

図1 P19 細胞をレチノイン酸存在下細菌用プレートで1日間培養し、凝集状態の細胞

Control (DMSO 0.1%)



Retinoic acid (1  $\mu$ M)

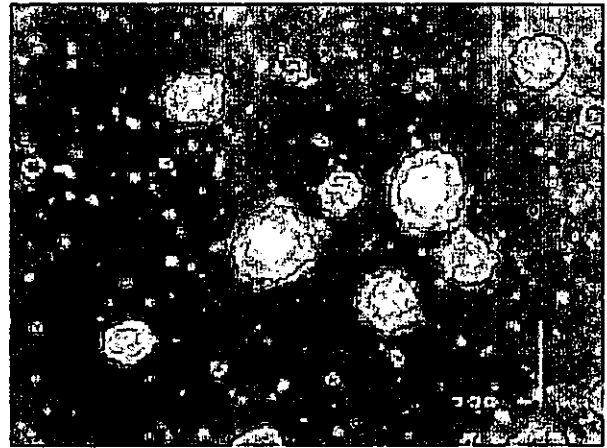


図2 P19細胞をレチノイン酸存在下4日間培養し、分化培地に移し3日目の分化した細胞

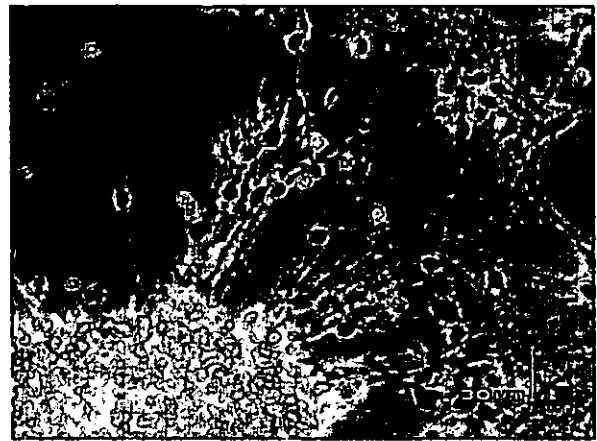
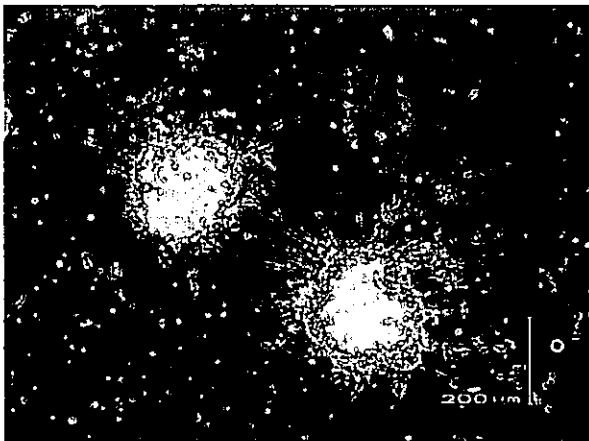
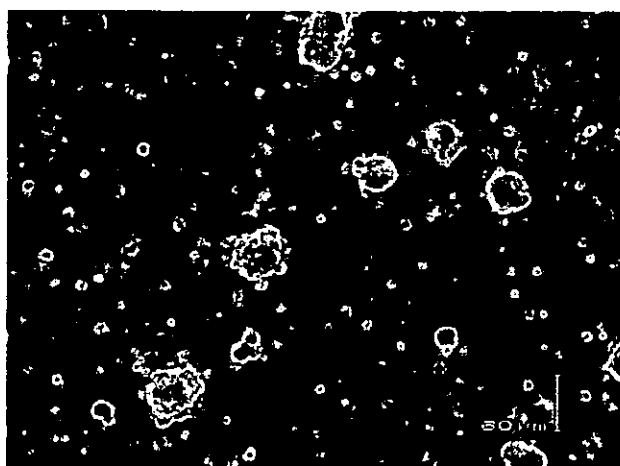
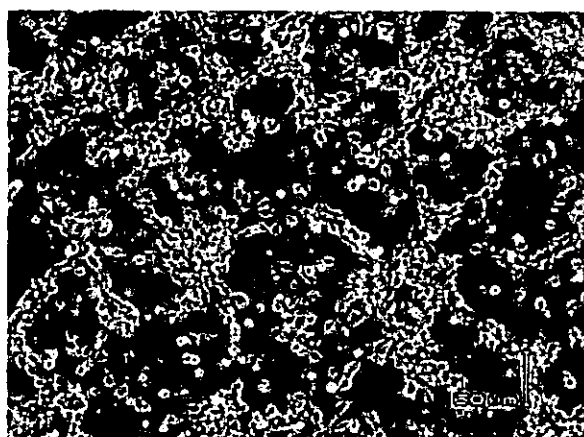
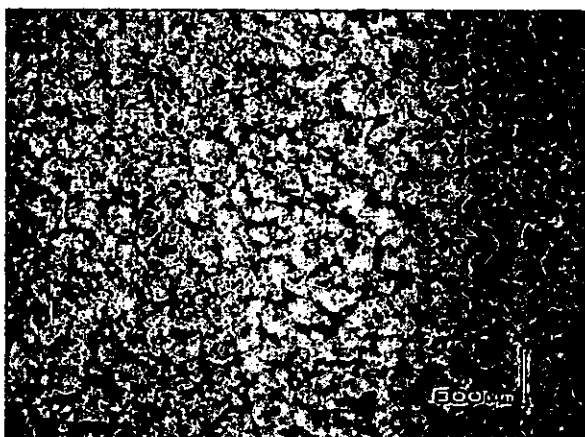


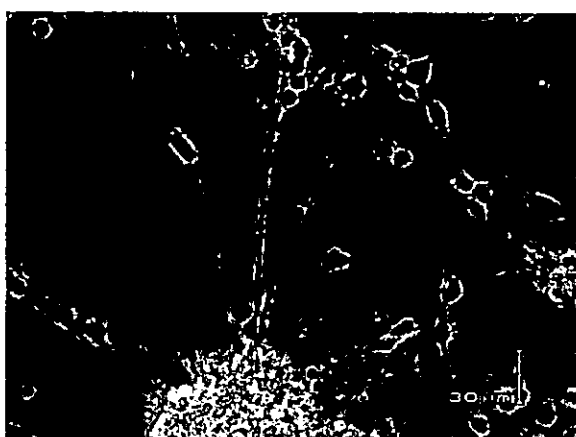
図3 分化誘導後細胞をトリプシンでばらし分化培地で培養した細胞



Control (レチノイン酸を加えないで培養したもの)



