

- enhances calcification of vascular smooth muscle cells in vitro. XVIII World Congress International Society for Heart Research (2004年8月)
- 73) Nakamura RA, Satoh M, Fujishita K, Mori S, Ishida S, Yamaguchi T, Inoue K, Ohno Y, Nagao T, Sato Y Thyroid hormone regulates vascular smooth muscle calcification. 第78回日本薬理学会年会 (2005年3月)
- 74) Yoshida H, Tamehiro N, Hashimoto T, Nishimaki-Mogami T, Yamaguchi T, Ohno Y, Nagao T, Asakawa Y, Inoue K, Sato Y PPARgamma ligand activity of ginkglic acid-related compounds. 第78回日本薬理学会年会 (2005年3月)
- 75) 佐藤 光利, 中村 亮, 藤下 加代子, 森 聡子, 石田 誠一, 山口 照英, 井上 和秀, 長尾 拓, 大野 泰雄, 佐藤 陽治 血管平滑筋における甲状腺ホルモンターゲットの同定 第125回日本薬学会年会 (2005年3月)
- 76) 宮澤 宏, 喜納 克仁, 宮澤 薫, 佐藤 陽治, 山口 照英 幹細胞からの神経分化を左右する因子の探索 第125回日本薬学会年会 (2005年3月)
- 77) 土屋利江:「教育講演」再生医療実用化への道, 第4回日本再生医療学会
- 78) 柳楽 勤, 土屋利江, 阿部康次, 長幡 操: 陰イオン修飾ヒアルロン酸による正常ヒト表皮角化細胞の分化促進効果, 第6回日本組織工学会大会 (12-13 June, 2003)
- 79) 柳楽 勤, 土屋利江, 阿部康次, 長幡 操, 陰イオン修飾ヒアルロン酸による正常ヒト表皮角化細胞の分化促進及び細胞間連絡機構亢進効果, 第25回日本バイオマテリアル学会, (16-17, Dec. 2003)
- 80) 中岡竜介, 長幡操, 寺本彰, 阿部康次, 土屋利江: 高分子電解質錯体上での骨芽細胞の機能変化とその安全性の予測, 日本バイオマテリアル学会シンポジウム2004 (つくば, 2004年11月)
- 81) 中岡竜介, Susan Hsiang, 土屋利江, David J. Mooney: 細胞接着ペプチド修飾アルギン酸ゲル上での細胞機能変化, 日本バイオマテリアル学会シンポジウム2004 (つくば, 2004年11月)
- 82) 柳楽 勤, 土屋利江, 阿部康次, 長幡 操, 陰イオン修飾ヒアルロン酸による正常ヒト表皮角化細胞およびヒト間葉系幹細胞の分化促進効果 第3回日本再生医療学会総会, (May. 2004)
- 83) 柳楽 勤, 土屋利江, 阿部康次, 長幡 操, 陰イオン修飾ヒアルロン酸によるヒト間葉系幹細胞の分化促進効果 第26回日本バイオマテリアル学会, (Dec. 2004)
- 84) Tsutomu Nagira, Misao Nagahata, Toshie Tsuchiya.: Enhancement of cell differentiation in Normal Human Epidermal Keratinocytes and Human Mesenchymal Stem Cells by the anionic-modified hyaluronan. 第3回ナノテクノロジー総合シンポジウム (JAPAN NANO 2005), (Feb, 2005)
- 85) 土屋利江: 再生医療デバイス実用化のためにみらいせん展健康系イベントシンポジウム (11, Aug. 2004)
- 86) 土屋利江: 医療機器としての人工臓器の開発みらいせん展健康系イベントシンポジウム (7, Aug. 2004) .
- 87) 土屋利江:「ISO TC194 医療機器の生物学的評価と動物福祉」第27回日本学術会議 トキシコロジー研究連絡委員会シンポジウム (2004. 11) 東京
- 88) Saifuddin Afmed, Toshie Tsuchiya and Yutaka Kariya: Studies on the efficacy, safety and quality of the tissue engineered products: enhancement of proliferation of human mesenchymal stem cells by the new polysaccharides. 国際動物細胞工学会. 2004 11. Nagoya
- 89) Nasreen Banu, Toshie Tsuchiya, SaifUddin Afmed and Rumi Sawada: Studies on the efficacy, safety and quality of the tissue engineered products: toxic effects of catalyst used in chondrogenesis of human articular cartilage. 国際動物細胞工学会. 2004 11. Nagoya
- 90) Y uping Li, Tsutomu Nagira and Toshie Tsuchiya: Increase of the insulin secretion in HIT-T15 cells enhancement of gap functional intercellular communication

