

厚生科学研究費補助金
高度先端医療研究事業

厚生科学研究費補助金総括研究報告書

生物材料の特性を利用したバイオ血液
浄化システムの開発

1999年度

平成12年3月

主任研究者 鈴木 盛一
(国立小児病院小児医療研究センター)

分担研究者 絵野沢 伸
雨宮 浩
菅 健一
藤村 昭夫
松村外志張

生物材料の特性を利用したバイオ血液浄化システムの開発

主任研究者 鈴木盛一 国立小児病院小児医療研究センター実験外科生体工学部 部長

研究要旨： 現状の工学的血液浄化法を一步進め、毒性物質の選択的能動輸送を行うバイオ血液浄化法の基礎的素材の開発を行った。毒性物質の除去のためにヒト肝細胞株HepG2に遺伝子工学的に酵素を発現させアンモニア除去能とグルクロン酸抱合能を付与した。能動輸送系の確立のためにウサギおよびヒト腎細胞株（それぞれ、PCTL、ACHN）に薬物輸送膜タンパクMulti Drug Resistance Proteinを導入した。前者については中空糸モジュールでジゴキシンの能動輸送がなされることを確認した。器材面ではこれら細胞の培養基質として超微細繊維の有効性がわかり培養装置との組合せにより能動輸送の可能なモジュールを作り得ることがわかった。また、バイオ血液浄化法による肝再生効果を見るためのラット大量肝切除モデルの基礎検討ができた。

A. 研究目的

本研究では現行の血液浄化法に対し全く異なった概念で新しい治療技術を確立することを目的とする。現在、肝不全や敗血症、薬物中毒等の治療では透析・濾過と輸液・血漿輸血を組合せ患者の血液を交換することによって浄化を試みている。バイオ血液浄化システムでは細胞リアクターを組み込むことにより細胞の有する選択性と能動輸送能力を利用し生体に不要な分子のみを排除する効率的な治療法を構築する。一方、現行の血液浄化法では新鮮血漿を大量に消費することが大きな問題となっている。一人の患者に対し一地域の血漿プールをすべて供出するという事態も少なからず出現する。また、不特定多数のヒトから集められた生物製材という性格上、感染症移入の危険性も排除しきることができない。バイオ血液浄化システムのもう一つの目的は血漿への依存を軽減することである。本研究のバイオ血液浄化システムは多くの点でいわゆるハイブリッド（あるいはバイオ）人工肝と類似する点が多い。しかしながら、後者は肝を人工的に構築してきただけ肝機能を現出するという方向で研究が進められている。ところがある試算によれば肝障害のあるヒトの全肝機能を生存可能なレベルまで補助することは現在の人工肝ではまだまだ不足である。我々の目的は全肝機能を表出させるというものではなく、現行の血液浄化法を革新するために細胞材料の特性を最大限に発揮させようというものである。また、ハイブリッド人工肝では家畜あるいは実験動物ブタより分離した肝細胞を細胞リアクターとして利用している。無菌ブタは入手可能であるがブタには内因性レトロウイルス感染があり、最近、ヒト細胞への感染性が報告された。我々は基本的にヒト由来細胞株を利用するために異種細胞を用いることによる問題は回避でき、臨床治験あるいは応用への倫理その他の障壁はブタ肝細胞利用システムよりはるかに低く近未来的な新規治療法の創生が期待できる。

B. 研究方法

1) 遺伝子工学による特定機能を付加・強化した細胞株の作成

既に、我々は本来アンモニアを代謝する能力を有しないHepG2細胞にグルタミン合成酵素を導入し、細胞外のアンモニアを効率的に除去する細胞を有している。本研究の初段階として、この細胞に薬物代謝酵素Cytochrome P-450（ヒト由来3A4遺伝子）とビリルビン抱合酵素UDP-glucuronosyltransferaseを導入する。前者は基質となる薬物の範囲が比較的広く多くの薬物を代謝する。一方、後者は遊離ビリルビンにグルクロン酸を抱合する酵素である。これら遺伝子はすでに入手しており、さらに一方はプラスミドとしてすぐに実験可能な状態にある。両者とも生理的な役割として基質の水溶性を増し血中から腎を介した排泄過程の前段階