1日目 細胞が集まりはじめ、神経突起を伸ばす



3日目 密にネットワークを形成

図4 P19細胞はレチノイン酸でニューロンタイプの神経細胞に分化する

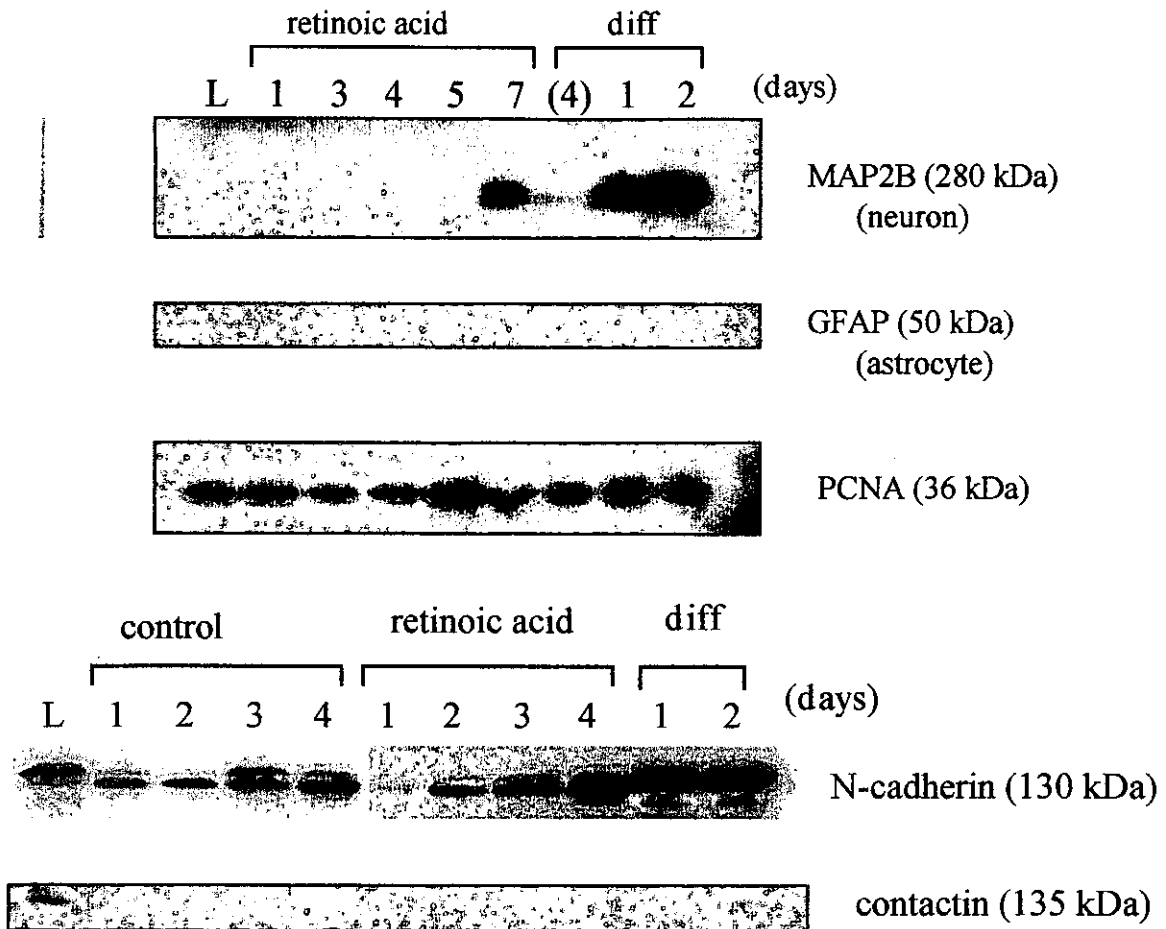


図5 P19細胞の分化誘導時のDNA複製関連因子の挙動

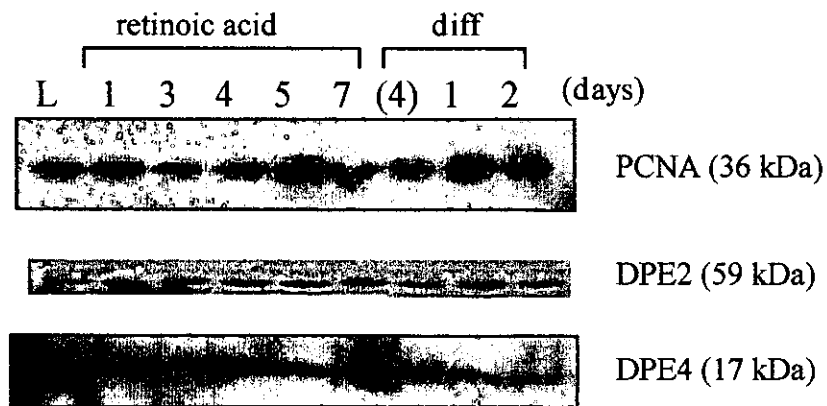


図6 P19細胞の分化誘導時の増殖関連因子の挙動

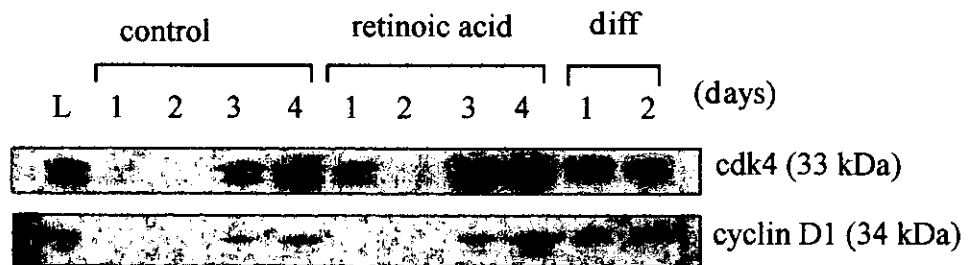
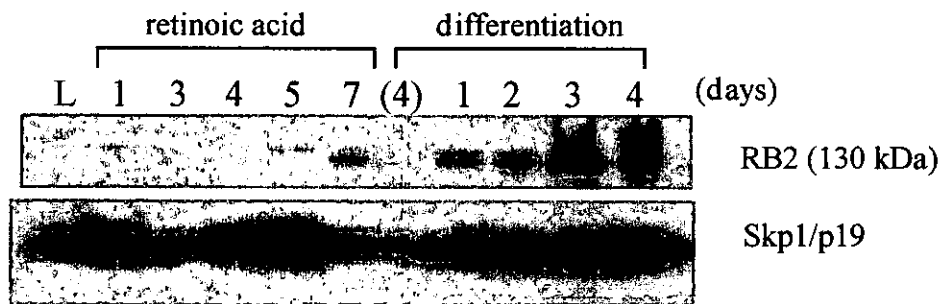
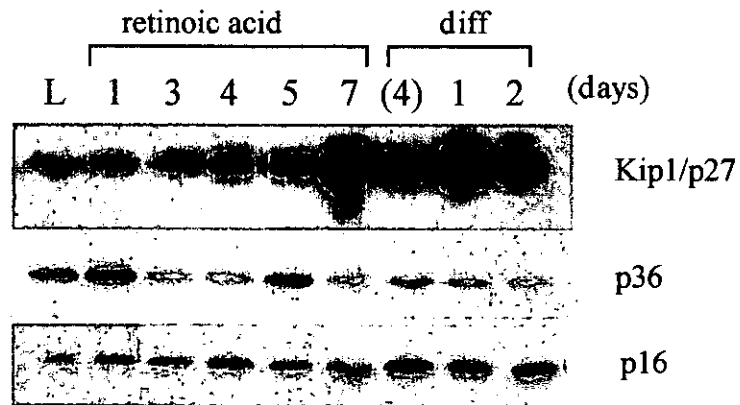


図7 P19細胞の神経細胞分化誘導時のプロテインプロファイル  
(A --- control, B --- + retinoic acid)

