

治療の不可欠の一部として行われる機会も多く、リスクも増大する。これらの処置は、CMV や EBV などの外因性ウイルスの伝播のリスクを有し、絶望的な基礎疾患を有する患者に重大な結果をもたらすという。重症の火傷を受けた患者は、単純ヘルペスウイルス侵入を極めて受けやすいともいわれている。骨髄移植受容者では、ヘルペスウイルスの 1 種以上あるいは、6 種全部 (HSV-1, HSV-2, VZV, CMV, EBV, HHV-6) が再活性化されたという。このような患者の 25% が CMV 肺炎で死亡していたと報告されている。従って、移植医療の進歩に伴う、免疫低下時における EBV, CMV などのヘルペスウイルス感染症のコントロールは緊急の課題であるといわれている。

そこで、材料の種類により、ウイルスの増殖を高めるもの、あるいは、逆に、抑えるものなど、材料の化学的性質や滅菌処理による影響を評価するために、組織工学で従来頻繁に研究されているコラーゲンをモデル材料として選び評価した。また、滅菌の程度による影響をみるために、種々の γ 線照射線量で処理を行ったコラーゲンについても、試験用サンプルとした。その結果、いずれのテスト試料間でも大きな影響は、認められなかった(表 2)。しかし、今回使用したコラーゲン量は、シャーシあたり、1.5mg と少ない量であったために、それほど、大きな影響がでなかった可能性もある。

今後、物理的、化学的、立体的に異なる骨格材料について、これらのウイルス増殖能に及ぼす影響や、検出試料の調製方法に関する研究が必要であると考えられる。

HIV-1 はリンパ球系およびマクロフ

ア-ジで増殖し、皮膚細胞に直接感染し増殖することはない。しかし、皮膚移植などでウイルス汚染があった皮膚組織が使用された場合皮膚組織内の血管から感染する可能性は否定できない。ヒト皮膚組織は上層は上皮角化細胞、下層はコラーゲン内に皮膚繊維芽細胞が埋まった構造である。我々はコラーゲンスポンジおよびコラーゲンハニカムとヒト皮膚繊維芽細胞を用いて皮膚モデルの作成を試み、コラーゲンハニカムで皮膚モデルを作成することが出来た。ハニカムは CLS-01 に比べてポアサイズが大きく、ポアが一方方向に並んだ構造であるため栄養補給が容易であるので、ポアの内面にヒト皮膚繊維芽細胞が接着し易く細胞の増殖が促進されたのであろうと考えられた。

最近、新素材として注目されている生分解性ポリマーは組織再生の空間確保用分解吸収性バイオマテリアルである。今回用いた 4 種類のポリマーは、いずれも皮膚細胞の足場として使用される可能性のあるポリマーであるが、通常、足場として使用される場合には、高分子量のものが使用される。しかし、これらの高分子量材料は、細胞が接着し、培養される過程で徐々に分解して低分子量化し、溶解性のオリゴマーとなる。この低分子量化したオリゴマーの方が、細胞内に取り込まれやすいため、細胞に対する影響を評価しやすい。そこで、本研究では、溶液状態でその影響を評価可能な低分子量の生分解性ポリマーを皮膚細胞に添加した。すなわち、このように液性であるためヒト皮膚繊維芽細胞との混合培養は容易であったが、コラーゲンのような動物由来材料ではなく合成材料(合成脂肪酸族ポリエステル)で

あるため、まず、ポリマーの細胞毒性について検討する必要があった。培養細胞の毒性試験法には、簡単な操作でアイト-ブを用いないで行うことが出来る MTT アッセイがよく知られているが、今回我々はより簡単な操作で出来る Aramar blue アッセイを用いて細胞の毒性及び増殖能を測定した。このアッセイは MTT アッセイとは異なり Aramar Blue 液が水によく溶けるためフラスコ及びプレート内の培養細胞ばかりでなく、ハニカムのような立体構造(3D)内の細胞動態を調べるのにとても便利な測定方法であると思われた。

ウイルス汚染を想定してハニカムと NHDF の皮膚モデル内に MT-4 及び OM10.1 を接種した場合、3日目までは細胞の増殖性が認められたが、それ以降は急速に死滅し増殖能は未接種の NHDF のみよりも低下した(図 1,2)。HIV-1p24 抗原は 2 日目まで陽性だったが 3 日目以降は低下して陰性となった(図 3)。図には示していないがハニカム非存在下で NHDF に MT-4 及び OM10.1 を接種した場合は両細胞ともに 1 週間以上増殖能があった。従ってハニカムの内では接種細胞の増殖が抑制され、死滅した細胞の影響により皮膚モデルを構成している NHDF の増殖も抑制されたと考えられた。

各生分解性ポリマーと NHDF の皮膚モデルに MT-4 が接種された場合の NHDF と MT-4 の増殖性は $P(LA-CL)_{25} 10000 > DMSO > P(LA-CL)_{50} 18000 > PLLA 5000 = PGA 3000$ の順でポリマーの種類によって若干異なった。OM10.1 が共存した場合は各ポリマー間で増殖性に差がなかったが、図 7 に示すように HIV-1p24 抗原に差が見られた。HIV-1 抗原量は

$P(LA-CL)_{25} 10000 > P(LA-CL)_{50} 18000 > DMSO > PGA 3000 = PLLA 5000$ の順であった。これらのことよりポリマーの構造の違いが NHDF よりも OM10.1 の増殖性に影響を与えていることが明らかになった。ポリマー 3 の L-乳酸-ε-カプロラクトン共重合体 $M_w=10000 (P(LA-CL)_{25} 10000)$ は、細胞の増殖性及び HIV-1 の検出度が高いポリマーであった。以上のことよりコラーゲンハニカム又は生分解性ポリマーを用いてヒト皮膚モデルを作成でき、これらのヒト皮膚モデルは感染細胞の動態及び HIV-1 の検出に応用できることがわかった。また生分解性ポリマーの方が、液性のためかハニカムよりも HIV-1 の抗原量が多かった。しかし、生分解性ポリマーは種類により HIV-1 感染細胞 OM10.1 の増殖に影響するためウイルス感染・検出にあたってはこのことを考慮しなければならないと思われた。

合成および微生物由来生分解性ポリマーを用いてヒト皮膚モデルを作成した場合、ポアサイズ及びポリマーの構成成分の違いにより、NHDF の増殖性に差があった。ポリマー 1 は、ポリ-L-乳酸とカプロラクトンが 50:50 の共重合体であり非晶性でスポンジ状であり、弾力性に富んでいる。これに対して、ポリマー 2 及びポリマー 3 はポリ-L-乳酸およびポリ-L-乳酸とカプロラクトンが 75:25 の共重合体であり結晶性で弾力性に乏しくもろい。これらのポリマーから作成した皮膚モデルのうち、ポリマー 2 及びポリマー 3 を用いたものは、以前実験に使用した天然のコラーゲン由来のコラーゲンスポンジハニカムと同等の増殖性を示し最適な皮膚モデルであったと考えられた。微生物由来による皮膚モデルは、