を担う。そこで、本システムではこの第一段階の水溶化と連携すべく、細胞膜の薬物結合糖タンパク（Multidrug resistance protein, MDR）を強制発現したウサギ腎細胞（PCTL-MDR）を利用し、血液中からの一次代謝薬物分子の除去システムを構築する。また、臨床応用を鑑みヒト由来腎細胞株にMDRの導入を行う。

2) 体外循環型ハイブリッド人工肝プロトタイプの開発

物質生産用の回流式培養装置の特性を生かしながら細胞リアクターに改変するため、現在、プロトタイプを作成している。細胞に適した環境と生体に適した環境は一概に一致しない。例えば培地のアミノ酸組成と体液のアミノ酸組成は異なる。これを無理に同一の条件で接触させると、細胞が本来の機能を発揮できなくなったりあるいは生体が細胞を養うといった逆転現象が起りかねない。この点を克服するために患者血漿、細胞、培地の3相を調和させたモデルを設計・作成し、in vitroの培養実験により細部の修正を行っている。さらに、本装置に続ける腎細胞培養用二次浄化リアクターの開発を行う。

3) 血液浄化機能評価系の確立

実験プロトコルとして、家畜ブタを用いた外科的阻血性肝不全モデル（門脈、肝動脈遮断、遠心性血液ポンプ（バイオポンプ）による門脈血の右心への返血）をほぼ確立している。このモデルと薬物添加によりバイオ血液浄化システムの効果判定は可能と考えられる。さらに、本システムでは生体の回復にとり有用な分子は除去しないという点が新規治療技術として有効か否かを検討しなくてはならない。この点に関しては致死性肝大量切除モデルの試行を考える。すなわち、肝再生が誘導されない程の大量切除を行い、バイオ血液浄化システム適用による再生促進現象を捉える実験系をラット等小動物で組む。

C. 研究結果・考察

1) 遺伝子工学による特定機能を付加・強化した細胞株の作成

肝芽腫由来細胞株HepG2にグルタミン合成酵素遺伝子を導入し同酵素阻害剤であるメチオニンスルフォキシイミン存在下で選択することによりアンモニア代謝可能な細胞（GS-HepG2）とした。得られた細胞株のアンモニア代謝能を肝不全患者の血中アンモニア濃度であるアンモニア濃度0.1mM条件下で検証した。その結果この細胞株を用いることによりアンモニア濃度を減少させることが可能であった。アンモニア代謝能は 3.4×10^{-15} mol/ cell/ hであった。このアンモニア代謝は尿素サイクルによるものではなかった。さらに、グルタミン酸濃度を強化することにより、その代謝活性を3倍に高める事ができた。また、アンモニア代謝活性を初代肝細胞と比較するために初発アンモニア濃度1mM濃度条件下でのアン

モニア代謝能を検証した結果初代肝の約1/3の活性となった。次に肝由来の解毒機能として薬物代謝能に注目し、薬物代謝遺伝子を組み込んだ細胞株構築を試みた。まず、薬物代謝を担う遺伝子としてP450遺伝子に注目した。多種類のP450遺伝子のうち、ヒトにおいて約30%を担うCYP3A4遺伝子を選択し、この遺伝子をCMVプロモータ下流に持つ発現ベクターを構築した。現在ベクターの確認を行っている。一方、薬物代謝第2相酵素であるUDP-glucuronosyltransferaseはハイグロマイシン耐性遺伝子を有するプラスミドをGS-HepG2に導入し同酵素発現クローンを得た。現在、その活性を測定している。