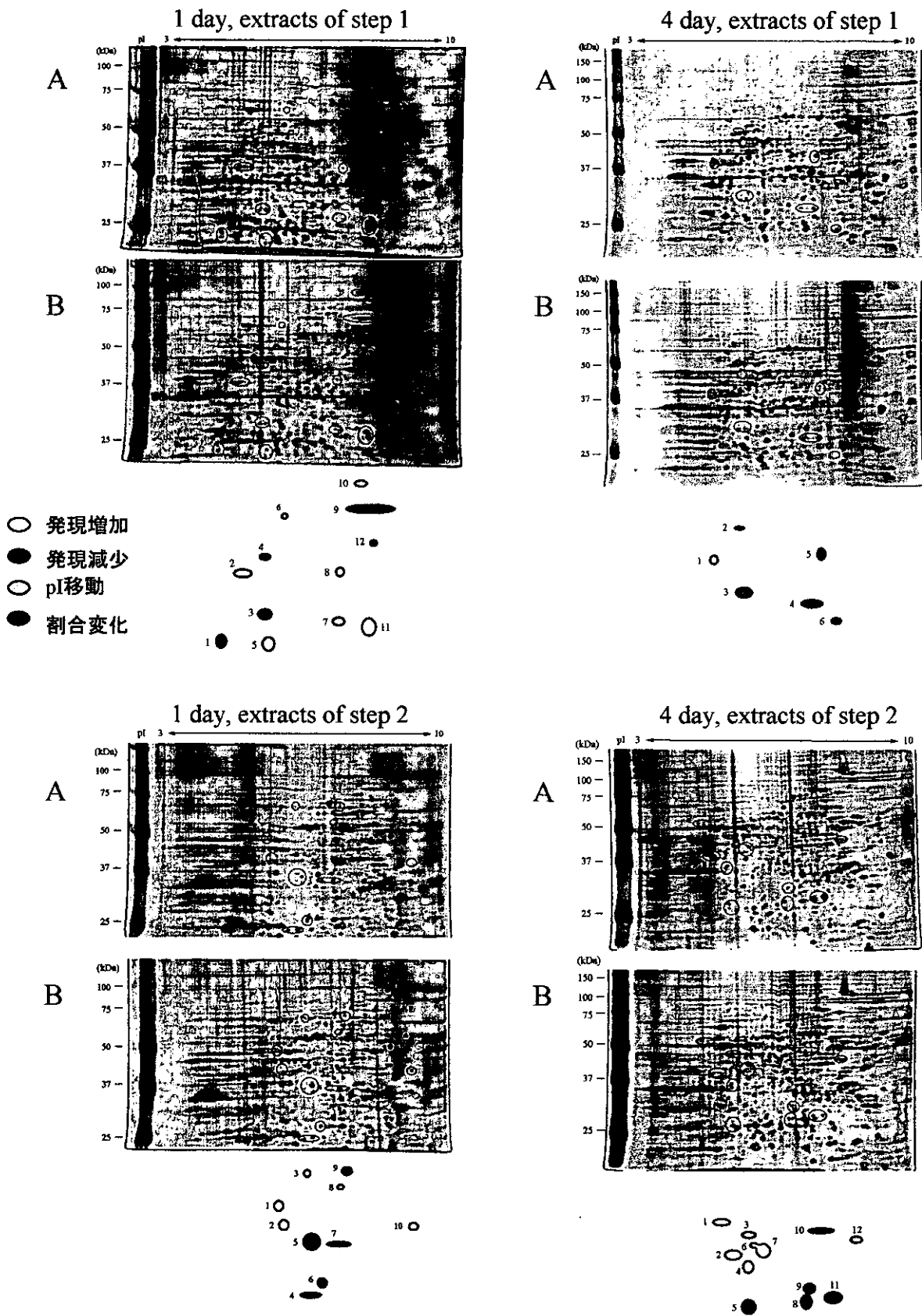


図8 ミオシン軽鎖の発現

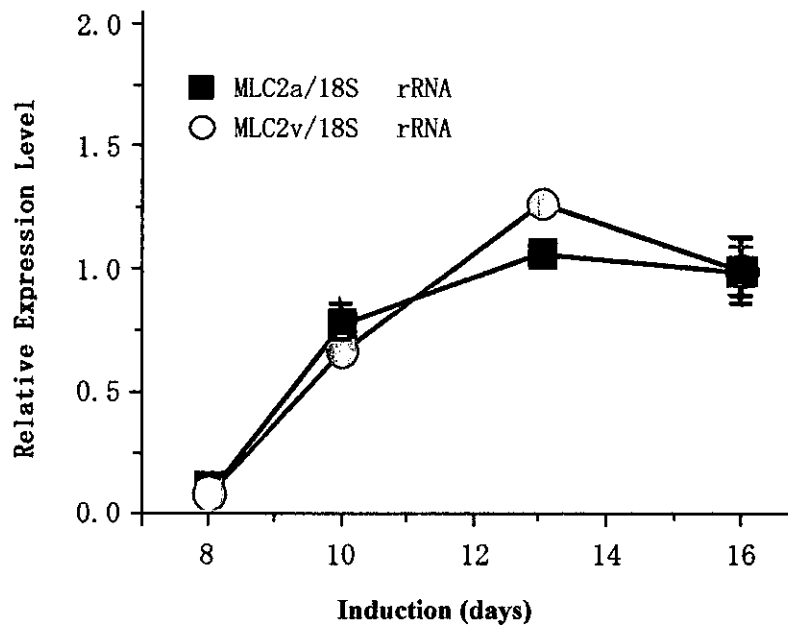
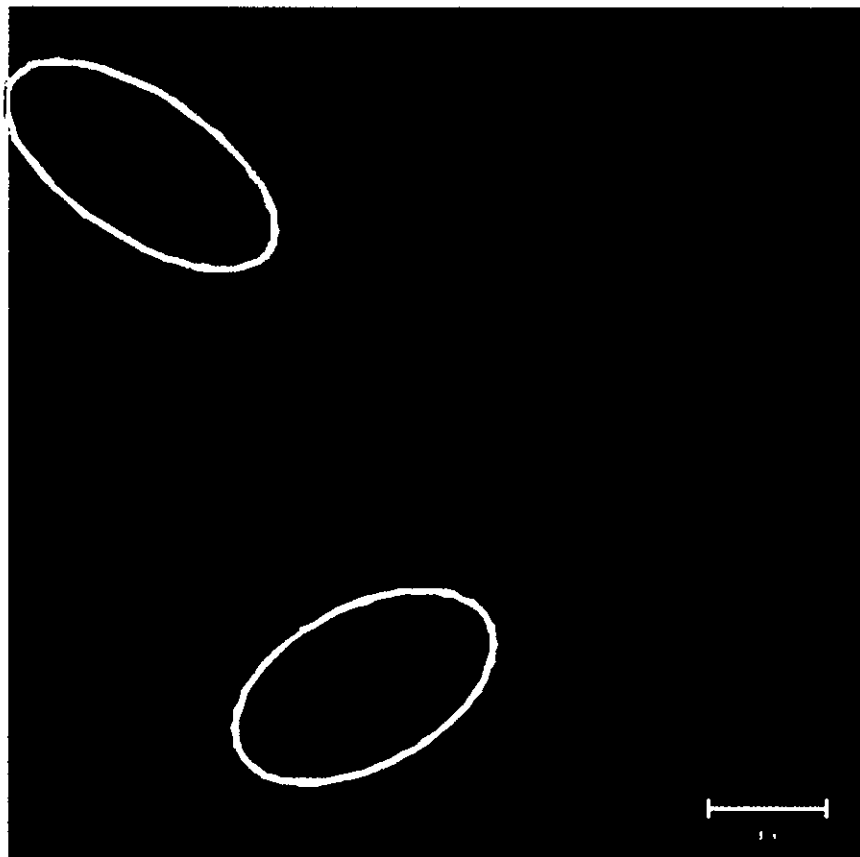


