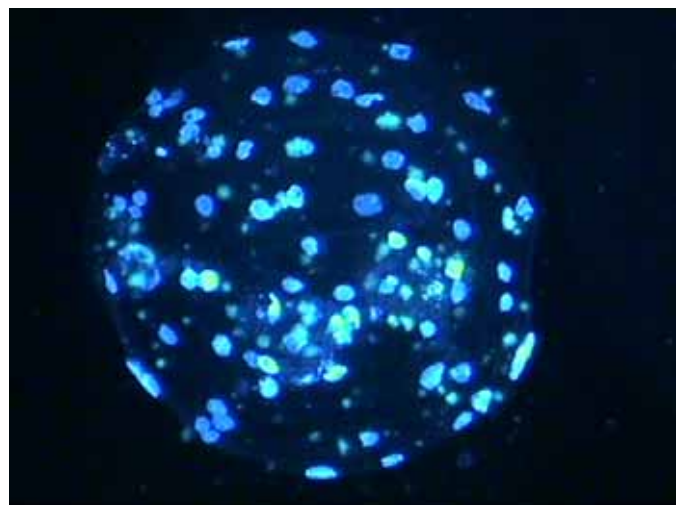
超音波の照射条件は次の通りです。

エネルギー:  $2.0\text{W}/\text{cm}^2$ 、デューティーサイクル: 10%

照射時間: 30 秒

ソルビトールベースの培地を使用

鹿児島大学 農学部 生物生産学科 三好和陸先生 提供

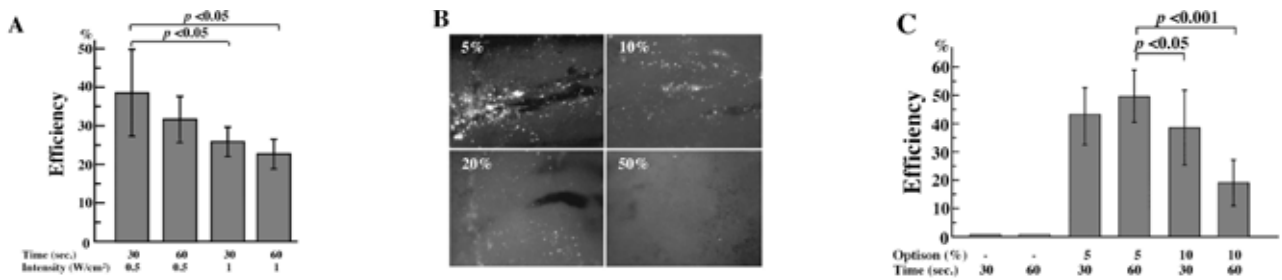


胚盤胞をヘキスト 33342 で染色した画像



# アプリケーション (ソニトロン 2000・ソノポール 4000)

## 超音波遺伝子導入治療法による象牙質再生 [文献 4]



### 歯髄幹細胞への超音波遺伝子導入の最適化

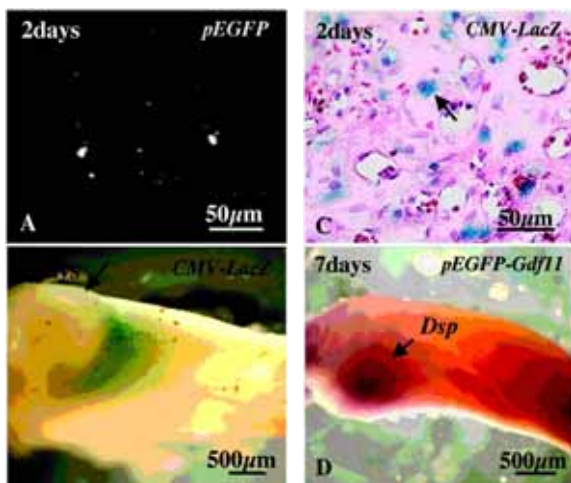
図 A: 超音波の強度と照射時間による遺伝導入の変化 (オプチゾン 10%、周波数 1MHz)