ウサギ腎細胞PCTL-MDRによる薬物の能動輸送実験は中空系モジュールにて行った。ジゴキシンの能動輸送が観察され、これはペラバミルで阻害されることからPCTLに導入したMDRによるものであることがわかった。ヒト腎細胞癌株ACHNのリアクター細胞への応用の初段階として、PCTLと同様にMDRを導入し、コルヒチン150ng/mlに耐性の細胞をクローニングできた。Western blotによると、この細胞はMDR蛋白を元のACHNの7.5±1.2倍発現していた(n=3)。多孔質フィルター(Transwel TM)上に培養したこのクローンはジゴキシンの、ドキシソルピシンをそれぞれ元のACHNの5.9±1.1倍、6.7±1.9倍多く輸送していた(n=4)。これを細胞培養用ホロファイバー型モジュール(カルチャーフロー、TM)に培養すると、ジゴキシンは、やはり元のACHNを培養した場合の7.9±1.5倍多く輸送した(n=3)。このように、ヒト尿細管由来の培養細胞においてもMDR遺伝子導入による新たな機能付加が可能であった。この細胞はヒトの血液成分との接触によっても異種細胞よりは抗原とはなりにくく、本研究におけるバイオ血液浄化システム作成のためには、より好条件を持った細胞であると考えられる。今後は、このACHNを題材として、更に様々な機能(特にビリルビン抱合体の輸送など)の付与を目指す予定である。

2) 体外循環型ハイブリッド人工肝プロトタイプの開発
血液浄化能を付与したハイブリッド型補助人工臓器の技術開発を目的として、装置の中心部分となる細胞固定化基質の探索、ならびにその機能性検討を行った。生体内において肝細胞が担っている毒性物質の解毒機能、ならびに腎の近位尿細管細胞が担っている代謝産物の排出機能の機能を人工的な細胞リアクター内に発現させるために、肝細胞としてHepG2、ならびに腎近位尿細管細胞株としてPCTLウサギ腎細胞株をモデル細胞として選択し、これら細胞の生育が可能で、かつPCTL細胞については基質膜上に層状に増殖し、界面の形成を可能とするような膜状素材を探索検討した。臨床応用において求められる強い膜強度、ならびに柔軟性に配慮して検討した結果、ナイロンならびにポリエステル混紡の微細繊維織布に適性が認められた。すなわち、この織布は細胞の直径よりさらに細い繊維よりなっていて、ならぬ表面を加工することなく、HepG2ならびにPCTL細胞が付着するばかりでなく、細胞が繊維を取り込んだ形で強固に付着していることが電子顕微鏡によって確認された。さらにPCTL細胞にあつては、微細繊維の表面上に層状に増殖して、界面を形成することが、これも光学顕微鏡ならびに電子顕微鏡によって認められた。さらに、HepG2細胞とPCTL細胞を、本微細繊維織布上で混合培養した結果では、これら2種類の細胞は、互いに他の細胞を排除することなく、共存して増殖することが明らかとなった。これらの結果から、肝細胞による解毒機能と腎細胞による毒性物質排出機能とを細胞リアクターモジュール内で組み合わせ、さらに能動輸送を可能とする3相共存型モジュールが原理的に可能であると示された。

3) 血液浄化機能評価系の確立

家畜ブタ使用モデルでネックとなっていた体外循環経路への

血液流量の増加を、門脈-頸静脈シャントに用いている遠心性血液ポンプ経路を利用することで今までの8~10倍程度まで上昇させることができた。ラットを用いた肝再生モデルでは肝の90%ないし95%の大量肝切除モデルについて肝再生過程を調べた。これによると通常の実験的肝切除(70%)の場合より細胞増殖が遅延することがわかった。この系を用いてバイオ血液浄化法の肝再生への有効性を検討する予定である。

D. 研究発表

[学会発表]

1. Enosawa S, Sakuragawa N, Mitani T, Li XK, Tamura A, Suzuki S, Amemiya H.

A novel cell population which shows hepatocyte-like differentiation markers in human amniotic epithelial cells-A possible gene carrier for cell therapy.

The Cell Transplant Society, Fourth International Congress. Montreux, Switzerland, March 21-24, 1999.