図9 心筋細胞分化後のP19 CL6細胞



ファロイジン染色(免疫蛍光抗体法)

表1 収縮タンパク質のアイソフォームからみた心筋細胞の表現型

発達段階	心房筋		心室筋		
	胎仔型	成獣型	胎仔型	新生仔型	成獣型
ミオシン重鎖	$\beta < \alpha$	$\alpha$	$\beta > \alpha$	$\beta < \alpha$	$\alpha$
平滑筋型 $\alpha$ アクチン	++	-	++	+	-
ミオシン軽鎖	2a	2a	$2a < 2v$	2v	2v
心房性ナトリウム利尿ペプチド	++	++	+	-	-
サルコリピン	+	++	-	-	-

図10 心房筋・心室筋の指標の定量

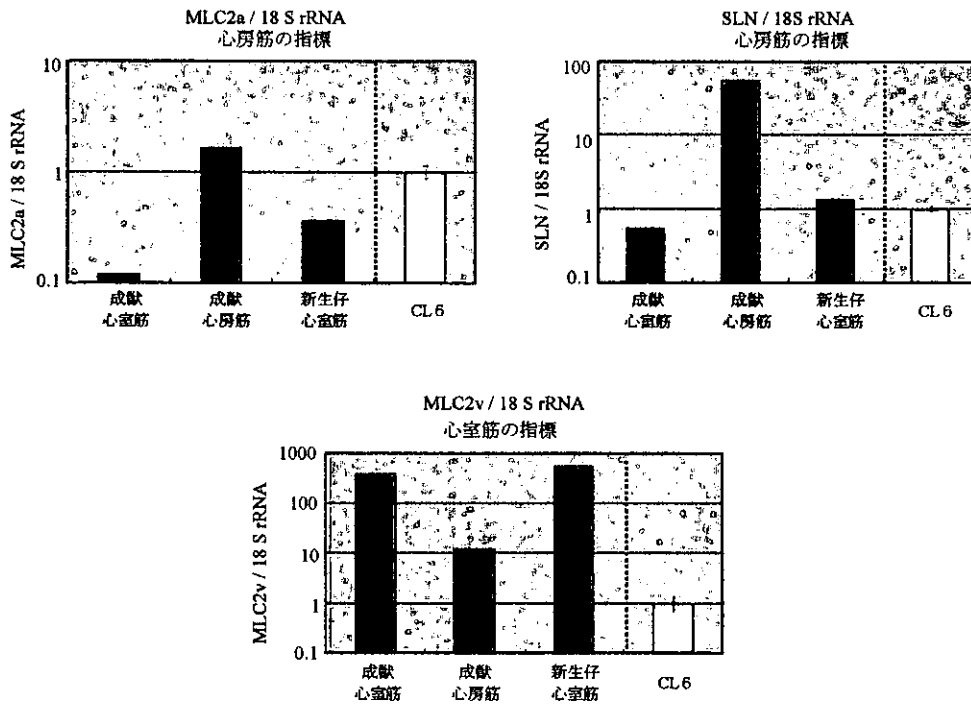


図11 CL6細胞は心房筋型発現をする

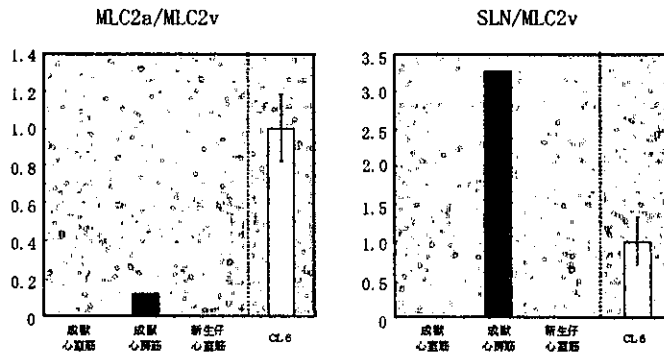


図12 幼若な心筋／成熟な心筋

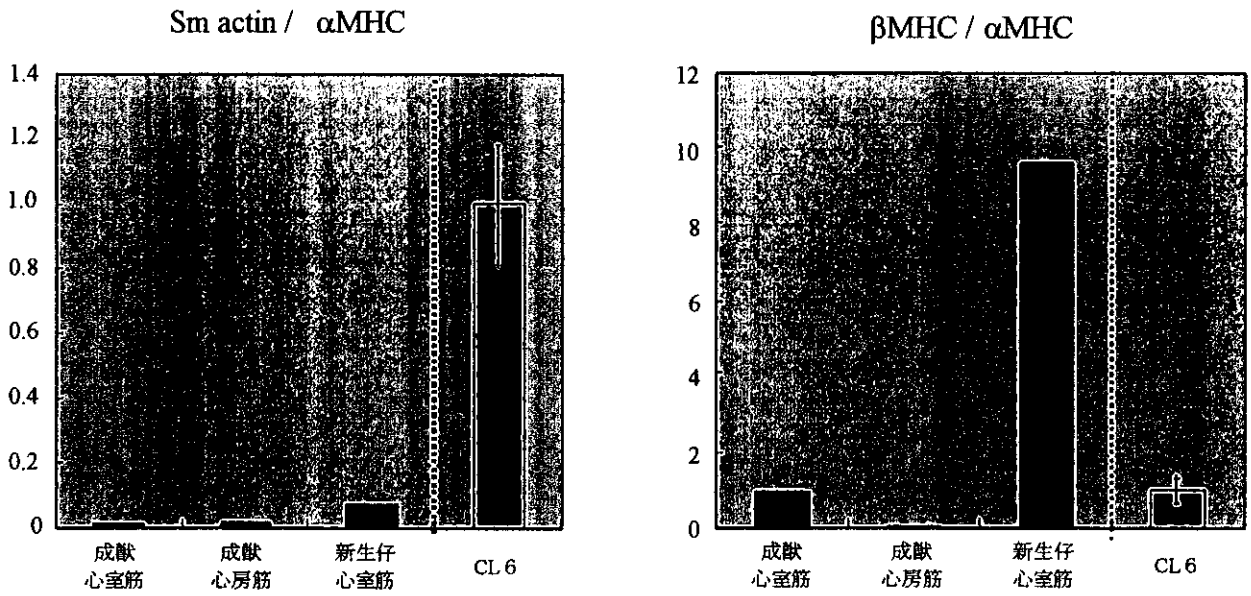
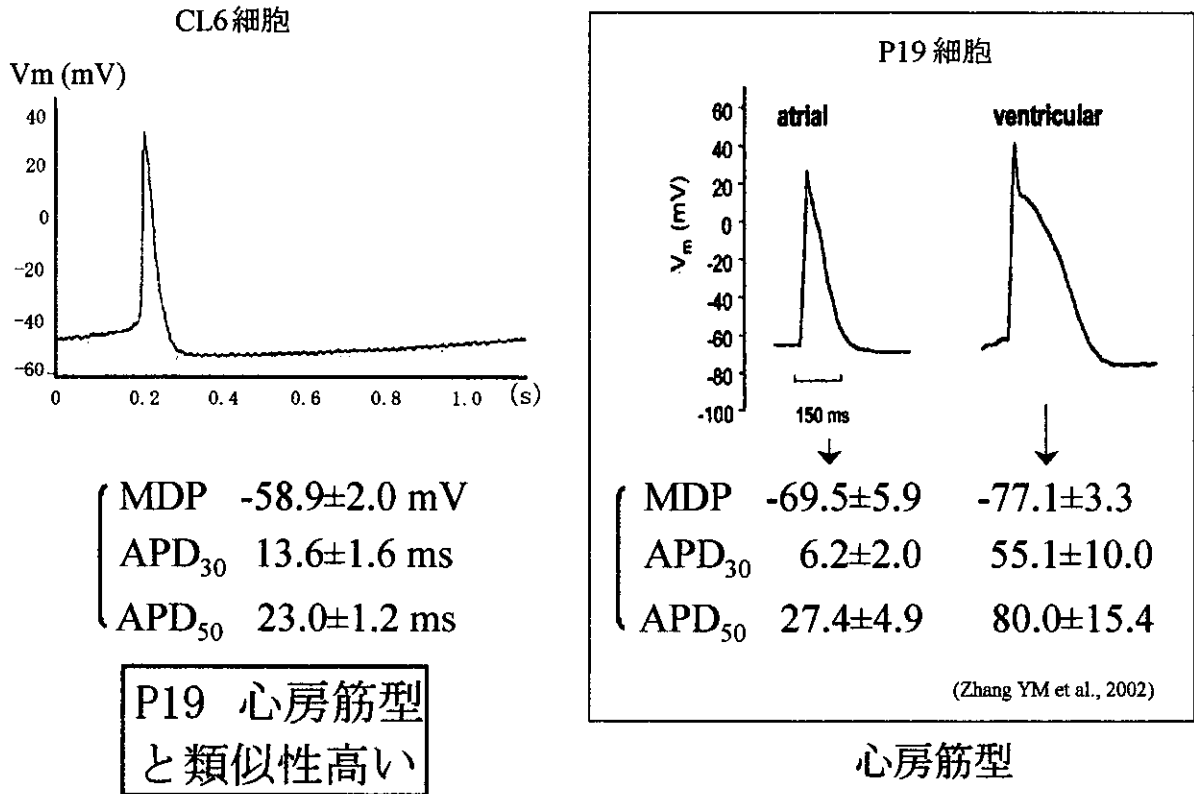


図13 活動電位の測定





厚生労働科学総合研究費補助金（ヒトゲノム・再生医療等研究事業）  
分担研究報告書

細胞・組織加工医薬品・医療用具の品質等の確保に関する研究

分担研究者：新見伸吾（国立医薬品食品衛生研究所生物薬品部第三室長）

研究要旨

細胞・組織加工医薬品の品質評価法の開発を目的として、肝細胞の幹細胞と考えられている小型肝細胞において特異的に発現するタンパク質の探索を小型肝細胞と成熟肝細胞のプロテオーム解析及び免疫化学的手法により試みたところ、アネキシンⅢ(AnxⅢ)が小型肝細胞において特異的に発現することが明らかになった。そこで、本年度は両細胞におけるAnxⅢ発現の違いが mRNA レベルによるものかどうか検討した。AnxⅢ mRNA レベルは分離直後の小型肝細胞と成熟肝細胞から Total RNA を調製し、RT-PCR法を用いて測定した。その結果、小型肝細胞から調製した Total RNA において、用いたプライマーから予想されるサイズの位置に PCR 産物を検出した。一方、成熟肝細胞から調製した Total RNA において PCR 産物は検出されなかった。また、両細胞のマーカータンパク質であるアルブミンの PCR 産物は、両細胞において同様な強度で検出された。さらに、肝細胞の分化マーカーであるチロシンアミノトランスフェラーゼ (TAT) 及びトリプトファンオキシゲナーゼ (TO) についても同様な検討を行った結果、各 PCR 産物は両細胞においてほぼ同様な強度で検出された。以上の結果から、両細胞における AnxⅢ発現の違いは mRNA レベルで調節されていること並びに TAT、TO は小型肝細胞の特性指標として有用ではないことが示された。