- caused by hyaluronic acid. 国際動物細胞工学会. 2004 11. Nagoya
- 91) Rumi Sawada, Tomomi Ito, Yoshie Matsuda and Toshie Tsuchiya: Safety evaluation of tissue engineered medical devices using normal human mesenchymal stem cells. 国際動物細胞工学会 2004 11. Nagoya
- 92) N. Nakamura and T. Tsuchiya: Effect of biodegradable polymer plla on the cellular function of human astrocyte. 国際動物細胞工学会. 2004 11. Nagoya
- 93) Toshie Tsuchiya: Regulation and Activities of Standardization for Tissue Engineered Products and Medical Devices in Japan. 4th ASIAN INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON BIOMATERIALS 2nd INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON FUSION OF NANO AND BIO TECHNOLOGIES (FNB) 2004 11. Tsukuba
- 94) 柳楽勤、土屋利江、阿部康次、長幡操: 「陰イオン修飾ヒアルロン酸によるヒト間葉系幹細胞の分化促進効果」日本バイオマテリアル学会シンポジウム 2004 (2004. 11) つくば
- 95) 中岡竜介、Susan Hsiung、土屋利江、David J. Mooney: 「細胞接着ペプチド修飾アルギン酸ゲル上での細胞機能変化」日本バイオマテリアル学会シンポジウム 2004 (2004. 11) つくば
- 96) 松岡厚子、松田良枝、齋島由二、長谷川千恵、土屋利江: 「医療機器の生物学的安全性試験の標準化に関する研究: 医用材料関連物質による染色体数異常の誘発」日本バイオマテリアル学会シンポジウム 2004 (2004. 11) つくば
- 97) 齋島由二、樋口多恵、瀬下文恵、長谷川千恵、矢上健、土屋利江、中橋敬輔、井之上浩一、伊藤里恵、中澤裕之: 「PVC 製医療機器からの DEHP 溶出リスクを予測する簡易分析法の開発」日本バイオマテリアル学会シンポジウム 2004 (2004. 11) つくば
- 98) 齋島由二、瀬下文恵、伊佐間和郎、長谷川千恵、矢上健、土屋利江、中橋敬輔、井之上浩一、伊藤里恵、中澤裕之: 「PVC 製医療機器の光照射・熱処理による DEHP 溶出挙動の解析」日本バイオマテリアル学会シンポジウム 2004 (2004. 11) つくば
- 99) 齋島由二、長谷川千恵、小園知、伊佐間和郎、佐々木和夫、矢上健、土屋利江: 「エンドトキシン不活化処理を施した天然医用材料の生体親和性評価」日本バイオマテリアル学会シンポジウム 2004 (2004. 11) つくば
- 100) 伊佐間和郎、齋島由二、長谷川千恵、小園知、佐々木和夫、土屋利江: 「ガンマ線照射天然医療材料の生体適合性評価」日本バイオマテリアル学会シンポジウム 2004 (2004. 11) つくば
- 101) 伊佐間和郎、土屋利江: 「ガンマ線照射ポリ乳酸のアパタイト形成能」日本バイオマテリアル学会シンポジウム 2004 (2004. 11) つくば
- 102) 五十嵐良明、鹿庭正昭、土屋利江: 「マウスを用いたタンパク材料の即時型アレルギー性評価」日本バイオマテリアル学会シンポジウム 2004 (2004. 11) つくば
- 103) 中岡竜介、長幡操、寺本彰、阿部康次、土屋利江: 「高分子電解質錯体上での骨芽細胞の機能変化とその安全性の予測」日本バイオマテリアル学会シンポジウム 2004 (2004. 11) つくば
- 104) Toshie Tsuchiya: Evaluation of Cell and tissue Based Products in Japan. The 2nd KFDA-KRIBB Joint International Symposium International Harmonization on Biopharmaceuticals. 2004 10. Korea
- 105) 土屋利江: 「前臨床試験としての動物モデル (特徴と限界) 総論」第 2 回医療機器フォーラム 医療機器・細胞組織医療機器の前臨床試験等について (2004. 10) 東京
- 106) 土屋利江: 招待講演「国内における医療用具の安全性対策について」第 4 2 回日本人工臓器学会大会 (2004. 10) 東京
- 107) 土屋利江: 招待講演「金属材料等の評価について」第 44 回日本歯科理工学会学術講演会 (2004. 9) 京都
- 108) 土屋利江: 「期待される材料開発」交流連携推進委員会 医療準備会 (2004. 8) 東京
- 109) 土屋利江: 「医療機器としての人工臓器の開発」みらいせんい展健康系イベントシンポジウム 人工臓器とファイバー (2004. 8) 東京
- 110) 土屋利江: 「再生医療デバイス実用化のために」みらいせんい展健康系イベントシンポジウム 再生量を切りひらくファイバーエンジニ

- アリング (2004. 8) 東京
- 111) 五十嵐良明、鹿庭正昭、土屋利江：「マウスを用いた医用材料のアレルギー性評価法に関する検討」日本トキシコロジー学会学術年会 (2004. 7) 大阪
- 112) 土屋利江：「医療用具の安全性」第35回バイオメディカルカリキュラム講義 (2004. 7) 東京女子医科大学
- 113) 土屋利江：「医療機器、医療材料の薬事法改正による安全性確保対策等について」第20回日本人工臓器学会 教育セミナー (2004. 7) 東京
- 114) Nasreen Banu, Toshie Tsuchiya, Saifddin Ahmed, Rumi Sawada: Studies on the efficacy, safety and quality of the tissue engineered products: Influence of a catalyst used in the synthesis of biodegradable polymer on chondrogenesis of human articular cartilage. 第7回日本組織工学会 (2004. 7) 東京
- 115) Saifddin Ahmed, Toshie Tsuchiya, Yutaka Kariya: Studies on the efficacy, safety and quality of the tissue engineered products: Effect of new polysaccharides in Human mesenchymal stem cells. 第7回日本組織工学会 (2004. 7) 東京
- 116) 澤田留美、伊藤友実、松田良枝、土屋利江：「細胞組織医療機器の有効性・安全性・品質評価に関する研究 (2) 遺伝子発現解析によるヒト間葉系幹細胞とポリ乳酸の相互作用について」第7回日本組織工学会 (2004. 7) 東京
- 117) 伊藤友実、澤田留美、松田良枝、松岡厚子、土屋利江：「胞組織医療機器の有効性・安全性・品質評価に関する研究 (3) - ヒト間葉系幹細胞における TGF- β の遺伝子発現解析について」第7回日本組織工学会 (2004. 7) 東京
- 118) 長幡操、柳楽勤、土屋利江、阿部康次「採取年齢の違いによるヒト骨芽細胞の分化の顕著な違いと硫酸化ヒアルロン酸に応答する細胞内シグナル伝達分子の探索」第7回日本組織工学会 (2004. 7) 東京
- 119) 土屋利江：「なぜ医療機器は海外で開発されるのか？ - 日本の現状と課題」次世代医療システム産業化フォーラム 2004 (2004. 6) 大阪
- 120) Toshie Tsuchiya, Nasreen Banu, Sadami Tsutsumi : Different action on the chondrogenesis of human articular chondrocytes with hyaluronic acid and collagen matrix. 7th World Biomaterial Congress (2004,5) Sydney
- 121) Toshie Tsuchiya: Recent Activities of Standards of Medical Devices and Tissue Engineered Products in Japan. International Conference on Biomaterials and Tissue Engineering 2004 (2004,5) Kuala Lumpur. (invited lecture)
- 122) Toshie Tsuchiya: Overview on Biological and Clinical Evaluation. International Conference on Biomaterials and Tissue Engineering 2004 (2004,5) Kuala Lumpur. (invited lecture) .
- 123) 土屋利江：「医療機器、細胞組織医療機器の製品化のための規制環境の整備について」東京大学医科学研究所 講演 (2004.4) 東京
- 124) 土屋利江：「再生医療に関わる評価技術とその標準化」第3回 CERES 研究会・講演会 (2004. 4) 東京

G. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得予定

- 特願 2003-8855 ギャップ機能抑制剤
- 特願 2004-1932332 ギャップ機能抑制剤、細胞増殖促進剤および硫酸化ポリフコース
- 特願 2004-167632 生体吸収性を有する新規材料、の製造方法、及びその用途
- 特願 2004-330417 生体組織補填材および生体組織補填体

表1. プライマー及びプローブ

Sindbis virus

5'-CAGGACGTCTATAACGCTCC-3'

5'-GAGAACCTGAACTGGGTGGTGTC-3'

HSV-1

5'-GCGTCATGGTACTGGCAAG-3'

5'-TTGACTCTACGGAGCTGGCC-3'

5'-TGGAGCTGATGCCGTAGTCGG-3' (TaqMAN Probe)

SV-40

5'-GACATTCCTAGGCTCACCTCAC-3'

5'-ACCTTGCCAAACTGTCCCTTAAA-3'

5'-CTTGAAAGAAGAACCCTAAAGA-3' (TaqMAN Probe)

Adenovirus

5'-TCCGGTCCTTCTAACACACCTC-3'

5'-ACGGCAACTGGTTTAATGGG-3'

TGAGATACACCCGGTGGTCCCGC-3' (TaqMAN Probe)