2. 絵野沢 伸, 宮下 智之, 田村 明彦, 李 小康, 鈴木 盛一, 雨宮 浩, 高村 政範, 松村 外志張, 大政 健史, 山中 貢, 菅 健一

ハイブリッド人工肝構築を目的としたアンモニア代謝能付加HepG2細胞の回流培養装置(キグナス)による大量持続培養.

第7回細胞療法研究会, 東京, 4月23日, 1999.

3. Miyasita T, Enosawa S, Tamura A, Li X-K, Suzuki S, Amemiya H, Matumura T, Omasa T, Yamanaka M, Hiramatsu S, Suga K, Aoki T, Koyanagi Y.

Development of bioartificial liver with glutamine synthetase-transfected recombinant human hepatoblastoma cell line, HEP-G2.

The 6th Congress of the Asian Society of Transplantation, Singapore, September 20-24, 1999.

4. 絵野沢 伸, 宮下 智之, 田村 明彦, 鈴木 盛一, 雨宮 浩, 大政 健史, 菅 健一, 高村 政範, 松村 外志張
グルタミン合成酵素導入HepD2細胞をリアクターとしたハイブリッド人工肝の機能と効果.

第37回日本人工臓器学会, 名古屋, 10月14-16日, 1999.

[論文発表]

1. Enosawa S, Miyashita T, Suzuki S, Li XK, Tsunoda M, Amemiya H, Yamanaka M, Hiramatsu S, Tanimura N, Omasa T, Suga K, Matsumura T. Long-term culture of glutamine synthetase-transfected HepG2 cells in circulatory flow bioreactor for development for a bioartificial liver. Cell Transplantation in press.

2. Miyashita T, Enosawa S, Suzuki S, Tamura A, Tanaka H, Amemiya H, Matsumura T, Omasa T, Suga K, Aoki T, Koyanagi Y. Development of Bioartificial Liver with Glutamine Synthetase Transduced Recombinant Human Hepatoblastoma Cell Line, HepG2. Transplant Proc in press.

3. 絵野沢 伸, 宮下智之, 田村明彦, 鈴木盛一, 雨宮 浩, 大政 健史, 菅 健一, 高村政範, 松村外志張. グルタミン合成酵素導入HepG2細胞をリアクターとしたハイブリッド人工肝の機能と効果. 肝臓 41(3): 237-238, 2000.

遺伝子組換え細胞を用いた肝解毒機能を有する細胞株の開発に関する研究

分担研究者 菅 健一 大阪大学大学院工学研究科 応用生物工学専攻 教授

研究要旨：本研究では、バイオ血液浄化法の開発を目指し、遺伝子組換えの手法を用いて、肝解毒機能を持たせた細胞を構築することを目的とした。まず、肝臓の解毒機能としてアンモニア代謝を選択し、肝臓におけるアンモニア代謝の主反応であるグルタミン合成酵素遺伝子を肝由来の細胞株 HepG2 に組み込んだ。その結果、アンモニア解毒可能な細胞株を構築できた。さらに、薬物代謝酵素の組み込みを目指し、薬物代謝遺伝子である P450 遺伝子を含む動物細胞発現ベクターを構築した。

A. 研究目的

本研究では、バイオ血液浄化法の開発を目指し、肝臓の解毒機能を持たせた細胞株を構築することを目的とした。具体的には、まず、血中アンモニアの選択的解毒に着目し、肝臓においてアンモニアの主要代謝酵素であるグルタミン合成酵素を肝由来の HepG2 細胞株に組み込む。さらに、次の解毒機能として薬物代謝能を持たせることについて検討した。

B. 研究方法

ヒトサイトメガロウイルスプロモーターの下流にグルタミン合成酵素遺伝子を含む pBK-CMV-GS ベクターを構築し、これを用いて、肝由来の HepG2 細胞株(アンモニア解毒機能は無い)を形質転換し、アンモニア代謝細胞を選択した。さらに得られたアンモニア代謝細胞のアンモニア代謝能を初発アンモニア濃度を变化させた培養を用いて検討した。