研究協力者

有賀豊彦 日本大学生物資源科学部教授

A. 研究目的

対象疾患ごとに必要な治療用細胞を大量生産・再構築することにより、それらの細胞が有する機能を利用することによって再生医療が実現しようとしている。特に肝疾患においては死亡者が毎年4万人ともいわれ、そのうち60歳以下の肝移植適応患者は年間3,500～5,000人と見積もられている。しかし適応拡大による移植症例数の急激な増加はドナー肝の有効利用を目的とした分

割肝移植や生体部分肝移植などの工夫にもかかわらず、深刻なドナー不足をもたらしている。最近、全肝移植までのブリッジ、肝不全の際の代謝補助、代謝疾患のための全肝移植に置き換わる方法として、肝細胞移植が有効であるといわれている。さらに、肝細胞移植に加えより高度な肝機能を発揮させるため、組織工学的手法を用いて正常肝に類似した組織を体内あるいは体外で構築し利用することも考えられている。しかしながら、臓器移植同様、肝細胞移植に用いるための肝細胞の不足は明らかであることから、ヒト肝細胞の培養、増殖、凍結保

存技術の開発は大きな課題であり、現在様々の検討が行われている。

最近、特に肝細胞移植への応用で注目されているのは小型肝細胞である。小型肝細胞は成熟ラットの肝臓の非実質画分にその存在が見出され、その表現系並びに超微細構造は成熟肝細胞と類似している点が多い。また、小型肝細胞をある特殊な培地で培養すると、コロニーを形成し、培養を続けるとこの細胞が積み重なるようになって管状あるいは嚢胞状構造を形成する。さらに、小型肝細胞は増殖能力が成熟肝細胞に比べてはるかに旺盛であり、継代培養も可能である。小型肝細胞を移植すると肝臓に生着し旺盛に増殖することも動物モデルで明らかになっている。最近、ヒトにおいても小型肝細胞の存在が報告されていることから、小型肝細胞の細胞治療への応用が期待されている。

このように有用性が明らかになっている小型肝細胞を実際細胞治療薬へと応用しようとする場合、重要な問題点の一つはその品質をどのように評価するかである。小型肝細胞は特に成熟肝細胞と多くの点で表現系が類似しているため両細胞の識別は困難である。現在まで小型肝細胞特異的に発現しているタンパク質を見出し、それを品質確保のマーカーとして使用しようとする試みが世界中の数多くの研究者により行われている。しかしながら、未だ有用なマーカーとして使用可能なタンパク質は見出されていない。そこで、小型肝細胞において発現し、成熟肝細胞において発現していないタンパク質の同定をプロテオーム解析及び免疫化学的手法により試みたところ、アネキシンⅢ(AnxⅢ)が小型肝細胞において特