歯髄組織に *CMV-LacZ* ベクターを導入して 48 時間後、凍結切片にしてガラクトシダーゼ発現細胞の比率を数え効率を測定した。強度  $0.5W/cm^2$ 、照射時間 30 秒の時、最適の結果を得た。

図 B: 歯髄組織の中への *pEGFP* ベクター遺伝子導入とオプチゾンの濃度 (超音波条件: 周波数 1MHz、強度  $0.5W/cm^2$ 、照射時間 30 秒)

オプチゾン 5% で、最適の結果を得た。20% では減少し、50% で激減した。

図 C: オプチゾンの濃度と照射時間 濃度 5% が最適で、照射時間 30 秒 ~ 60 秒の時、最適の結果を得た。



In Vitro 器官培養による象牙芽細胞のマーカ-*dentin sialphospho-protein (Dsp)* mRNA の発現誘導

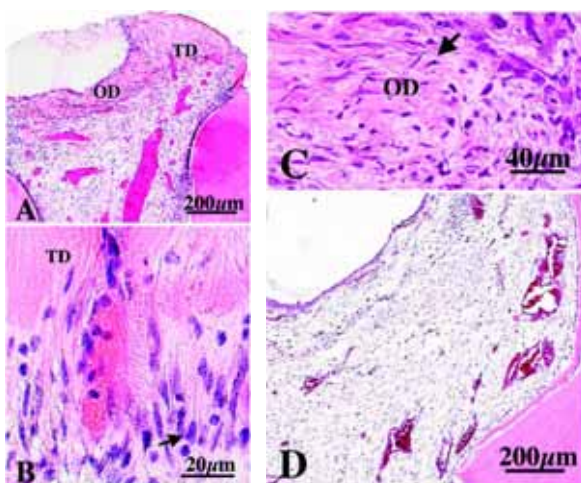
歯髄組織は、抜歯後に切断されて、*pEGFP-TIMP(A)*、*CMV-LacZ* ベクター(B, C)、及び *pEGFP-TIMP-Gdf11* ベクター(D)を遺伝子導入して器官培養された。

図 A: 共焦点レーザー顕微鏡下で *GFP* を観察したところ、切断面から深さ  $500\mu m$  にまで、歯髄細胞内に *GFP* 遺伝子が入り込んでいることが判明した。

図 B: ガラクトシダーゼ染色により切断面(矢印)の歯髄組織は、均一に遺伝子が導入され、非侵襲で、壊死がないことが判明した。

図 C: 超音波遺伝子導入された領域の歯髄細胞の導入遺伝子 *LacZ* 発現(矢印)。

図 D: 超音波遺伝子導入 7 日後、whole-mount in situ ハイブリダイゼーション解析により、切断面から深さ  $500\mu m$  まで *DSPP* mRNA 発現(矢印)がみられた。



イヌ歯髄切断面に *growth differentiation factored 11 (Gdf11)* を In vivo 超音波遺伝子導入後、1 ヶ月所見。

*pEGFP-TIMP-Gdf11* ベクター(A-C)  $40\mu g$  とコントロールとして *pEGFP-TIMP* ベクター(D)  $40\mu g$  を周波数 1MHz、強度  $0.5W/cm^2$ 、照射時間 30 秒の条件で超音波遺伝子導入。

図 A: 歯髄切断面に細管象牙質(TD)と修復象牙質(OD)の形成がみられる。

図 B: 新しく形成された細管象牙質(TD)の高倍率

長い細胞突起(矢印)をもつ象牙芽細胞様細胞がみられる。

図 C: 象牙芽細胞(矢印)周囲に基質が産生され、修復象牙質(OD)中に象牙芽細胞が埋もれている。

図 D: コントロールは、細管象牙質(TD)と修復象牙質(OD)の形成がみられない。

国立長寿医療センター研究所口腔疾患研究部 口腔機能再生研究室 中島美砂子先生 提供

Human Gene Therapy, Volume 14, Number 6, Pages 591-597, April 2003 参考