C. 研究結果

形質転換した細胞株をグルタミン合成酵素阻害剤であるメチオニンスルフォキシイミン存在下で選択することにより、アンモニア代謝可能な細胞株を構築した。

得られた細胞株のアンモニア代謝能を、肝不全患者の血中アンモニア濃度であるアンモニア濃度 0.1mM 条件下で検証した。その結果、この細胞株を用いることにより、アンモニア濃度を減少させることが可能であった。そのアンモニア代謝能は 3.4×10^{-15} mol/cell/h であった。このアンモニア代謝は尿素サイクルによるものではなかった。さらに、グルタミン酸濃度を強化することにより、その代謝活性を 3 倍に高める事ができた。また、アンモニア代謝活性を初代肝細胞と比較するために初発アンモニア濃度 1mM 濃度条件下でのアンモニア代謝能を検証した結果、初代肝の約 1/3 の活性となった。

次に肝由来の解毒機能として薬物代謝能に注目し、薬物代謝遺伝子を組み込んだ細胞株構築を試みた。まず、薬物代謝を担う遺伝子として P450 遺伝子に注目した。多種類の P450

遺伝子のうち、ヒトにおいて約 30%を担う CYP3A4 遺伝子を選択し、この遺伝子を CMV プロモータ下流に持つ発現ベクターを構築した。現在、ベクターの確認を行っている。

D. 考察

遺伝子組換えにより、グルタミン合成酵素活性を強化することでアンモニア代謝能力の無い HepG2 細胞株に肝由来解毒機能としてアンモニア代謝能を持たせた GS-HepG2 株を構築できた。従って同様の手法で解毒機能、特に薬物代謝能を細胞株に持たせることは可能であると考えられる。

E. 結論

肝由来解毒機能としてアンモニア代謝をグルタミン合成酵素を組み込んだ HepG2 細胞を構築し、遺伝子増幅の手法を用いて、アンモニアを代謝する細胞を構築した。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) T. Omasa *et al.* In; "New Era of Biochemical Engineering and Biotechnology" (1999) Jinda Electronics Pub
- 2) 大政健史ら ケミカルエンジニアリング 45, (2000) (印刷中)
- 3) T. Yoshikawa *et al.* Cytotechnology 33, (2000) (In press)

2. 学会発表

- 1) 平松慎也ら 日本動物細胞工学会 1999 年度大会 99 年 6 月、東京
- 2) 平松慎也ら 日本生物工学会平成 11 年大会 99 年 9 月、吹田
- 3) 平松慎也ら 化学工学会第 32 回秋季大会 99 年 9 月、金沢
- 4) T. Omasa *et al.* Asia-Pacific Biochemical Engineering Conference 1999 (APBIOChEC'99), Nov 15-18, Phuket, Thailand
- 5) T. Omasa *et al.* Cell Culture Engineering VII Feb. 5-10, 2000, Santa Fe, USA

研究要旨：今まで筆者らはウサギ由来の腎培養細胞に遺伝子を導入し機能解析を行ってきたが、今回バイオ血液浄化システム作成の趣旨に沿うべくヒト由来腎細胞株を用いて、遺伝子導入およびホロファイバー型モジュール上への培養を行った。今後、この細胞をバイオ血液浄化システムのバイオリクターに培養するとともに、このヒト由来の細胞に異なった遺伝子の導入も試みる予定である。

A. 研究目的

抗癌薬輸送蛋白である多剤耐性蛋白質 (Multidrug resistance protein, MDR) をヒト腎尿細管由来の培養細胞に過剰発現させた、新しいヒト由来の細胞を作成する。そして、基質となる薬物の経細胞輸送が遺伝子導入により高まっているかを検討する。さらに、新型バイオリクター試用の前に、この細胞がホロファイバー型モジュール上に培養可能か否かを検討する。