Poliovirus

5'-CCCGAGAAATGGGACGACTA-3'

5'-TGGAGCTGTTCCGTAGGTGTAA-3'

5'-ACATGGCAAACCTCATCAAATCCATCAATC-3' (TaqMAN Probe)

PPV

5'-AACAACTACGCAGCAACTCCAATA-3'

5'-ACGGCTCCAAGGCTAAAGC-3'

5'-AGGAGGACCTGGATTT-3' (TaqMAN Probe)

Real-time PCR/TR-PCR で用いたプライマーとプローブ。Sindbis virus の場合は Syber green を用いた。

表2. PEI 磁気ビーズによって濃縮されるウイルス

ウイルス	宿主	ウイルス ゲノム	脂質膜	PEI磁気 ビーズ濃縮
ヘルペスウイルスI型(HSV-1)	ヒト	DNA	+	+
ポリオウイルス	ヒト	RNA	-	-
ブタパルボウイルス(PPV)	ブタ	DNA	-	-
水疱性口内炎ウイルス(VSV)	ウシ	RNA	+	+
Sindbisウイルス	ヒト	RNA	+	+
SV-40ウイルス	サル	DNA	-	+
サイトメガロウイルス	サル	DNA	+	+
マウス白血病ウイルス	マウス	RNA	+	+
アデノウイルス	ヒト	DNA	-	+
B型肝炎ウイルス(HBV)	ヒト	DNA	+	+
C型肝炎ウイルス(HCV)	ヒト	RNA	+	+
ヒト免疫不全ウイルス(HIV)	ヒト	RNA	+	+
A型肝炎ウイルス(HAV)	ヒト	RNA	-	-