中程度の増殖性であった。細胞の増殖性の測定は、皮膚モデルが立体構造(3D)であるため Alamar Blue assay は有効な方法であったと考えられた。

NHDF は皮膚組織由来細胞、OM10.1 及び MT-4 は血液由来のマクロファージ及びリンパ球である。NHDF は紡錘形、OM10.1 及び MT-4 は球形であり、形状も異なっている。皮膚モデルへの感染細胞 OM10.1 及び MT-4 の接種実験では、これらの増殖性は3日目まで増加傾向であったが、6日目には感染細胞未接種の皮膚モデルのみよりも明らかに増殖性が低下し、更に OM10.1 と NHDF の共存は MT-4 と NHDF の共存より増殖性が低下した。つまり感染細胞との共存により、NHDF と感染細胞が、細胞死をおこし、増殖性が低下したと考えられた。図には示していないが、ポリマー1-5に直接 MT-4 又は OM10.1 を接種した場合も、全ポリマーで、両細胞とも3日目以降増殖性は急速に低下し、皮膚モデルへの感染細胞接種と同様の結果だった。これらの感染細胞は付着性の NHDF とは異なり浮遊系の細胞であり、狭いポリマー内では栄養補給が十分でなく細胞死を起こしたのであると考えられた。

MT-4 はウイルスを細胞外に放出しないが、OM10.1 はウイルスを細胞外に放出し、感染増殖する。従って、OM10.1 の場合は、培養上清から HIV のウイルス量を容易に測定することができた。皮膚モデルに OM10.1 を接種した場合は、全ポリマーで増殖性は3日目以降急速に低下したが、HIV-1p24 抗原量は6日目まで増加した。これは、OM10.1 の細胞死により細胞が破壊され、内部のウイルスが放出したためであろうと考えられる。今回の実験は大量

の感染細胞を接種した場合であり、ウイルス量が少ない場合は、PCR によるウイルス検出がより有効であろうと思われた。しかし、HIV-1p24 抗原検出法は短時間(1時間以内)でウイルス量を検出できる為、ウイルス汚染の検出には有効な方法であり、他のウイルスにも応用できると考えられた。

細胞・組織のがん化を予測する評価技術の開発に関する研究

c-Myc が hTERT の転写活性化に直接関与していることを明らかにした。さらに、c-Myc による hTERT の転写活性化機構は、コアプロモーター領域および第 2 イントロン上に位置する E-box を介して誘導されていることも判明した。c-Myc の過剰な発現は多くの腫瘍組織において確認され、そのため c-Myc は腫瘍性たんぱく質として理解されている。つまりガン細胞におけるテロメラーゼの活性化には、c-Myc の発現誘導が必要不可欠であると推察される。また、c-Myc 遺伝子の発現は一般に休止期にある細胞が増殖刺激を受けて、細胞周期の G0 期から G1 期に移行する際に誘導されてくることが知られている。これに対し、分化誘導細胞では発現が低下している。同様に、テロメラーゼの活性化も G0 期においても抑制されていること、さらには分化誘導に伴ってその活性化が抑制されることが報告されている。この様に、c-Myc の発現とテロメラーゼの活性化機構には密接な相関があり、今後、c-Myc を基軸とした hTERT の発現制御機構の解明がさらに進展するものと期待される。

最近、Myc スーパーファミリーに属する Mad1 が hTERT 遺伝子の転写

抑制に関与していることが報告された。一般に、Mad1はc-Mycの結合部位であるE-boxに結合して、c-Mycによる転写を抑制していると考えられている。従って、c-MycとMad1の発現量のバランスによって、hTERTの転写、さらにはテロメラーゼの活性化が巧妙に制御されているのかもしれない。また、hTERTの転写制御に関して、c-Myc以外の転写因子(Myod、IRF-1)の影響についても解析を行った。その結果、hTERTプロモーター上にはMyodおよびIRF-1の潜在的結合部位が存在していたにも関わらず、Myod、IRF-1はhTERTプロモーターの転写制御には関与していないと推定された。しかしながら、今回検討したプロモーター領域(-1391bp~-25bp)以外に、これらの転写因子が作用する可能性も残されていることは否定できない。従って、さらなる解析が必要であると考えられる。従って、今後、細胞のがん化、不死化さらには分化段階でhTERTの転写がどのように制御されているのかを明らかにすることが重要課題になると考えられる。

ポリウレタン材料上で分離された二つの形質転換巣(A5, A6)とポリ乳酸材料上で分離された二つの形質転換巣(L11, L21)と親株(A3111)についてDNAチップを用いる遺伝子発現解析を行った。確認のために実施した、トランスフォーメーション試験において、解凍した四つの形質転換巣は明らかに形質転換能を維持しており、その強さはA5<A6<L21<L11の順であることが明らかとなった。また、最も強い悪性度を示したL11が遺伝子発現の変化も最も顕著であることが判明した。

癌遺伝子および癌抑制遺伝子についてその発現の変化が顕著であったのは、c-fos癌原遺伝子、FBJ骨肉腫癌遺伝子B、およびJun癌遺伝子であった(図15)が、これらは、解析した遺伝子全体でも最も発現の変化が顕著なものであった(図15)。c-fosはげっ歯類の骨肉腫から分離されたv-fosのホモログであるが、Wangらは、遺伝子改変マウスでのc-fosの過剰発現は、骨、軟骨、造血系細胞の発生に特に影響し、c-fos欠損マウス(*fos*^{-/-})で発育遅延、骨改変や歯の萌出の不良を伴う骨化石症の発症を報告している。FBJ osteosarcoma virusはマウスの自然発生骨肉腫から分離されたvirusであるが、このvirusを接種するとマウスの系統によって感受性に差がみられるが、接種部位およびその近辺の皮下に明らかに非常に固い、骨組織様の腫瘍の発生が観察されている。形質転換巣L11では親株の10.9倍、A5では7.8倍のFBJ骨肉腫癌遺伝子Bの発現亢進が認められたが、A6およびL21では発現の変化はなかった。形質転換巣L11およびL21において、親株の25.2倍の発現抑制を示したpleiotrophinは、神経細胞突起促進因子または、線維芽細胞の発現促進因子として発見されたが、種々のヒト腫瘍でその発現が亢進していることが報告されている。また、佐藤らは、pleiotrophinはBMP誘発異所性骨形成を制御しており、低用量(10 μg)のpleiotrophinの添加の方が、高用量(50-100 μg)添加に比べて形成される骨量が増加したと報告している。A disintegrin-like and metalloprotease with TS-1 motif protein 1 (ADAM-TS)は亜鉛依存性蛋白質分解酵素ファミリーで、高発現したトランスクリプトが骨肉腫、黒色腫や

結腸癌の生検や細胞で観察されている。本研究での上記 4 種の遺伝子の発現は、すべて骨形成を促進する方向に変化しており、特に形質転換巢 L11 では 4 種すべての遺伝子が、四つの形質転換巢のうちで最も強く変化しており、L21 では c-fos と pleiotrophin が強く変化しており、A6 では pleiotrophin だけが若干変化していただけであった。

高分子材料の種類により、発現パターンに違いが認められるもののポリ乳酸上から分離された形質転換巢 L11 および L21 とともに、骨肉腫の発生に関連する FBJ 骨肉腫癌遺伝子 B および c-fos の発現が高いこと、またポリウレタンから分離された A5 でもこれらの遺伝子の活性が高かった。In vivo ラットでの発癌実験でもポリ乳酸では 50 匹中 22 匹が腫瘍を発生し、腫瘍中の 6 例では骨肉腫が認められたという。ポリウレタンではポリ乳酸に比べて腫瘍発生率は低いものの、骨肉腫の発生が報告されており、in vitro で得られた形質転換巢の遺伝子発現プロファイルは、in vivo での腫瘍発生強度や、骨肉腫発生を裏付けるものであった。