B. 研究方法

ヒト腎細胞癌株 (ACHN) を ATCC より購入し、ここにヒト MDR を含むプラスミド pHIR-MDR を electroporation 法にて導入する。これを G418 および MDR 基質であるコルヒチンに対する耐性度を目安として、高頻度発現細胞をクローニングする。さらに Western blot により発現を確認する。このクローン化した細胞を多孔質フィルター上に培養し、基底膜側から管腔膜側への MDR 基質 (ジゴキシン、ドキシソルピシン) 輸送能を測定する。また、これを細胞培養用ホロファイバー型モジュールに培養し、基質薬物輸送能を検討する。

C. 研究結果・考察

ACHN に MDR を導入し、コルヒチン 150 ng/ml に耐性の細胞をクローニングできた。Western blot によると、この細胞は MDR 蛋白を元の ACHN の 7.5 ± 1.2 倍発現していた (n=3)。多孔質フィルター (Transwell TM) 上に培養したこのクローンはジゴキシン、ドキシソルピシンをそれぞれ元の ACHN の 5.9 ± 1.1 倍、6.7 ± 1.9 倍多く輸送していた (n=4)。これを細胞培養用ホロファイバー型モジュール (カルチャーフロー、TM) に培養すると、ジゴキシンは、やはり元の ACHN を培養した場合の 7.9 ± 1.5 倍多く輸送した (n=3)。このように、ヒト尿細管由来の培養細胞においても MDR 遺伝子導入による新たな機能付加が可能であった。この細胞はヒトの血液成分との接触によっても異種細胞よりは

抗原とはなりにくく、本研究におけるバイオ血液浄化システム作成のためには、より好条件を持った細胞であると考えられる。今後は、この ACHN を題材として、更に様々な機能 (特にビリルビン抱合体の輸送など) の付与を目指す予定である。

D. 結論

バイオ血液浄化システム作成のために、ヒト腎尿細管由来の培養細胞を用いて、MDR 遺伝子の導入を行い、高機能化に成功した。さらに、この細胞を細胞培養用ホロファイバー型モジュールに培養することが可能であった。

E. 研究発表

[論文発表]

1. Tsuruoka S, Sugimoto K, Ueda K, Suzuki M, Imai M, Fujimura A. Removal of digoxin and doxorubicin by multidrug resistance protein-overexpressed cell culture in hollow fiber. *Kidney International* 56: 154-163, 1999.

要旨: 血液浄化能を付与したハイブリッド型補助人工臓器の技術開発を目的として、装置の中心部分となる細胞固定化基質の探索、ならびにその機能性検討を行った。肝細胞としてHep-G2ヒト肝癌由来細胞株、ならびに腎近位尿管細胞株としてPCTL家兎細胞株をモデル細胞として選択し、ナイロンならびにポリエステル混紡の微細繊維織布を基質として共培養を行った。これら2種類の細胞は、互いに他の細胞を排除することなく、共存して増殖することが明かとなり、肝細胞による解毒機能と腎細胞による毒性物質排出機能とを細胞リアクターモジュール内で組み合わせることが原理的に可能であることが示された。さらに、この分野におけるヒト組織・細胞の研究利用に関わる法・倫理・安全に関わる資料を収集、整理ならびに分析し、わが国の医療分野における今後のバイオテクノロジーの展開に備えた。