異的に発現することが明らかになった。そこで、本年度は両細胞における AnxⅢの発現の違いが mRNA レベルによるものかどうか、RT-PCR 法により検討した。また、成熟肝細胞の分化マーカーであるチロシンアミノトランスフェラーゼ (TAT) 及びトリプトファンオキシゲナーゼ (TO) についても同様な手法により、小型肝細胞の特性指標としての有用性について検討を行った。

## B. 研究方法

### 1. 成熟及び小型肝細胞の調製

コラゲナーゼ灌流法により調製した細胞懸濁液を 50×g, 1 分遠心した。沈殿として得られた肝細胞を培地にて懸濁後同様な遠心操作を 3 回繰り返して成熟肝細胞を得た。成熟肝細胞はその細胞懸濁液を 45%パーコール密度勾配で 50×g, 10 分遠心し沈殿とすることにより更に精製を行った。一方、成熟肝細胞調製時の各遠心上清を集め、150×g, 5 分遠心した。沈殿として得られた小型肝細胞と他の非実質細胞を培地にて懸濁後同様な遠心操作を 3 回繰り返した。沈殿として得られた細胞を懸濁後 50×g, 2 分遠心し小型肝細胞を得た。小型肝細胞はその細胞懸濁液を 45%パーコール密度勾配で 50×g, 24 分遠心し沈殿とすることにより更に精製を行った。

### 2. Total RNA の調製

Total RNA は QuickPrep® Total RNA Extraction kit (アマシャム バイオサイエンス) を用いて、添付の操作法に従い調製した。

### 3. cDNA 合成

一本鎖 cDNA は ThermoScript™ RT-PCR System (インビトロジェン) を用い、Oligo (dT)<sub>20</sub> をプライマーとして Total RNA より調製した。

#### 4. PCR 反応

ThermoScript™ RT-PCR System (インビトロジェン) を用いて PCR 反応 (熱変性: 94°C、30 秒、アニーリング: 60°C、30 秒、伸長反応: 72°C、1 分、サイクル数: 20) を行った。PCR に用いたプライマーの塩基配列、および予想される PCR 産物の塩基数は以下の通りである。

##### AnxIII primers#1:

5'-TTGAGAGCAAGGTGGACAGC-3'  
(sense strand),

5'-GCAGCTGTTGGAAGCCATCT-3'  
(antisense strand); 1019 bp.

##### AnxIII primers#2:

5'-CAAATTCACCGAGATCCTGT-3'  
(sense strand),

5'-TGCTGGAGTGCTGTACGAAA-3'  
(antisense strand); 472 bp.

##### TAT primers:

5'-GTCTAGCTGTGTTGGCCAAT-3'  
(sense strand),

5'-GTTTCGCTGAAGGATGCTCTT-3'  
(antisense strand); 550 bp.

##### TO primers:

5'-AGAGTACCTGTCTCCAGCAT-3'  
(sense strand),

5'-ACCAGGTACGATGAGAGGTT-3'  
(antisense strand); 687 bp.

##### Albumin primers:

5'-AAGGCACCCCGATTACTCCG-3'(sense strand),

5'-TGCGAAGTCACCCATCACCG-3'  
(antisense strand); 652 bp.

##### GAPDH primers:

5'-ACCACAGTCCATGCCATCAC-3'  
(sense strand),

5'-TCCACCACCCTGTTGCTGTA-3'  
(antisense strand); 452 bp.

#### 5. PCR産物の検出

PCR産物は2%アガロースゲル電気泳動で分離後、SYBR Green I で染色し、蛍光画像解析装置 (Fluor Imager 595, Molecular Dynamics社) で検出した。

#### C. 研究結果

図1は成熟肝細胞及び小型肝細胞由来の Total RNA を用いて調製した AnxIII を含む各種 PCR 産物を示している。なお、これら全ての PCR 産物において、用いた各プライマーから予想されるサイズの位置にバンドが検出された。小型肝細胞において Anx III PCR 産物が検出され、その強度は添加した cDNA 量に依存して増加した。一方、成熟肝細胞において AnxIII PCR 産物は検出されなかった。同様な結果が異なるプライマーを用いた場合においても得られた。TAT 及び TO については両細胞において PCR 産物が得られ、その強度は添加した cDNA 量に依存して増加し、両細胞においてほぼ同等であった。アルブミンについては、昨年度両細胞においてタンパク質レベルで同様な発現がみられることを報告したが、PCR 産物についてもほぼ同様な強度で検出された。なお、コントロールとして用いた常在遺伝子である GAPDH の PCR 産物については両細胞において、添加した cDNA に依

存して増加し、その強度は両細胞においてほぼ同様であった。

#### D. 考察

近年小型肝細胞の細胞治療薬への応用が期待され、小型肝細胞と成熟肝細胞で発現が異なるタンパク質を探索し、その品質評価の指標としての応用を目指した研究が活発に行われている。それらの研究の多くは小型肝細胞を培養し、分化した成熟肝細胞特異的あるいは肝細胞において普遍的に発現する既知のマーカートンパク質の発現を検討したものである。その結果、アルブミン、トランスフェリン、サイトケラチン8、サイトケラチン18など肝細胞における普遍的なマーカーは全て小型肝細胞に存在することが明らかになっている。また、分化型肝細胞のマーカーである $\alpha_1$ -アンチトリプシン、コネクシン32は培養初期には発現がみられず、培養時間の経過に伴い発現細胞の増加する傾向がみられている。一方、小型肝細胞において特異的に発現するタンパク質はこれまで同定されていない。

このように小型肝細胞と成熟肝細胞で発現が異なっているタンパク質の探索に関する研究が進んでいない理由の一つとして探索の対象となる既知のマーカートンパク質の数が限られていることが考えられる。これまでに我々は肝細胞を成熟肝細胞と小型肝細胞に分画し、プロテオームによる網羅的解析及び免疫化学的解析を試み、AnxIIIが小型肝細胞において特異的に発現することを明らかにした。本年度は両細胞におけるAnxIII発現レベルの違いがmRNAレベルによるものかどうか、RT-PCRにより調べた。その結果、発現の違いはmRNAレベルの違いによ

ることが明らかになった。また、本結果はRT-PCRによるAnxIII mRNAレベルの測定により小型肝細胞と成熟肝細胞が識別できることを示している。免疫化学的にAnxIIIを検出するには特異的な抗体が必要であるのに比べ、本法は特異的なプライマーを設定すれば、比較的簡便な操作でAnxIII mRNAを高感度で検出できる。従って、今後本法の小型肝細胞の品質評価法としての応用が期待される。

一方、先ほど述べたように、分化型肝細胞のマーカーは一般的に小型肝細胞の培養初期において発現がみられない。そこで典型的な肝細胞の分化マーカーであるTATとT0について小型肝細胞の特性指標としての有用性についても検討した。その結果、両細胞において同様な強度のPCR産物がみられたことから、両マーカーは有用ではないことが示された。