悪性度（トランスフォーメーション試験における foci 数）との相関を見た時、特定の遺伝子で顕著な相関を示したものはなかったが、表 6 に示すように、変化のあった遺伝子の数およびその程度を総合的に見る時、各形質転換巢の悪性度との相関が認められるようである。形質転換巢 A5 は最も悪性度が低かった（表 3）が、遺伝子発現の変化という観点からは、発現抑制された遺伝子の数が最も少なかった。対照的に L11 は悪性度が最も強かったが、遺伝子発現の変化

においても亢進、抑制ともその程度が最も強かった。特に、発現抑制された遺伝子の数は最も多かった（表 6）。

細胞等による望ましくない免疫反応の検出技術開発に関する研究

特殊な高分子材料コート膜群は、cytotoxic T lymphocyte の割合を誘起せず、異系器官に対するレシピエントの細胞障害性 T リンパ球による免疫拒絶反応性を抑制する方向に寄与する可能性が示唆された。レシピエントへの反応については、更に、詳細な検討を行う必要がある。特殊な高分子材料コート膜内の器官の形態保持機能改善を明らかにすることができた。今後は、コート膜（免疫隔離能保持モデル）及び未コート膜（免疫隔離能欠損モデル）等を用いて、肝細胞機能、バイオ軟骨に及ぼす影響と埋植動物の血液中の免疫反応を調べ、体外免疫反応系の構築を目指す。PP 膜では、同系、異系、異種から採取した器官埋入群では、採取した器官の原形を留めず、著しい形態異常が観察された。しかし、修飾ポリウレタンでコートした膜では、原形を留め、形態保持機能の著しい改善を認めた。即ち、外からの免疫的な攻撃を防ぐ免疫隔離膜としての機能を示した。一方、埋植ラットでの CD4/CD8 は、PP 膜では、膜単独と膜内に器官を埋入した群では、膜内に異系ラット、異種マウスの肢芽器官を埋入した群の方が、CD8 陽性細胞の割合が高かった。しかし、修飾ポリウレタンコート膜を使用した場合には、PP 膜単独と修飾ポリウレタンコート膜内器官埋入群との間で CD8 陽性細胞の割合に有意な差はなかった。

今年度は、免疫担当器官である脾

臓を移植器官として取り上げ、レシピエント側に生じる望ましくない免疫応答について、検討した。アロ移植では、埋植 12 週では、顕著な CD4 と CD8 のリンパ球が減少していた。作製した MPU-PP 膜を隔離膜として用いても、ドナーによるレシピエントのリンパ球の攻撃を抑制することは出来なかった。MPU-PP 膜に脾臓器官をいれて埋入すると、レシピエントの TNF- α の減少が認められたことから、非特異的な炎症反応はこの膜の使用により、改善されることも明らかになった。INF- γ は、Bag 群や spleen 群では、コントロール群に比べて減少していたが、Bag+Spleen 群では、コントロールと同レベルであった。レシピエントの Th1 細胞の機能は、MDU-PP 膜を隔離膜として使用することにより、膜内のドナーラットのリンパ球由来の物質や細胞による攻撃を受けにくいものと考えられた。また、Spleen+Bag 群では、IL-4 産生量が増加していることから、Bag が拒絶を防ぐ方向に寄与しているものと考えられる。

胎児の器官は、拒絶反応が低いと考えられるので、免疫担当細胞が多く存在する器官であり、拒絶反応が高いと考えられる脾臓を袋内に入れて、袋の免疫隔離膜効果を長期の in vivo 埋入試験で調べた (図 26、27、表 7)。24 週では、いずれの動物群間で差はみとめられず、対照動物レベルにまで、回復することが明らかになった。

細胞や前駆細胞等を素材とした細胞・組織加工医療用具等の製造過程における品質・安全性確保技術や製品の評価

方法に関する研究

P(LA-CL)₂₅ 10000 は、軟骨では、著しい分化誘導を、神経では、著しい分化阻害を示したように、組織によっては、促進的に、あるいは逆に、阻害的にと細胞の種類によって相反する作用を示すことが判明した。また、同じ化学組成を有するポリマーでも、重合時の配合比が異なったり、また、評価に使用するサンプルの分子量が異なることにより、影響が現れる程度も異なるものと考えられる。P(LA-CL)₂₅ 10000 と P(LA-CL)₅₀ 18000 では分子量が異なること、また、これらのポリマーの分解速度も異なるものと推測される。細胞への作用としては、通常、細胞内へとりこまれた後、作用すると考えると、分子量の小さいもの程、細胞への影響は大きいものと考えられる。しかし、分子量 3000 の PGA や分子量 5000 の PLLA に比べて、共重合体の神経分化阻害作用は強く、表 8、9 で得られた結果は、このポリマーの化学的性質によるものと考えられる。

これまでの結果から、4 種のポリマーの神経分化および軟骨分化に及ぼす効果は、ポリマー自身の化学構造に由来するものと考えている。しかし、ポリマーに結合したスズの作用の影響も無視することはできない。次年度以降は、ポリマーを無触媒で合成したもの、スズ以外の触媒で合成したものを評価する。また、これらの生分解性ポリマーが実臨床に最も使用されるヒト軟骨細胞にどのような影響を及ぼすのか、更に検討する必要もある。

以上のことから、組織工学材料が組織再生に及ぼす影響を評価する上で、通常、検討される高分子量スカフォールド (骨格) と細胞との相互作用

を含む反応のみでなく、組織再生過程で分解され、生成する低分子量ポリマーの作用にも着目することが、マトリックスが分解されながら、組織が再生していく過程に及ぼす影響因子の解析を正確に行うために有用であることが示唆された。しかし、この方面の研究は殆どなされていない。

組織工学材料として、様々なタイプの生分解性ポリマーが使用され、研究されているが、代表的な生分解性ポリマーの分解産物である低分子量 ϵ -カプロラクトンとL-乳酸共重合体等を用いて、ラット胎児細胞由来軟骨前駆細胞の分化能への影響を明らかにしたが、ヒト軟骨前駆細胞の高密度培養での分化および増殖に及ぼす作用も調べ、ラット由来細胞との反応評価の違いについて、検討した。その結果、細胞の採取組織や、種の違いにより、オリゴマーに対する反応は、異なることが明らかになった。すなわち、同じ濃度レベルの共重合体オリゴマーについて比較した結果では、ラットおよびヒト細胞間では、細胞分化や増殖能に及ぼす影響が著しく異なることが明らかになった。

マウステラトカルシノーマ細胞株 AT805 由来の軟骨幹細胞株 ATDC5 細胞はインスリンで軟骨細胞に分化することが知られている。インスリンによる軟骨細胞分化の過程では、ATDC5 細胞は細胞増殖が促進され、細胞の凝集・軟骨結節の形成が見られる。このインスリンによる軟骨細胞分化誘導の過程で軟骨結節を形成しない細胞は軟骨細胞には分化しない。このことから、インスリンが直接軟骨分化を誘導するのではなく、