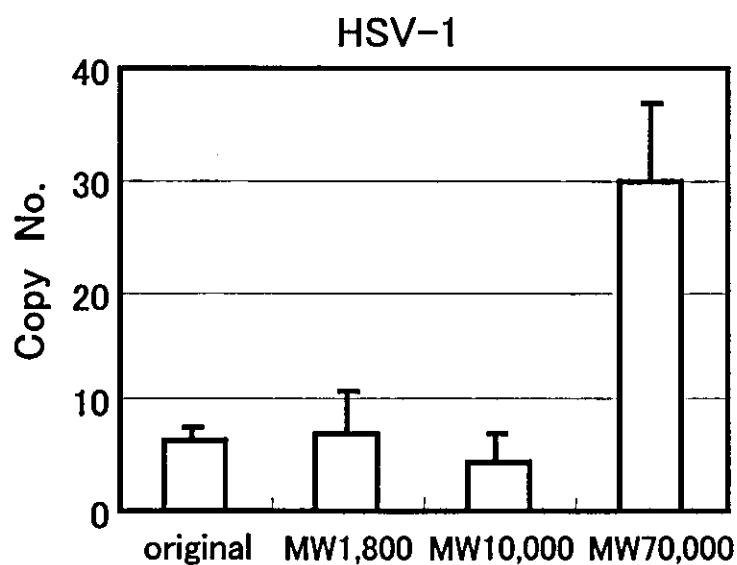


図1 ポリエチレンイミンの分子量とウイルス濃縮効率

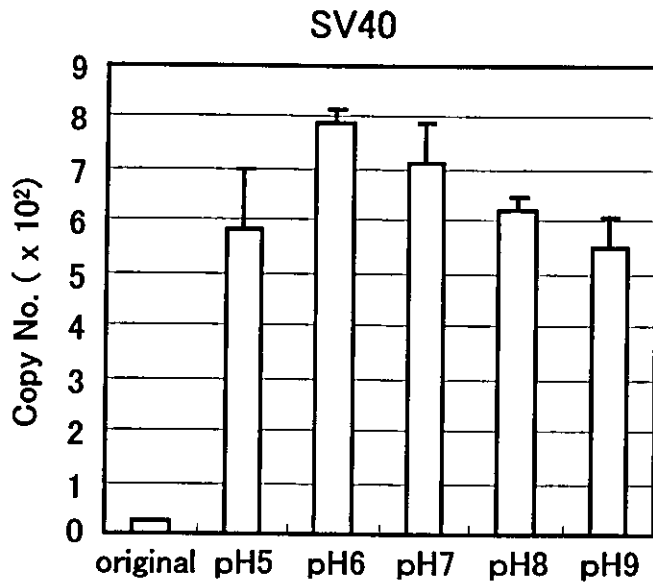


図2. PEI 磁気ビーズによるウイルス濃縮効率の pH による変化

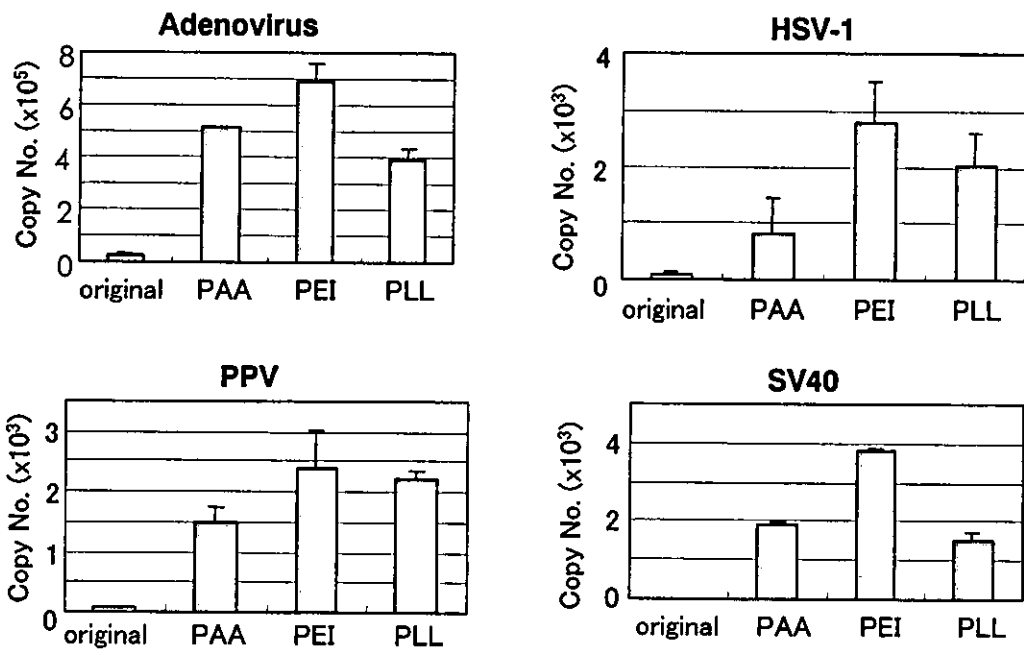


図3. 磁性粒子に結合するカチオン性ポリマーの違いによるウイルス濃縮効率の変化

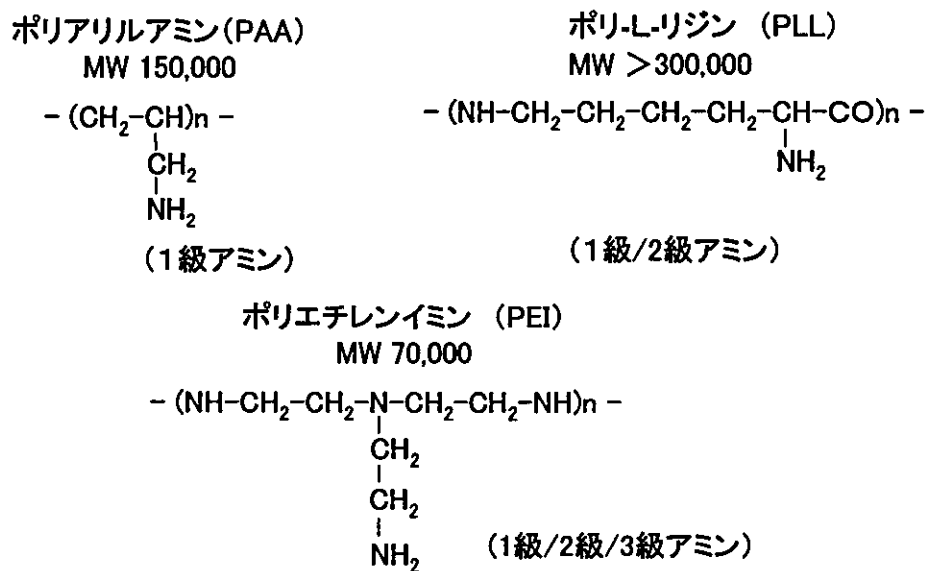


図4. ウイルス濃縮に用いたカチオン性ポリマーの構造式

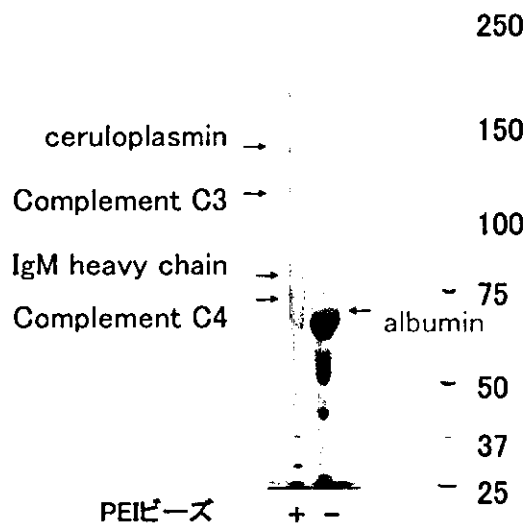
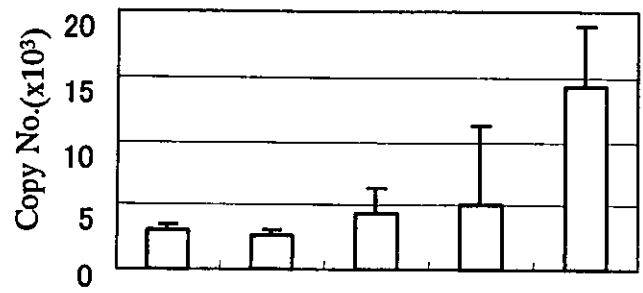


図5. PEI磁気ビーズにウイルスとともに濃縮される血清成分中の蛋白質のMS/MSによる同定



PEI-beads	-	+	+	+	+
Anti Poliovirus MoAb	-	-	+	-	+
Anti mouse Ig GP IgM	-	-	-	+	+

図6. 抗体存在下での PEI 磁気ビーズによるポリオウイルスの濃縮

図7 ECV304、EJ-1、T24 細胞株の位相差顕微鏡像

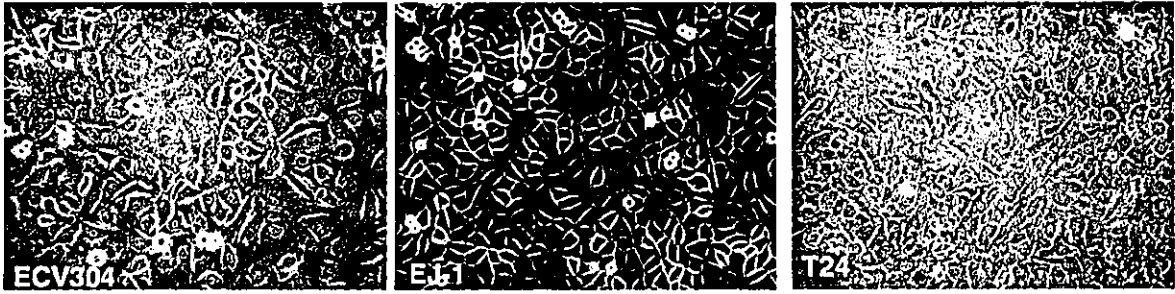
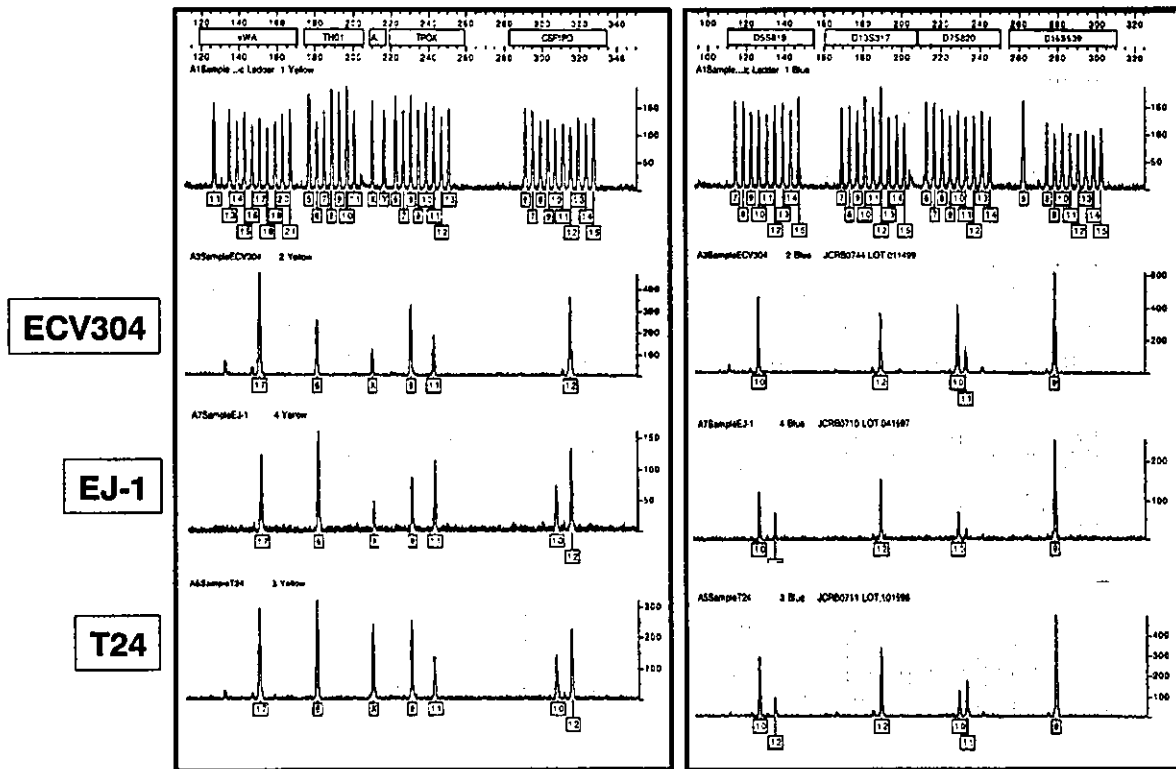