現在、全ての小型肝細胞においてAnxIIIの発現がみられるかどうか、小型肝細胞におけるアルブミンとAnxIIIの同時免疫組織染色により検討中である。また、インビボで発ガン物質等の投与により肝幹細胞が増殖することが知られているが、このような系における肝幹細胞でのAnxIIIの発現についても検討中である。今回肝幹細胞として小型肝細胞に着目して検討を行ったが、肝臓由来のもので小型ではないが肝幹細胞としての表現型を有するもの、小型ではあるが我々が解析を行った小型肝細胞との異同が明確でないもの、骨髄由来の肝幹細胞等様々な種類の肝幹細胞の存在が知られている。今後ヒト肝幹細胞の品質評価への応用を目指して、これら肝幹細胞についてもAnxIIIの発現を検討する必要がある。

今回小型肝細胞における特異的な発現が明らかになった AnxIII は 10 種類以上存在する Anx ファミリーの一つである。Anx はクロマフィン細胞の分泌顆粒を  $Ca^{2+}$  依存的に凝集させる因子として発見された因子である。その後、インビトロにおけるホスホリパーゼ A<sub>2</sub> 活性阻害、顆粒凝集、膜融合作用が多くの Anx に共通の作用と推定されている。最近各種 Anx の動物あるいは細胞レベルにおける作用が数々明らかにされつつあり、炎症反応、血液凝固反応、細胞情報伝達、ガン、自己免疫疾患等への関与が示唆されている。しかしながら、これらのレベルにおける AnxIII に特異的な機能は全く不明である。

このような状況において我々が小型肝細胞の表現型との関連で注目している AnxIII の機能は細胞内シグナル伝達である。実際、Anx ファミリーの一つである Anx I および II は細胞増殖におけるシグナル伝達物質として作用することが示されている。小型肝細胞の重要な特徴の一つとして高い増殖能があげられることから、AnxIII が細胞増殖におけるシグナル伝達物質として作用するならば、多量に存在し入手が比較的容易な成熟肝細胞に遺伝子導入することによりその増殖能を高め肝疾患の細胞治療薬として応用することも可能になると考えられる。今後このような応用も視野に含め小型肝細胞における AnxIII の機能についても解明する必要がある。

#### E. 研究発表

- [1] Gotoh Y, Niimi S, Hayakawa T, Miyashita T, Preparation of lactose-silk fibroin conjugates and

their application as a scaffold for hepatocytes attachment. Biomaterilas 2004;25 1131-1140

- [2] Niimi S, Oshizawa T, Yamaguchi T, Harashima M, Seki T, Ariga T, Kawanishi T, Hayakawa T, Specific expression of annexin III in rat small hepatocytes. 第 76 回 日本生化学会大会 (2003 年 10 月)
- [3] Harashima M, Nagaoka Y, Niimi S, Seki T, Ariga T, Kawanishi T, Hayakawa T, The mechanism of inhibition of dexamethasone-dependent induction of tyrosine aminotransferase activity by lactacystin, a proteasome specific inhibitor. 第 76 回 日本生化学会大会 (2003 年 10 月)
- [4] 新見伸吾、押澤 正、山口照英、原島 瑞、関泰一郎、有賀豊彦、川西 徹、早川堯夫、ラット肝細胞におけるアネキシンIIIの特異的な発現 第 10 回 肝細胞研究会 (2003 年 7 月)
- [5] 原島 瑞、新見伸吾、長岡陽子、関泰一郎、有賀豊彦、川西 徹、早川堯夫、初代培養ラット肝細胞においてプロテアソーム特異的阻害剤であるラクタシスチンはグルコシルコイド依存的なチロシンアミノトランスフェラーゼの誘導を阻害する第 10 回 肝細胞研究会 (2003 年 7 月)

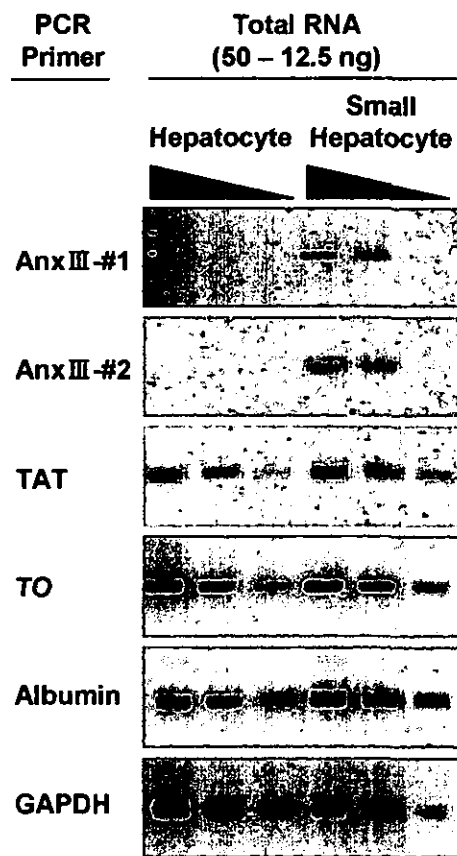


図 1. 成熟肝細胞及び小型肝細胞における RT-PCR を用いた各種 mRNA レベルの検討

研究成果の刊行に関する一覧表

書籍

著者氏名	論文タイトル名	書籍全体の編集者名	書籍名	出版社名	出版地	出版年	ページ
早川堯夫、 永田龍二	バイオロジクスの品質と 安全性評価、薬の安全性	長尾 拓		南山堂	東京		印刷中
早川堯夫	バイオテクノロジー応用 医薬品	内藤周幸	臨床試験 2003	薬事日報社	東京	2003	155-179
Nana KAWASAKI, Miyako OHTA, Satsuki ITOH, Takao HAYAKAWA	Analyses of glycoproteins and glycopeptides by liquid chromatography/mass spectrometry, and liquid chromatography/tandem mass spectrometry.	M. I. Aguilar	HPLC of Peptides and Proteins	The humana press inc,	Totowa	2003	263-274

研究成果の刊行に関する一覧表

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻名	ページ	出版年
Toru KAWANISHI, S. ISHIZAKI, N. KAWASAKI, R. SHIBAYAMA, Hiroshi. KAWAI, H. OHATA, K. MOMOSE, Takao HAYAKAWA	Abnormal fluorescence spectra of carboxy SNARF-1 acetoxymethyl acetate ester-loaded hepatocytes -Biotransformation of Carboxy SNARF-1, a pH probe-	Pfluger Archiv. Eur. J. Physiol			in press
Jun OKABE, Akiko EGUCHI, Renu WADHWA, Randeep RAKWAL, Rumi TSUKINOKI, Takao HAYAKAWA, Mahito NAKANISHI	Limited Capacity of the Nuclear Matrix to Bind Telomere Repeat Binding Factor TRF1 May Restrict the Proliferation of Mortal Human Fibroblasts	Human Molecular Genetics			in press
Nana KAWASAKI, Noritaka HASHII, Satsuki ITOH, Masashi HYUGA, Toru KAWANISHI, Takao HAYAKAWA	Glycome analysis by oligosaccharide profiling using liquid chromatography/ mass spectrometry	J. Electrophoresis	48		in press
Tetsu Kobayashi, Hiroshi Kawai, Takuo Suzuki, Toru Kawanishi, Takao Hayakawa	Improved sensitivity of insulin in MALDI-TOF MS by premixing matrix CHCA with transferrin	Rapid Communication in Mass Spectrometry			in press
Nagahata. M, Tsuchiya, T. et. al.	A novel function of N-cadherin and Connexin43 :Marked enhancement of alkaline phosphatase activity in rat calvarial osteoblast exposed with	Biochem. Biophys. Res. Commun			in press