インスリン刺激によって誘導される因子によって軟骨分化が進行するものと考えられる。実際、BMP-4 を添加することで、ATDC5 細胞は軟骨結節を形成することなく軟骨細胞へと分化する。本研究では、生分解性合成高分子であるポリ乳酸 (PLLA) が ATDC5 の軟骨分化を誘導・促進することを明らかにした。インスリン非存在下で PLLA を添加すると、ATDC5 細胞は凝集し、軟骨結節を形成して軟骨細胞へと分化する。PLLA はインスリンと同様な ATDC5 細胞の軟骨分化を誘導するが、軟骨細胞の分化マーカーの発現時期に違いが見られた。このことから、PLLA による軟骨分化誘導のシグナル経路はインスリンによる軟骨分化誘導と一部異なる可能性が示唆された。今までは単なる培養基質と考えられてきた PLLA などの生分解性合成高分子からのシグナルによって細胞が分化・増殖を誘導することが明らかとなった。今後、このシグナルを仲介する分子群を同定することによって、より効率のよい軟骨培養基質の開発が進むと期待される。

軟骨分化の新たなマーカー分子の検討を行った。トランスグルタミナーゼは肥大軟骨部位での発現上昇が観察されている。また、軟骨を形成する細胞外マトリックスの主成分である II 型コラーゲンはトランスグルタミナーゼによって架橋されることが報告されている。以上のことから、軟骨形成におけるトランスグルタミナーゼの役割と軟骨細胞の分化マーカーとしての評価を行うために、分化誘導処理前後におけるトランスグルタミナーゼ活性を測定した。しかし、期待に反して酵素活性に差は見

られなかった。トランスグルタミナーゼの酵素活性はカルシウムイオン濃度に依存しており、通常の細胞質内の低カルシウムイオン環境下では酵素活性は発揮されない。さらに、軟骨組織部位ではトランスグルタミナーゼは細胞外に何らかの機構で分泌され、II型コラーゲンなどの細胞外マトリックスの架橋に貢献していると考えられている。そのため、トランスグルタミナーゼ活性を軟骨分化の指標とするためには、細胞外に分泌されたトランスグルタミナーゼの酵素活性を測定する新たなアッセイ法の開発が不可欠である。また、組織型トランスグルタミナーゼはGタンパク質としての活性も併せ持つ多機能タンパク質である。そのため、タンパク質の架橋以外の機能における軟骨分化への関わりについても検討する必要があると思われる。

E. 結論

ウイルス等の感染性危険因子を排除するための基盤技術に関する研究

合成及び微生物由来生分解性ポリマーとNHDFによりヒト皮膚モデルを作製した場合、ヒト皮膚モデル中のNHDFの増殖性はポリマーのポアサイズ及び化学構造により異なった。すべてのヒト皮膚モデルにおいて、MT-4 および OM10.1 細胞接種実験では3日目以降両者の増殖能は急速に低下した。OM10.1の増殖とHIV-1p24抗原量は3日目まで相関したが、それ以降はポリマーの種類により異なった。

多孔質体ポリマーを用いたヒト皮膚モデルは、コラーゲンスポンジによるものと同様にHIV-1の検出に応用できることがわかったが、ポリマーのポアサイズ及び種類により細胞

の増殖性が異なるのでその点を留意すべきであると思われる。

細胞・組織のがん化を予測する評価技術の開発に関する研究

ヒトテロメラーゼ触媒サブユニット遺伝子(hTERT)のプロモーター領域を取得し、その構造を解析した。また、様々な種類のがん細胞株および正常細胞におけるhTERTプロモーターの転写活性化能についても評価した。

がん細胞株と正常細胞におけるhTERT mRNAの発現の違いは、主に転写レベルで制御されていることが、hTERTプロモーターを利用したルシフェラーゼアッセイにより明らかとなった。

hTERTプロモーターの欠失変異体を利用したレポーターアッセイの結果より、-286bp~-25bpの領域がhTERTのコアプロモーター領域であると考えられた。更に、-1119bp~-286bpの塩基配列内には、hTERTプロモーターを著しく抑制するエレメントが存在していることも判明した。

hTERTプロモーターの配列情報をもとに、転写因子の結合部位をデータベースを用いて検索した結果、この領域内には、様々な転写因子の潜在的結合部位が確認された。特に、転写開始点の上流付近には、Myc/Max、Sp1、N-Myc、MZF1、c-Ets-1、 δ -EF1、MyoD、NK- κ B、USF、IRF-1など数多くの転写因子の潜在的結合部位が存在していた。

HTERT コアプロモーター領域を組み込んだルシフェラーゼコンストラクト(pGL3b-286)およびc-Mycの発現ベクターをA549細胞へ共導入し、

pGL3b-286 におけるルシフェラーゼの発現量を評価した。その結果、A549 細胞において、c-Myc は著しく hTERT の転写を活性化した。次に、2 つの E-box に変異を導入したルシフェラーゼコンストラクト (pGL3b-286 (EboxMut)) についても同様の解析を行ったところ、hTERT の転写活性は約 80% 抑制された。更に第 2 イントロン上に存在する E-box クラスター領域の hTERT 転写活性への関与について評価した。ルシフェラーゼアッセイの結果、すべての E-box クラスター (E-box 1, E-box 2, E-box 3) について、c-Myc の強制発現により、その転写が活性化された。hTERT コアプロモーター領域を組み込んだルシフェラーゼコンストラクトおよび MyoD 発現ベクターまたは IRF-1 発現ベクターを A549 細胞または HepG2 細胞へ共導入し、それぞれのレポーターコンストラクトにおけるルシフェラーゼの発現量を評価した。その結果、MyoD および IRF-1 は hTERT の転写活性には関与していないことが判明した。

げっ歯類で腫瘍の発生が報告されている医用材料 (ポリウレタンおよびポリ乳酸) について、*in vitro* トランスフォーメーション試験を実施し、得られた形質転換巣の遺伝子発現の変化を解析した。その結果、代表的な癌関連遺伝子である、c-fos 癌原遺伝子、FBJ 骨肉腫癌遺伝子 B、および Jun 癌遺伝子の強い発現亢進が認められた。発現変化を示した遺伝子群で、その産生タンパクの機能に認められた共通点は、骨形成に関与しているということで、c-fos 癌原遺伝子、FBJ 骨肉腫癌遺伝子 B、Jun 癌遺伝子、

pleiotrophin, a disintegrin-like and metalloprotease with TS-1 motif protein 1 が含まれる。これら遺伝子の発現はすべて骨形成促進の方向に変化しており、また、その変化の程度は材料による違いがあったが、*in vivo* での骨肉腫を含む発生腫瘍の種類と強度に一致していた。本研究により、*in vitro* で材料上で分離された形質転換細胞の遺伝子発現解析を行うことにより、医用材料により誘発され易い癌の特性のみならず、そのリスクレベルについても評価できる可能性を示すことができた。

細胞等による望ましくない免疫反応の検出技術開発に関する研究

2 種の免疫隔離膜を使用して、ラット腹腔内での器官の形態に及ぼす効果を調べた結果、特殊な陰イオン性修飾ポリウレタン膜を PP 膜に被覆コートすると、形態保持機能を示し、cytotoxic T lymphocyte の増加を抑制した。

修飾ポリウレタンでコートしたマイクロメンブレン (MPU-PP) 袋を用いてドナーラットの脾臓器官を袋ないに、*in vivo* で免疫隔離能を評価した結果、MPU-PP 袋は、望ましくない免疫反応を部分的に抑制できることと、レシピエントラットの血液を用いて CD4/CD8 サブセット解析、リンパ球からの TNF- α 、IL-4、IL-13 産生量を測定することにより、評価できる可能性を示した。