図8 3つの細胞間での9種類のSTRマーカーの一致



* 国立医薬品食品衛生研究所細胞バンクホームページより

図9 細胞間の遺伝子発現強度の比較

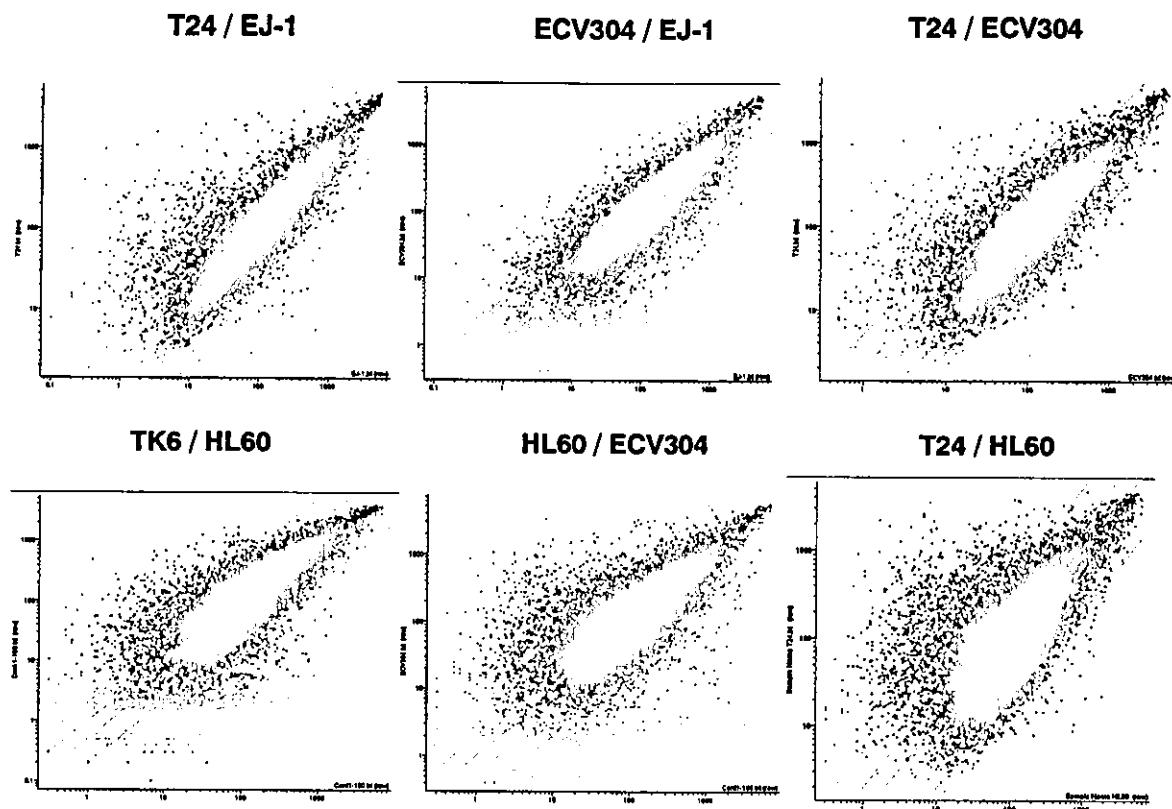


表3 細胞間の比較により差が見られた遺伝子数

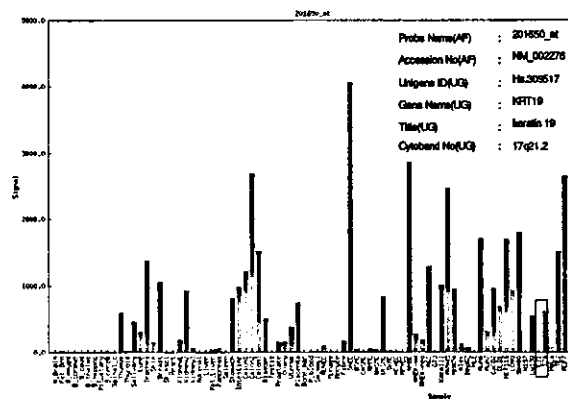
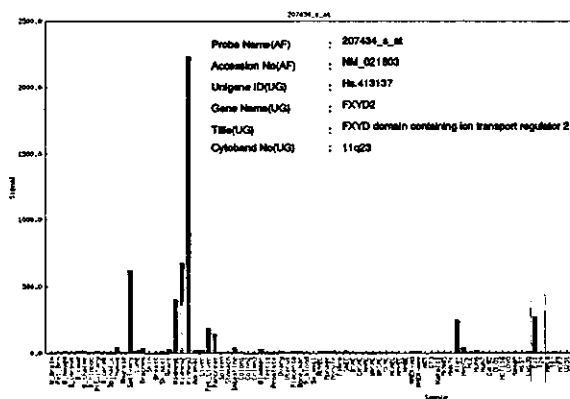
Fold difference	T24-EJ1	ECV304-EJ1	T24-ECV304	TK6-HL60	T24-HL60	ECV304-HL60
2	2648	2821	3310	4498	5305	4381
6	398	305	405	817	1228	936
10	255	128	198	453	720	562

表4 各種細胞間の遺伝子発現強度の相関係数と膀胱特異的遺伝子の発現

	ECV304	EJ-1	T24	HL60	HL60-RG	TK6	膀胱特異的遺伝子発現数 (/53)
ECV304	1	0.88	0.82	0.71	0.72	0.68	46
EJ-1	0.88	1	0.84	0.67	0.67	0.68	45
T24	0.82	0.84	1	0.62	0.63	0.65	53
HL60	0.71	0.67	0.62	1	0.89	0.78	37
HL60-RG	0.72	0.67	0.63	0.89	1	0.83	41
TK6	0.68	0.68	0.65	0.78	0.83	1	41

図10 T24とEJ-1にて発現が異なることが知られている遺伝子

(公開データベース上のデータ)



(今回の GeneChip 解析データ)