血液浄化能を付与したハイブリッド型補助人工臓器の技術開発を目的として、装置の中心部分となる細胞固定化基質の探索、ならびにその機能性検討を行った。生体内において肝細胞が担っている毒性物質の解毒機能、ならびに腎の近位尿管細胞が担っている代謝産物の排出機能の機能を人工的な細胞リアクター内に発現させるために、肝細胞としてHep-G2ヒト肝癌由来細胞株、ならびに腎近位尿管細胞株としてPCTL家兎細胞株をモデル細胞として選択し、これら細胞の生育が可能で、かつPCTL細胞については基質膜上に層状に増殖し、界面の形成を可能とするような膜状素材を探索検討した。臨床応用において求められる強い膜強度、ならびに柔軟性に配慮して検討した結果、ナイロンならびにポリエステル混紡の微細繊維織布に適性が認められた。すなわち、この織布は細胞の直径よりさらに細い繊維よりなっていて、ならら表面を加工することなく、HepG2ならびにPCTL細胞が付着するばかりでなく、細胞が繊維を取り込んだ形で強固に付着していることが電子顕微鏡によって確認された。さらにPCTL細胞にあつては、微細繊維の表面上に層状に増殖して、界面を形成することが、これも光学顕微鏡ならびに電子顕微鏡によって認められた。さらに、HepG2細胞とPCTL細胞を、本微細繊維織布上で混合培養した結果では、これら2種類の細胞は、互いに他の細胞を排除することなく、共存して増殖することが明かとなった。これらの結果から、肝細胞による解毒機能と腎細胞による毒性物質排出機能とを細胞リアクターモジュール内で組み合わせることが原理的に可能であることが示された。

さらに、この分野におけるヒト組織・細胞の研究利用に関わる法・倫理・安全に関わる資料を収集、整理ならびに分析し、わが国の医療分野における今後のバイオテクノロジーの展開に備えた。

【学会発表、論文ならびに特許出願による成果報告】 1. 細胞リアクター/人工臓器の技術開発ならびに技術評価

a. 学会発表

1. 児玉亮、立石哲也、絵野沢伸、松村外志張、多孔質材料(PTFE不織布)を用いた人工肝用バイオリアクター、日本人工臓器学会大会(1999.10.14.名古屋)人工臓器28(4)S-82(1999)
2. 絵野沢伸、宮下智之、田村明彦、鈴木盛一、雨宮浩、大政健史、菅健一、高村政範、松村外志張、グルタミン合成酵素導入HepG2細胞をリアクターとしたハイブリッド人工肝の機能と効果、日本人工臓器学会大会(1999.10.14.名古屋)人工臓器28(4)S-82(1999)

b. 特許出願

3. 松村外志張、高村政範、絵野沢伸、鈴木盛一、雨宮浩、吉田典雄、極微細繊維を基材とする動物細胞固定化技術、特願2000-50214(2000).

2. 肝細胞の培養と応用

a. 論文

1. T. Matsumura, Cellular Genealogy of in-vitro Senescence and Immortalization. in "Progress in Molecular and Subcellular Biology" vol. 24: 103-119, ed. A. Macieira-Coelho, Springer Verlag, Heidelberg, Germany (1999).

b. 学会発表

1. 小田宗宏、角尾肇、小池克郎、鈴木靖徳、松村外志張、

ヒト肝細胞株を用いたB型肝炎ワクチン開発の技術的基礎、日本組織培養学会第72回大会シンポジウム(富山1999.5.20.)、組織培養研究18(1)31(1999).

3. 血清蛋白質の組換え生産

a. 論文

1. Ikai, A, Ookata, K., Shimizu, M., Nakamichi, N., Ito, M., Matsumura, T. A recombinant bait region mutant of human $\alpha 2$ -macroglobulin exhibiting an altered proteinase-inhibiting spectrum. Cytotechnology 31:53-60(1999).
4. 組換え生産の高効率化技術開発

a. 論文

1. Hirota, Y., Maeda, T., Yan, H., Nakamichi, N., Matsumura, T. A possible function of DNA curvature in a vector system that allows efficient expression of heterogeneous proteins in CHO cells. Nucleic Acids Symposium Series 42:87-88(1999).
2. Nakamichi, N., Ito, M., Maeda, T., Matsumura, T., Detection and cDNA cloning of H-strand mitochondrial regulatory region RNAs in cultured cells and human tissues. Cytotechnology in press.