細胞や前駆細胞等を素材とした細胞・組織加工医療用具等の製造過程における

品質・安全性確保技術や製品の評価方法に関する研究

細胞・組織加工医療用具の前臨床

評価試験として、細胞を組み込んだ生分解性ポリマーからなる足場について、動物をモデルとして評価が行われる。ヒトと動物では、組織構造の違い等から、細胞・組織加工医療用具の *in vivo* 評価が異なる可能性がある。本研究では、同じ濃度レベルの共重合体オリゴマーについて比較した結果、ラットおよびヒト細胞間で、細胞分化や増殖能に及ぼす影響が著しく異なることが明らかになった。組織工学利用医療用具の評価を行う上で、動物モデルからヒト臨床使用するとき、分化・増殖機能が両種間で異なる可能性を考慮する必要がある。

PLLA は、コラーゲン typeII 遺伝子発現を亢進することにより、軟骨分化を促進できること、組織型トランスグルタミナーゼは、軟骨分化の指標にはならないことを明らかにした。

従来から軟骨細胞培養基質として用いられてきた生分解性合成高分子であるポリ乳酸がマウス軟骨幹細胞株 ATDC5 の軟骨細胞への分化そのものを誘導する能力があることを明らかとした。さらに、その作用は、従来から知られている ATDC5 の軟骨分化を誘導する因子であるインスリンと一部異なることが示唆された。PLLA の軟骨分化誘導のメカニズムを解明することで、PLLA を用いた効率的な軟骨幹細胞の分化誘導、軟骨細胞の大量培養が可能になることが期待される。また、細胞内に含まれるトランスグルタミナーゼ活性は分化誘導前後で大きく変動することはなかったことから、細胞外に分泌されるトランスグルタミナーゼによる細胞外マトリックスの架橋形成が軟骨形成に重要であることが予想された。

1. 研究発表

1) 国内

□ 頭 発 表
25 件
原著論文による発表
4 件
それ以外 (レビュー等) の発表
6 件

2) 海外

□ 頭 発 表
4 件
原著論文による発表
36 件 (11件: 投稿中)
それ以外 (レビュー等) の発表
0 件

論文発表

- 1 .Yoshinori Katakura, Eriko Nakata, Yukiko Tabira, Takumi Miura, Kiichiro Teruya, Toshie Tsuchiya, Sanetaka Shirahata, Decreased tumorigenicity in bipo when transforming growth factor β treatment causes cancer cell senescence. Biosci. Biotechnol. Biochem, in press.
- 2 .Takumi Miura, Yoshinori Katakura, Tsukasa Fujiki, Hiroshi Shiraishi, Masaaki Funata, Shuichi Nishimur, Norihisa Uehara, Kaichi Yoshizaki, Toshie Tsuchiya, Kosuke Tashiro, Sanetaka Shirahata, The TAKI-p38 kinase pathway represses transcription of the human telomerase reverse transcriptase gene, submitted.
- 3 .Jeongung Park, Toshie Tsuchiya, Yutaka Kariya and Akira Ichikawa, A novel inhibitory action of heparins (DSH) in the interaction with bFGF on the connexin43 expression. submitted.
- 4 .Jeongung Park, Toshie Tsuchiya, Yutaka Kariya and Akira Ichikawa, Chondroitin sulfate inhibits the GJIC function resulting in reducing the

- bFGF-and KGF-productions in NHDF cells but enhance the stability of both cytokines. submitted.
- 5 . Saifuddin Ahmed, Toshie Tsuchiya, Different Expression of gap junctional protein connexin43 in two strains of mice after one-month implantation of poly-L-lactic acid. Animal cell Technology, accepted.
 - 6 . Jeongung Park, and Toshie Tsuchiya, Evaluation of the cornea cells affected by multi-purpose solutions for contact-lens. Animal cell Technology, accepted.
 - 7 . Jun Yang , Akira Ichikawa, Toshie Tsuchiya, Change of the cellular function by connexin gene transfection in a hepatoma cell line. Animal cell Technology, accepted.
 - 8 . MS Rahman, Yasmin Banu, Atsuko Matsuoka, Akira Ichikawa, Masamune Sakai, Hiroyuki Ikeda and Toshie Tsuchiya, Evaluation of the immuno-protective effects of the new type of bags using elisa-and faces analysis. Animal cell Technology, submitted.
 - 9 . Toshie Tsuchiya, Masamune Sakai, Hiroyuki Ikeda, Tadahiko Mashino and Yasmin Banu, Biocompatible biomaterials for the human chondrocyte differentiation estimated by RT-PCR method. Animal cell Technology, submitted.
 10. Muhammad Shahidur Rahman, Toshie Tsuchiya, A remarkable increase of the mechanical strength of the human articular chondrocytes cultured with hyaluronic acid using honey-comb scaffold under the dynamic conditions. submitted.
 11. Muhammad Shahidur Rahman, Toshie Tsuchiya, Enhancement factors of chondrogenic differentiation of the human articular chondrocytes using the 3-dimensional scaffold under the dynamic culture condition. submitted.
 12. Yasmin Banu, Toshie Tsuchiya, Studies on the development of evaluation method and the biocompatibility of functional biomaterials. submitted.
 13. Taizo Sumide, Toshie Tsuchiya, Effects of Multipurpose Solutions (MPS) for Hydrogel Contact Lenses on Gap-Junctional Intercellular Communication (GJIC) in Rabbit Corneal Keratocytes. J. Biomed Mater. Res, PartB:Appl Biomater 2003, 64B,57-64
 14. 土屋利江、生分解性高分子材料の軟骨分化機能等への影響、バイオインダストリー、2002, 7, 30-37
 15. 中岡竜介、土屋利江、微粒子状物質の骨分化機能影響、バイオインダストリー、2002, 7, 14-20
 16. 伊佐間和郎、五十嵐良明、土屋利江、γ線照射ポリ乳酸の表面解析と骨芽細胞機能影響、バイオインダストリー、2002, 7, 21-29
 17. Jeongung Park, and Toshie Tsuchiya, Tumor-Promoting Activity of 48 kDa Molecular Mass Hyaluronic Acid. Materials Transactions, 2002, 43, 3128-3130
 18. Ryusuke Nakaoka and Toshie Tsuchiya, Biocompatibility of Various Kinds of Polymer Microspheres Estimated from Their Effect on Gap Junctional Intercellular Communication of Fibroblasts. Materials Transactions, 2002, 43, 3122-3127
 19. Atsuko Matsuoka, Toshie Tsuchiya: Gene expression profiling of BALB/3T3 transformants induced on the poly(L-lactic acid) or the polyurethane films in vitro: more potent osteosarcoma-like gene expression by the former than the latter. Submitted.
 20. Ryusuke Nakaoka , Toshie Tsuchiya, and Akitada Nakamura, Different neural differentiation of midbrain cells on