Probe ID	ECV304		EJ-1		T24		Gene title	Description
	Intensity	Call	Intensity	Call	Intensity	Call		
207434_s_at	25.6	P	663.9	P	5.5	P	FXYP domain containing ion transport regulator 2	ion transport potassium ion transport sodium ion transport
201650_at	0.7	A	0.6	A	952	P	Keratin 19	structural constituent of cytoskeleton structural molecule activity

図 1 1 tk 変異体の tk 遺伝子座における LOH (deletion) 解析

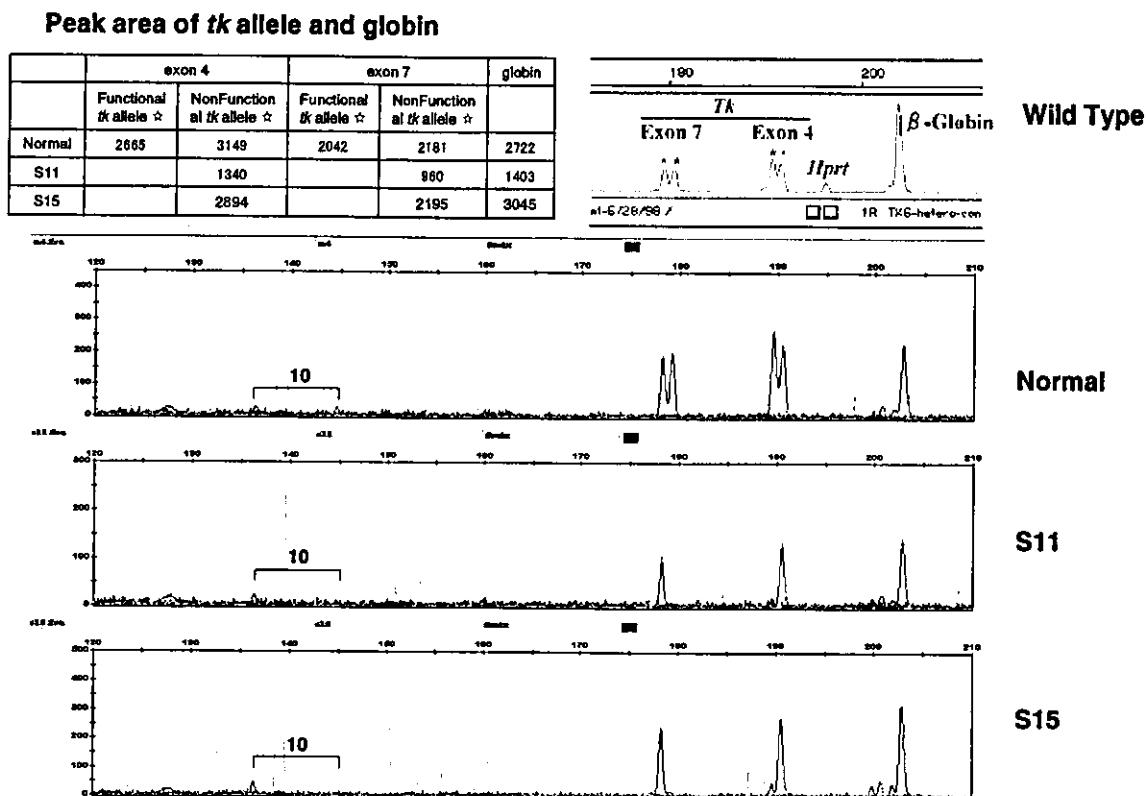


図 1 2 tk 変異体の 17 番染色体上の多型性マーカーを使った LOH 解析

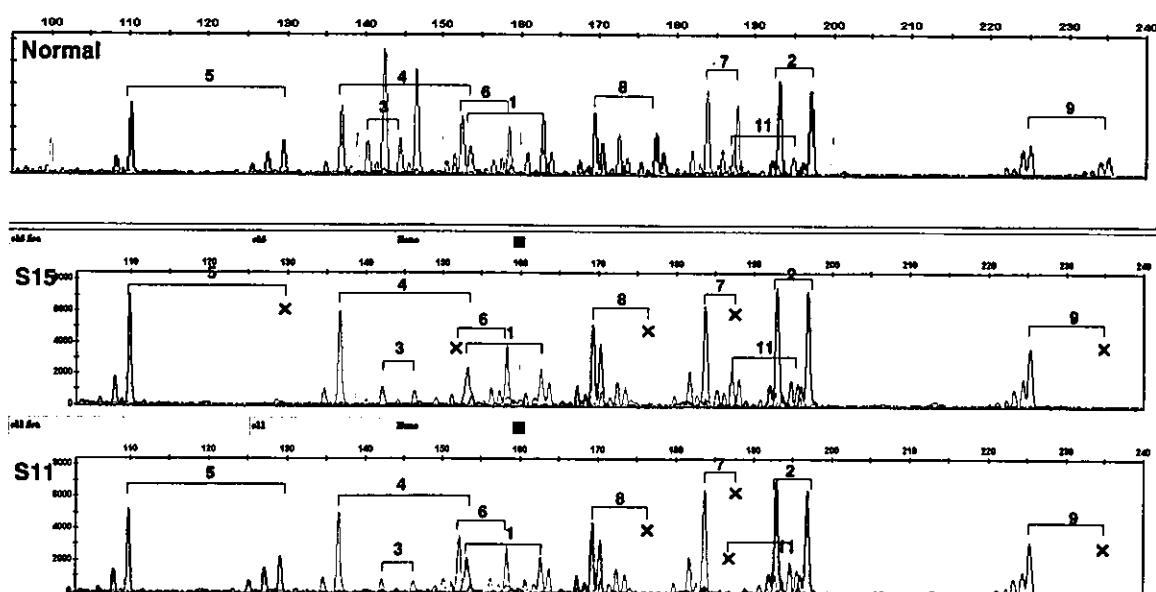


図13 CGHアレイのハイブリダイゼーションイメージ

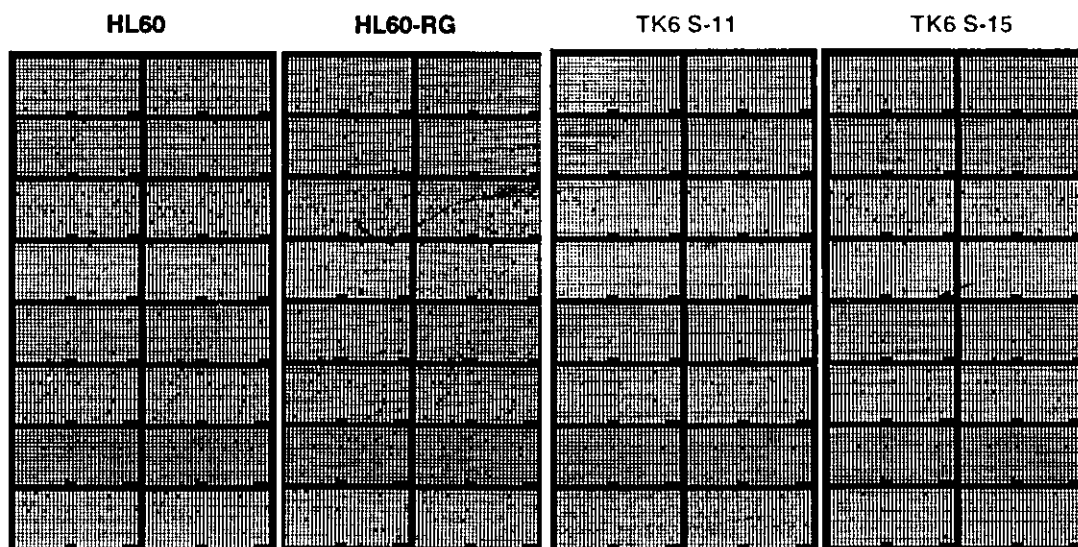


図14 CGHアレイによる染色体増幅、欠失領域の解析結果

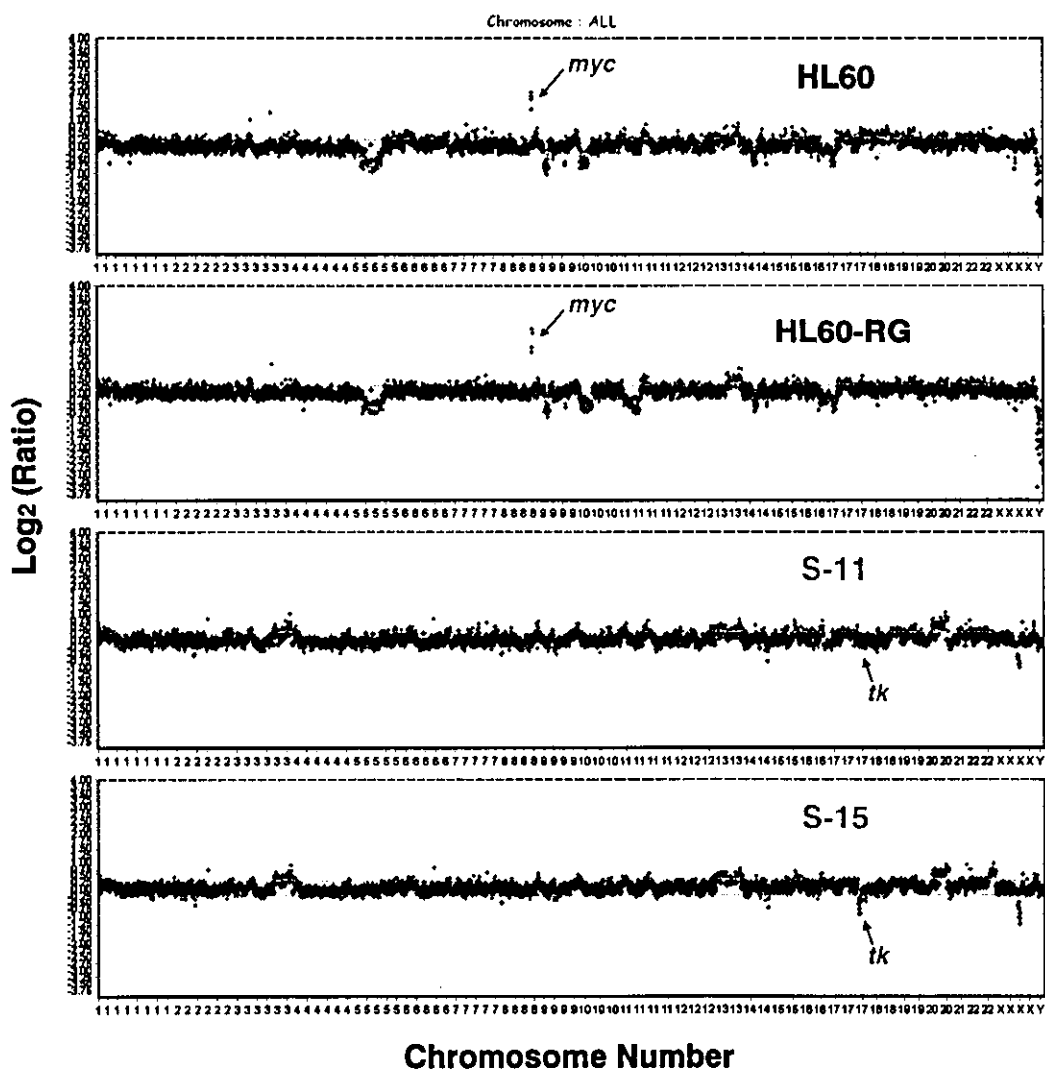


図15 HL60とTK6細胞の染色体ごとの詳細比較