	sulfated hyaluronan.				
Matsuoka A., Tsuchiya T.	Gene expression changes in Balb/3T3 transformants induced by poy(L-lactic acid) or polyurethane film.	J. Biomed. Mater. Res.			in press
Tsuchiya T.	A useful marker for evaluating the safety and efficacy of tissue engineered products.	ASTM			in press
Yang J, Ichikawa A, Tsuchiya T	Change of the cellular function by connexin gene transfection in a hepatoma cell line.	Animal cell technology			in press
Okada N., Gao J-Q., Sasaki A., Niwa M., Okada Y., Nakayama T., Yoshie O., Mizuguchi H., Hayakawa T., Fujita T., Yamamoto A., Tsutsumi Y., Mayumi T., Nakagawa S.	Anti-tumor activity of chemokine is affected by both kinds of tumors and the activation state of the host's immune system: implications for chemokine-based cancer immunotherapy	Biochem. Biophys. Res. Commun.	317	68-76	2004
Nakamura T., Peng K-W., Vongpunsawad S., Harvey M., Mizuguchi H., Hayakawa T., Cattaneo R., Russell S.J.	Antibody-targeted cell fusion	Nature Biotech	22	331-336	2004
Gotoh Y, Niimi S, Hayakawa T, Miyashita T	Preparation of lactose-silk fibroin conjugates and their application as a scaffold for hepatocytes attachment.	Biomaterilas	25	1131-1140	2004
Nana KAWASAKI, Satsuki ITOH,	Microanalysis of N-linked Oligosaccharides in a Glycoprotein	Anal. Biochem	316	15-22	2003

Miyako OHTA, Takao HAYAKAWA	by Capillary Liquid Chromatography/Mass Spectrometry and Liquid Chromatography/Tandem Mass Spectrometry				
Yuji NAGAYAMA, Hiroyuki MIZUGUCHI, Takao HAYAKAWA, Masami NIWA, Sandra M. Mclachlan, Basil RAPOPORT	Prevention of Autoantibody-Mediated Graves'-like Hyperthyroidism in Mice with Interleukin-4, a Th2 Cytokine	J. Immunol.	170	3522-3527	2003
T. Morioka, H. Koyama, H. Yamamura, S. Tanaka, S. Fukumoto, M. Emoto, H. Mizuguchi, T. Hayakawa, I. Kojima, K. Takahashi, Y. Nishizawa	Role of H1-Calponin in Pancreatic AR42J Cell Differentiation into Insulin-producing Cells	Diabetes	52	760-766	2003
Kita A., Uotani S., Kuwahara H., Takahashi R., Oshima K., Yamasaki H., Mizuguchi H., Hayakawa T., Nagayama Y., Yamaguchi Y., Eguchi K.	Vanadate enhances leptin-induced activation of JAK/STAT pathway in CHO cells.	Biochem. Biophys. Res. Commun	302	805-809	2003
Gao J-Q, Tsuda Y., Katayama K., Nakayama T., Yoshie O., Hatanaka Y., Tani Y.,	Antitumor effect by interleukin-11 receptor a-locus chemokine/CCL27, introduced into tumor cells through a recombinant adenovirus vector.	Cancer Res	63	4420-4425	2003

Mizuguchi H., Hayakawa T., Yoshie O., Tsutsumi Y., Mayumi T., Nakagawa S.					
Akiko ISHII-WATABE, Eriko UCHIDA, Akiko IWATA, Ryuji NAGATA, Kouei SATOH, Kejun FAN, Mitsuhiro MURATA, Hiroyuki MIZUGUCHI, Nana KAWASAKI, Toru KAWANISHI, Teruhide YAMAGUCHI, Takao HAYAKAWA	Detection of Replication-Competent Adenoviruses Spiked into Recombinant Adenovirus Vector Products by Infectivity-PCR	Mol. Therapy	8(6)	1009-1016	2003
Okada N., Masunaga Y., Okada Y., Iiyama S., Tsuda T., Matsubara A., Mori N., Mizuguchi H., Hayakawa T., Fujita T., Yamamoto A.	Gene transduction efficiency and the state of maturation in mouse dendritic cells infected with conventional or RGD fiber-mutant adenovirus vectors.	Cancer Gene Ther.	10	421-431	2003
Kunihiko Tanaka, Shinichiro Towata, Kazuhiko Nakao, Hiroyuki Mizuguchi, Takao Hayakawa, Masami Niwa, Nobuko Ishii, Yuji Nagayama	Thyroid Cancer Immuno-Therapy with Retroviral and Adenoviral Vectors Expressing Granulocyte-Macrophage Colony Stimulating Factor and Interleukin-12 in a Rat Model	Clinical Endocrinology	59	734-742	2003
Nana KAWASAKI, Miyako OHTA,	Analysis of glycopeptides and glycoproteins by liquid	Methods Molecular Biology	251	263-274	2003

Satsuki ITO, Takao HAYAKAWA	chromatography/mass spectrometry and liquid chromatography/tandem mass spectrometry				
Kanayasu-Toyoda T, Yamaguchi T, Oshizawa T, Uchida E, Hayakawa T:	The role of c-Myc on granulocyte colony-stimulating factor-dependent neutrophilic proliferation and differentiation of HL-60 cells.	Biochem. Pharmacol.	66	133-140	2003
Iwata,A., Satoh,K., Murata,M., Hikata,M., Hayakawa,T., Yamaguchi,T.	Virus concentration using sulfonated magnetic beads to improve sensitivity in nucleic acid amplification tests.	Biol. Pharm. Bull.	26	1065-1069	2003
Kanayasu-Toyoda T, Yamaguchi T, Oshizawa T, Hayakawa T:	CD31 (PECAM-1)-bright cells derived from AC133-positive cells in human peripheral blood as endothelial-precursor cells.	J Cell. Physiol.	195	119-129	2003
Niimi, S., Oshizawa, T., Yamaguchi, T., Harashima, M., Seki, T., Ariga, T., Kawanishi, T., Hayakawa, T.	Specific expression of annexin III in rat-small-hepatocytes.	Biochem. Biophys. Res. Commun.	300	770-774	2003
Satoh,K., Iwata,A., Murata,M., Hikata,M., Hayakawa,T., Yamaguchi,T.	Virus Concentration Using Polyethyleneimine-conjugated Magnetic Beads for Improvement of Sensitivity in Nucleic Acid Amplification Tests.	J Virol, Methods	114	11-19	2003
Haishima Y., Hasegawa C., Yagami T., Tsuchiya T., Matsuda, R., Hayashi Y.	Estimation of uncertainty in kinetic-colorimetric assay of bacterial endotoxin.	J. Pharmaceutical and Biomedical Analysis.	32	495-503	2003
Katakura Y, Nakata E, Tabira Y, Miura T, Teruya K, Tsuchiya T, Shirahata S	Decreased tumorigenicity in Vivo When Transforming Growth Factor $\beta$ Treatment Causes Cancer Cell Senescence	Biosci. Biotechnol. Biochem.	67	815-821	2003
Yang J, Ichikawa A, Tsuchiya T	A novel function of connexin32: marked enhancement of liver	Biochem. Biophys. Res. Commun.	307	80-85	2003