- various protein-immobilized polyethylene films. *J. Biomedical Materials Research*, 2003, 64A(3), 439-46.
21. Akira Ichikawa and Toshie Tsuchiya, Ligand-dependent transcriptional down-regulation of aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator causes 3-methylcholanthrene resistances in Balb/c 3T3 A31-1-1 cell, submitted.
22. Toshie Tsuchiya, Yoshiaki Ikarashi, Takao Uchima, Hisashi Doi, Akitada Nakamura, Yuichi Ohshima, Masato Fujimaki, Kazuhiro Toyoda, Michihito Takahashi, Takayuki Yoneyama and Hitoshi Hamanaka, A method to monitor corrosion of chromium iron alloys by monitoring the chromium ion concentration in urine, *Material Trans.*2002, 43, 3058-3064.
23. Ryusuke Nakaoka and Toshie Tsuchiya, Studies on the Biocompatibility of Biomaterials: Effect of Various Types of Biomaterial Microspheres. Proc. Fourth Pacific Rim Int. conf. On Advanced Materials and Processing (PRICM4), The Japan Institute of metals, 2001, 189-191.
24. 土屋利江、“微粒子工学大系 第II巻 応用技術”、無機微粒子の安全性と生体適合性、フジ・テクノシステム、東京(2002). 743-748.
25. Akira Ichikawa and Toshie Tsuchiya, Studies on the tumor promoting mechanism of hard and soft segment models of polyetherurethane : Tyr265 phosphorylation of connexin43 is a key step in the GJIC inhibitory reaction induced by polyetherurethane. *J. Biomedical Materials Research*,2002, 62, 157-162.
26. Kazuo Isama and Toshie Tsuchiya, Effect of γ -ray irradiated poly(L-lactide) on the differentiation of mouse osteoblast-like MC3T3-E1 cells. *J. Biomater. Sci. Polymer Edn.* 2002, 13, 153-166.
27. Kazuo Isama and Toshie Tsuchiya, Change in the Particle Size Distribution of poly(L-lactide) Wear Debris by γ -Ray Irradiation. *Bull. Natl. Inst. Health Sic.*2001, 119, 61-64.
28. Jeong Ung Park and Toshie Tsuchiya, Increase of Gap Junctional Intercellular communication by High Molecular Weight Hyaluronic Acid Associated with FGF-2-and KGF-Production in Normal Human Dermal Fibroblasts. *TISSUE ENGINEERING* 2002, 8, 419-427.
29. Akira Ichikawa and Toshie Tsuchiya, A strategy for the suppression of tumorigenesis induced by biomaterials: Restoration of transformed phenotype of polyetherurethane-induced tumor cells by Cx43 transfection. *Cytotechnology* in press .
30. Muhamad Shahidur Rahman and Toshie Tsuchiya, Enhancement of Chondrogenic Differentiation of Human Articular Chondrocytes by Biodegradable Polymers. *TISSUE ENGINEERING* 2001,7(6),781-790.
31. 土屋利江、中岡竜介、朴正雄、市川明、細胞によるバイオマテリアルの評価法、バイオインダストリー、2001, 10, 81-93.
32. Toshie Tsuchiya, Yuka Itahashi, Tomoko Ichikawa and Akira Ichikawa, Studies on the biocompatibility of artificial organs and tissue engineered products: embryonic neuronal cell differentiation on the various kinds of biodegradable polymers. *Animal Cell Technology*, 2002,12,253-256.
33. Jeong Ung Park and Toshie Tsuchiya, Increase in gap-junctional intercellular communications(GJIC) on normal human dermal fibroblasts(NHDF) on surfaces coated with high molecular weight hyaluronic acid (HMWHA), *J. Biomedical Materials Research*, 2002, 542-547.

34. Akira Ichikawa, Toshie Tsuchiya, Reversion of transformed phenotype of polyetherurethane-induced tumor cells Cx43 transfection. *Animal Cell Technology*, 2002,12,269-273.
35. Muhammad Shahidur Rahman, Toshie Tsuchiya, Effects of biomaterials and nutrient factors on chondrogenesis of human chondrocytes. *Animal Cell Technology*, 2002,12,235-239.
36. Ryusuke Nakaoka, Toshie Tsuchiya, Keisuke Sakaguchi and Akitada Nakamura, Studies on in vitro evaluation for the biocompatibility of various biomaterials: Inhibitory activity of various kinds of polymer microspheres on metabolic cooperation. *J. Biomed Mater Research*, 2001, 57, 279-284.
37. Ryusuke Nakaoka, Toshie Tsuchiya, Akitada Nakamura, The inhibitory mechanism of gap junctional intercellular communication induced by polyethylene and the restorative effects by surface modification with various proteins *J. Biomed Mater Research*, 2001, 57, 567-574.
38. Taizo Sumide, Toshie Tsuchiya, Evaluation of chemical disinfectants for hydrogel contact lenses by metabolic cooperation assay.(Japanese) *J. of Japanese Society for Biomaterials*, 2001, 19, No.3, 93-97.
39. Takumi. Miura, Yoshinori. Katakura, Katsuhiko. Yamamoto, Norihisa. Uehara, Toshie Tsuchiya, Sanetaka Shirahata, Neural stem cells loses telomerase activity upon differentiation into astrocytes. *Cytotechnology* 2001, 36, 137-144.
40. Muhammad Shahidur Rahman, Toshie Tsuchiya, In vitro culture of human chondrocytes(1): A novel enhancement action of ferrous sulfate on the differentiation of human chondrocytes. *Cytotechnology*, 2001, 37, 163-169.
41. 土屋利江：“金属系バイオマテリアルの基礎と応用” 発癌性・変異原性・催奇形性、角田方衛、筏 義人、立石哲也編、アイピーシー、東京(2000) 408-422
42. Toshie Tsuchiya, A useful marker for evaluating the tissue engineering products: gap junctional communication for assessment of the tumor-promoting action and disruption of cell differentiation in the tissue engineering products, *J. Biomater. Sci. Polymer Edn.*, 2000,11,947-959.
43. Yoshiaki Ikarashi, Toshie Tsuchiya, Masa-aki Kaniwa and Akitada Nakamura, Activation of osteoblast-like MC3T3-E1 cell responses by poly(lactide). *Biol. Pharm. Bull.* 2000, 23, 1470-1476.
44. Yoshiaki Ikarashi, Toshie Tsuchiya and Akitada Nakamura, Effect of heat treatment of poly(L-Lactide) on the response of osteoblast-like MC3T3-E1 cells. *Biomaterials*, 2000, 21, 1259-1267.
45. Ryusuke Nakaoka, Toshie Tsuchiya and Akitada Nakamura, Studies on the mechanisms of tumorigenesis induced by polyetherurethane in rats: Production of superoxide, tumor necrosis factor, and interleukin 1 from macrophages cultured on different polyetherurethanes., *J. Biomed. Master. Res.* 2000, 49, 99-105.
46. Ryusuke Nakaoka, Toshie Tsuchiya and Akitada Nakamura, Studies on tumor promoting activity of polyethylene immobilized with various proteins. *Biomedical Materials Research in Asia (IV)* 2000, .122-123.

学会発表

- 1 .Jun Yong, Akira Ichikawa, Toshie Tsuchiya, Change of the cellular function by connexin gene transfection in a hepatoma cell line. 5th International meeting of TESi, Dec, 2002, Kobe.