b. 学会発表

1. 廣田美子、前田拓志、Hua Yan、中道昇、松村外志張、組換えCHO細胞を用いたrDNA非転写スペーサー領域由来DNA配列の機能解析、日本分子生物学会大会(福岡1999.12.7.)
2. 廣田美子、前田拓志、Hua Yan、中道昇、松村外志張、組換えCHO細胞における外来遺伝子発現の制御—ベントDNAを用いた解析—、核酸化学シンポジウム(前橋1999.11.10.)
3. 中道昇、伊藤真美子、巖華、松村外志張、組換え動物細胞による有用タンパク質生産の高効率化—転写物の構造解析からの翻訳最適化の試み—、日本農芸化学会2000年大会シンポジウム(東京)日本農芸化学会会誌74(3)468(2000)
4. 巖華、廣田美子、前田拓志、松村外志張、rDNA非転写スペーサー配列を用いた組換え生産系の構築、農芸化学会2000年大会ワークショップ(東京)日本農芸化学会会誌74(3)346(2000)

c. 特許出願

1. 中道昇、廣田美子、伊藤真美子、前田拓志、巖華、松村外志張、真核細胞用組換え発現ベクター、特願平11-170355(1999)
5. ヒト組織・細胞利用の社会的受容性

a. 学会発表

1. 松村外志張、増井徹、平井玲子、ヒューマンバイオマテリアルをどう取り扱うか—ヒト組織・細胞取り扱いの法、倫理、安全面での検討—、日本組織培養学会シンポジウム(1999.11.26.)、組織培養研究18(3):189-194(1999)

b. 翻訳

1. 松村外志張、崎川尚美、研究使用目的でのヒト組織細胞と生命材料、MRC作業部会1999.11.報告書、組織培養研究(印刷予定)

19990424

以降のページは雑誌／図書等に掲載された論文となりますので
「研究成果の刊行に関する一覧表」をご参照ください。

4. 研究成果の刊行に関する一覧表

刊行書籍又は雑誌名（雑誌のときは雑誌名、巻号数、論文名）	刊行年月日	刊行書店名	執筆者氏名
Cell Transplantation, in press. Long-term culture of glutamine synthetase-transfected HepG2 cells in circulatory flow bioreactor for the development for a bioartificial liver.	2000	Pergamon Press	Enosawa, Miyashita, Suzuki, et al.
Transplant Proc, in press. Development of bioartificial liver with glutamine synthetase transfected recombinant human hepatoblastoma cell line, HepG2.	2000	Elsevier Sci Inc.	Miyashita, Enosawa Suzuki, et al.
肝臓 41(3): 237-238. グルタミン合成酵素導入HepG2細胞をリアクターとしたハイブリッド人工肝の機能と効果.	2000	日本肝臓学会	絵野沢、宮下、田村他.
New Era of Biochemical Engineering and Biotechnology. CD-ROM publish Expression and amplification of glutaminy synthetase gene for constructing ammonia-metabolizing cell lines in hybrid artificial liver support system.	1999	Jinda Electronics Pub	Omasa, Yamanaka, Hiramatsu, et al.
ケミカル・エンジニアリング 1月号 33-39. ハイブリッド人工肝臓に適したアンモニア代謝細胞の開発.	2000	化学工業社	大政健史
Kedney International 56: 154-163. Removal of digoxin and doxorubicin by multidrug resistance protein-overexpressed cell culture in hollow fiber.	1999	International Society of Nephrology	Tsuruoka, Sugimoto, Ueda, et al.

刊行書籍又は雑誌名（雑誌のときは雑誌名、巻号数、論文名）	刊行年月日	刊行書店名	執筆者氏名
Progress in Molecular and Cellular Subcellular Biology 24: 103-119. Cellular genealogy of in vitro senescence and immortalization.	1999	Springer-Verlag	Matumura.
Cytotechnology 31: 53-60. A recombinant bait region mutant of human α 2-macroglobulin exhibiting an altered proteinase-inhibiting spectrum.	1999	Kluwer Academic Pub	Ikai, Ookata, Shimizu, et al.
Nucleic Acids Symposium Series 42: 87-88. A possible function of DNA curvature in a vector system that allows efficient expression of heterogeneous proteins in CHO cells.	1999	Oxford Univ Press	Hirota, Maeda, Yan, et al.