2. Toshie Tsuchiya and Ryusuke Nakaoka, A useful marker for evaluating the tissue engineering products: gap junctional communication for assessment of the tumor-promoting action and disruption of cell differentiation in the tissue engineering products. 5th International meeting of TESI, Dec, 2002, Kobe.
3. Ryusuke Nakaoka, Toshie Tsuchiya, Study on a relationship between effect of biomaterials on gap junctional intercellular communication and differentiation of osteoblasts. 5th International meeting of TESI, Dec, 2002, Kobe.
4. 鈴木寿子、土屋利江、吉原なみ子：生分解性ポリマーを用いたバイオヒト皮膚モデルにおける HIV-1 検出法の検討 第16回日本エイズ学術集会、2002年11月 名古屋
5. Toshie Tsuchiya, A useful marker for evaluating the safety and efficacy of tissue engineered products. ASTM TEMPs 2002 Symposium, Nov4-5, 2002, Miami
6. Toshie Tsuchiya and Soichiro Isobe, Reform of biological product regulation in Japan: Revision of pharmaceutical affairs law (PAL) and principles of good tissue practice (GTP) for cellular and tissue based products. ASTM TEMPs 2002 Symposium, Nov4-5, 2002, Miami
7. 土屋利江：再生医療材料・製品の安全性と標準化 ワークショップ 第24回日本バイオマテリアル学会、2002年11月 東京
8. Jun Yang, Akira Ichikawa, Toshie Tsuchiya, Studies on the cellular function of an hepatoma cell line transfected with connexin32 expression vector. 第24回日本バイオマテリアル学会、2002年11月 東京
9. 五十嵐良明、鹿庭正昭、土屋利江：医用材料の即時型アレルギー性の検出：マウスモデルでタンパクアレルギーを検出するための投与方法と判定指標 日本バイオマテリアル学会、2002年11月 東京
10. 朴正雄、土屋利江：多糖類と増殖因子を用いた三次元培養による人工肝臓モデル作製、第24回日本バイオマテリアル学会、2002年11月 東京
11. 中岡竜介、土屋利江：材料と相互作用したヒト骨芽細胞でのコネクション遺伝子発現変化、第24回日本バイオマテリアル学会、2002年11月 東京
12. 朴正雄、土屋利江：コンタクトレンズ用 multi-purpose solution(MPS)の角膜実質細胞に及ぼす影響、第1回日本再生医療学会、2002年4月 京都
13. MS Rahman, Toshie Tsuchiya, Enhancement factors of chondrogenic differentiation of the human articular chondrocytes using the 3-dimensional scaffold under the dynamic culture condition. 第1回日本再生医療学会、2002年5月 京都
14. Toshie Tsuchiya, Biocompatible biomaterials for the human chondrocyte differentiation estimated by RT-PCR method. The 15th JAACT meeting, Nov, 2002, Tokyo.
15. Jeongung Park, and Toshie Tsuchiya, Evaluation of the cornea cells affected by multi-purpose solutions for contact-lens. The 15th JAACT meeting, Nov, 2002, Tokyo.
16. Jun Yang, Akira Ichikawa, Toshie Tsuchiya, Change of the cellular function by connexin gene transfection in a hepatoma cell line. The 15th JAACT meeting, Nov, 2002, Tokyo.
17. Saifuddin Ahmed, Toshie Tsuchiya, Different expression of gap junctional protein connexin43 in two strains of mice after one-month implantation of

poly-l-lactic acid. The 15th JAACT meeting, Nov, 2002, Tokyo.

18. MS Rahman, Yasmin Banu, Atsuko Matsuoka, Akira Ichikawa and Toshie Tsuchiya, Evaluation of the immuno-protective effects of the new -type of bags using elisa-and faces -analysis. The 15th JAACT meeting, Nov, 2002, Tokyo.

19. 鈴木寿子、土屋利江、増田茂樹、吉原なみ子：細胞組織医療機器製品での HIV-1 検出法の検討（その2）：多孔質体を足場としたヒト皮膚モデルでの HIV-1 感染細胞の動態 第24回日本バイオマテリアル学会2002年11月 東京

20. 土屋利江、松岡厚子、市川 明：生分解性高分子ポリ乳酸およびポリウレタン材料上で分離された Balb/3T3 細胞由来形質転換巣の DNA チップを用いる遺伝子発現解析 第23回日本バイオマテリアル学会、2001年10月 京都

21. Akira Ichikawa and Toshie Tsuchiya: Studies on the suression of tumorigenesis induced by biomaterials: Reversion of transformed phenotype of tumor cells induced by biomaterials. International Gap-junction Conference. Aug. 2001, Hawaii.

22. 市川 明、土屋利江：ポリウレタンの発癌プロモーター作用機構：ポリウレタンのギャップ結合細胞間連絡阻害要因はコネキシンのチロシン燐酸化である。コネキシン研究会、2001年12月、宝塚

23. Muhammad Shahidur Rahman, Toshie Tsuchiya and Akira Ichikawa: Studies on the enhancement of mechanical strength and differentiation of human articular chondrocytes. 第23回日本バイオマテリアル学会、2001年10月京都

24. 鈴木寿子、土屋利江、吉原なみ

子：ヒト皮膚モデルを用いた HIV-1 および HTLV-1 感染持続細胞の動態に関する研究(1) 第23回日本バイオマテリアル学会2001年10月 京都

25. 中岡竜介、土屋利江：種々の微粒子状物質によるヒト骨芽細胞の分化への影響と細胞間連絡機能との関連 第23回日本バイオマテリアル学会2001年10月 京都

26. 鈴木寿子、土屋利江、吉原なみ子：バイオヒト皮膚モデルを用いた HIV-1 検出法の検討 第15回日本エイズ学術集会、2001年12月 東京

27. Toshie Tsuchiya and Tadahiko Mashino : A remarkable promoting action of a aquous fullerene derivative on the chondrogenesis in rat limb bud cell culture system. International Tissue Engineering Conference, Dec. 2000 Orland,

28. Muhammad Shaidur Rahman, Toshie Tsuchiya: In vitro culture of human chondrocytes (1): Effects of factors on chondrogenesis for tissue engineering. 日本バイオマテリアル学会シンポジウム2000 2000年11月 横浜。

29. 長田和浩、土屋利江、市川 明：人工臓器を生体に適用する際に引き起こされる免疫原性の評価系の確立と応用に関する研究(1) 日本バイオマテリアル学会シンポジウム2000 2000年11月 横浜

7. 知的財産権の出願・登録状況

(ア) 特許出願

発明の名称：宿主内埋め込み用構造体および繁殖方法

(イ) 実用新案登録

なし

(ウ) その他

なし

協力研究者

松岡 厚子

(国立医薬品食品衛生研究所 療品部)

白畑 実隆

(九州大学大学院農学研究院 遺伝子資源工学部門、細胞制御工学教室)

市川 明

(国立医薬品食品衛生研究所 現：京都工芸繊維大学 繊維学部)

吉原なみ子

(国立感染症研究所 エイズ研究センター)

表1. ヒト細胞のウイルス検査

細胞	HCV	EBV	CMV	HSV	B19
ヒト皮膚線維芽細胞	—	—	—	—	—
ヒト軟骨細胞	—	—	—	—	—
ヒト血管内皮細胞	—	—	—	—	—

表2. γ 線照射コラーゲンにおけるウイルス培養液の感染力価

コラーゲン γ 線照射条件(kGy)	接種ウイルス感染力価	
	100TCID ₅₀ /0.1ml	1000TCID ₅₀ /0.1ml
0	10 ^{5.5}	10 ^{5.0}
10	10 ^{5.0}	10 ^{5.3}
25	10 ^{5.0}	10 ^{5.3}
50	10 ^{5.0}	10 ^{4.7}
ウイルス対照	10 ^{5.3}	10 ^{5.3}

(単位：TCID₅₀/0.025ml)

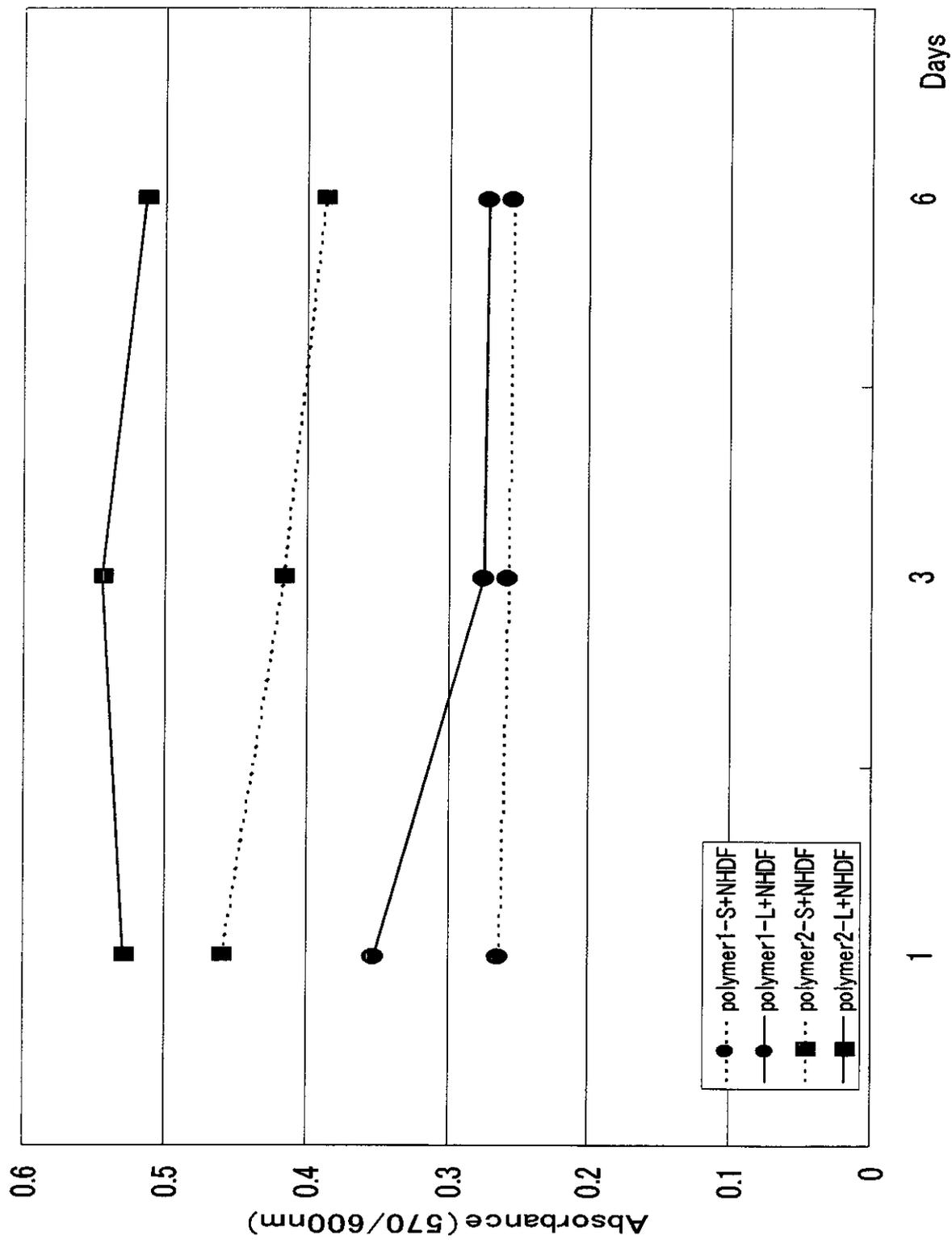


図1 ポアサイズの異なる2種の3Dポリマーでのヒト皮膚組織芽細胞の増殖

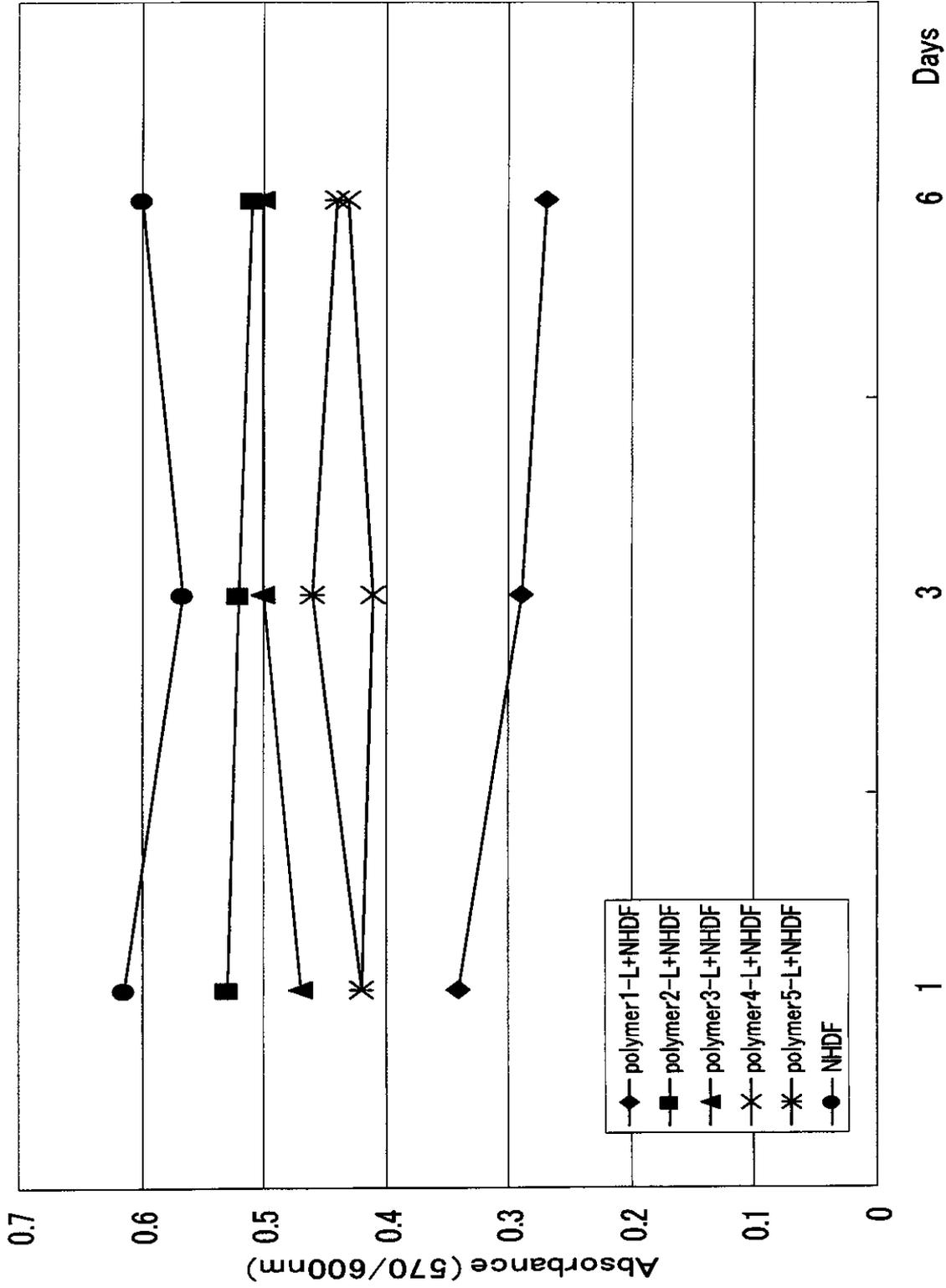


図2 同じポアサイズの5種の3Dポリマーでのヒト皮膚組織芽細胞の増殖