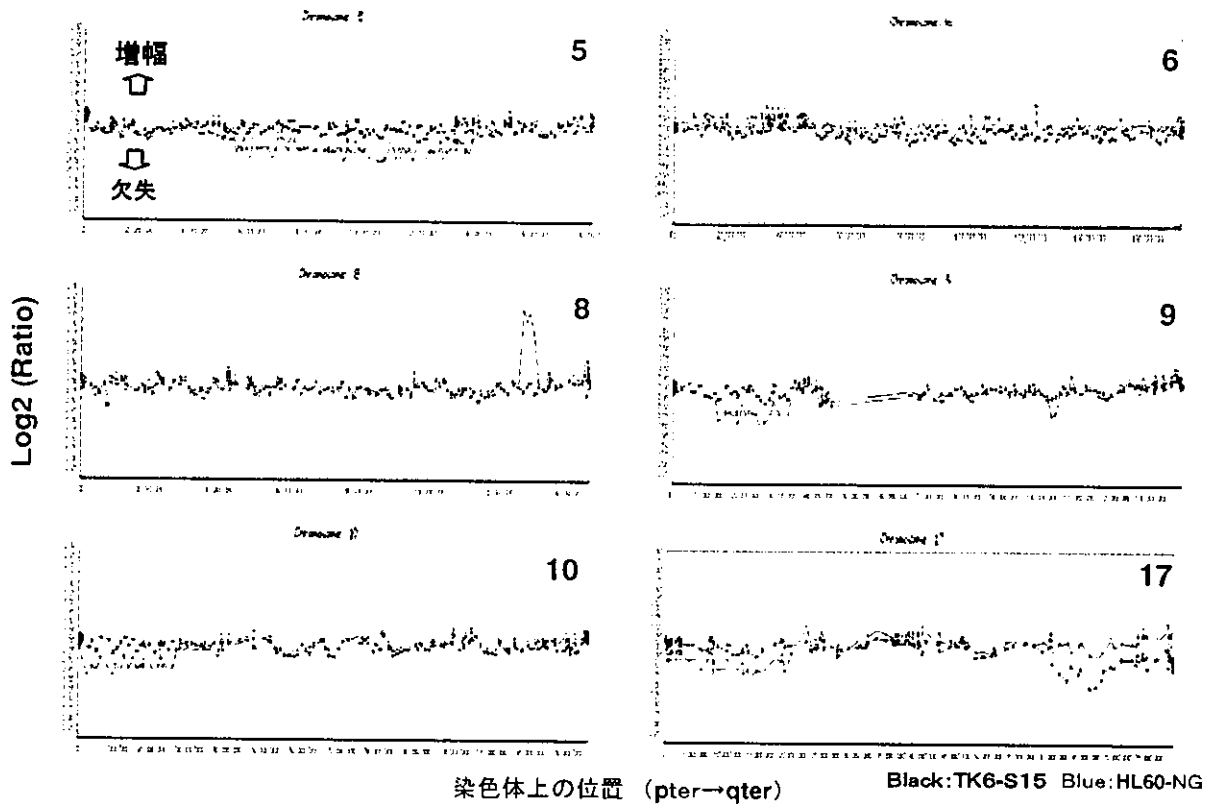


図16 STR マーカーを用いた解析より予想された欠失領域と CGH アレイ解析結果の比較

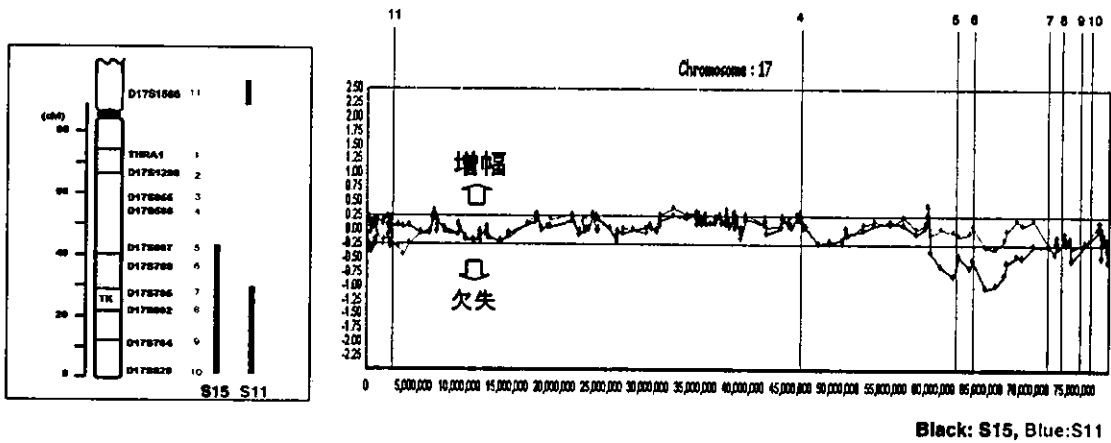


図17 TK6-S15 クローンにおける X 染色体上の増幅領域

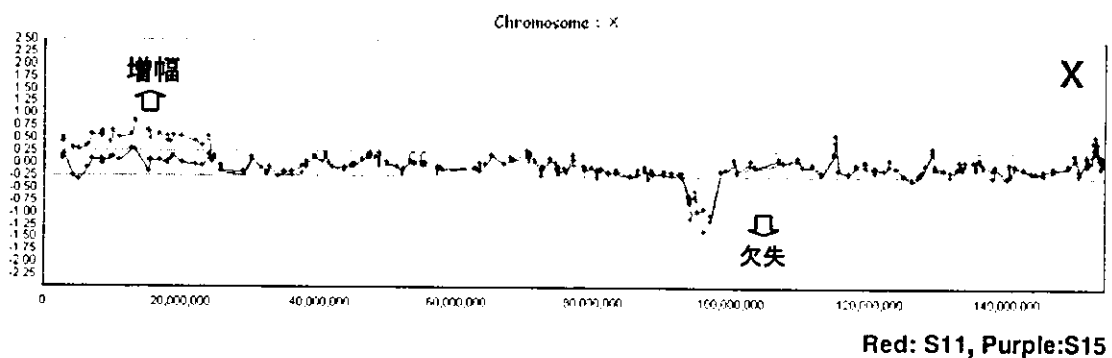


図18 TK6細胞のSKY法による核型分析と転座遺伝子における遺伝子の増減

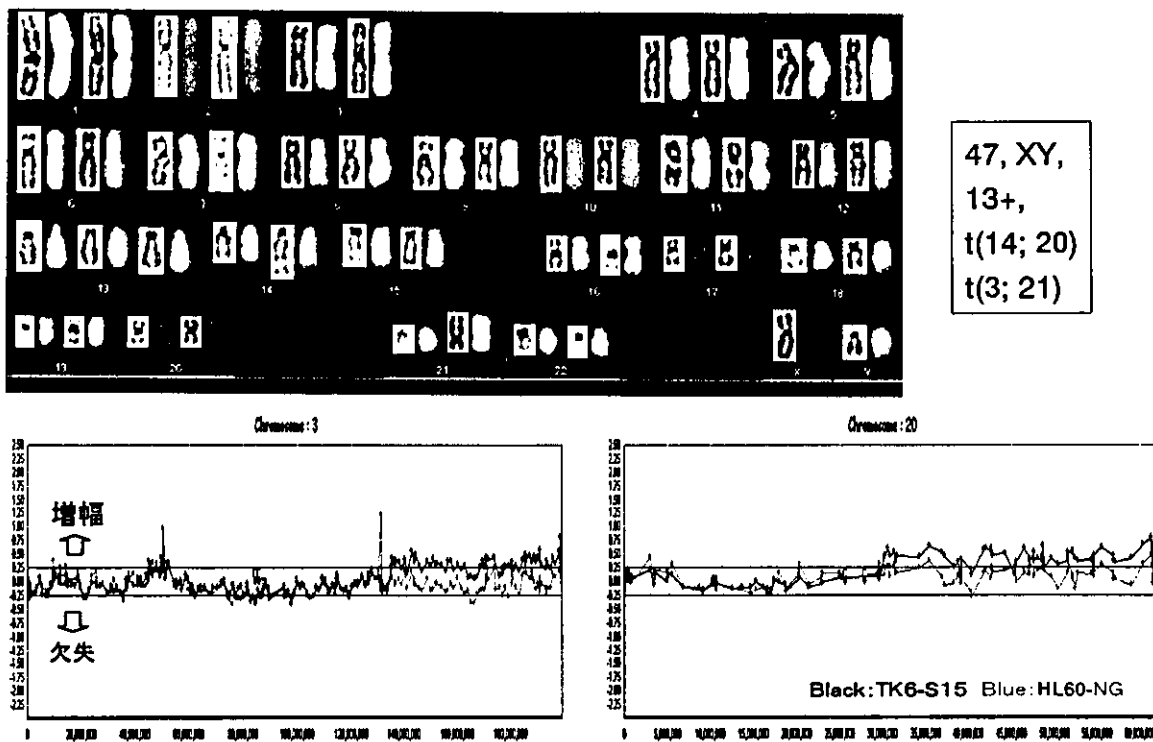


図19 HL60およびHL60-RG株のCGHとSKY法による核型分析

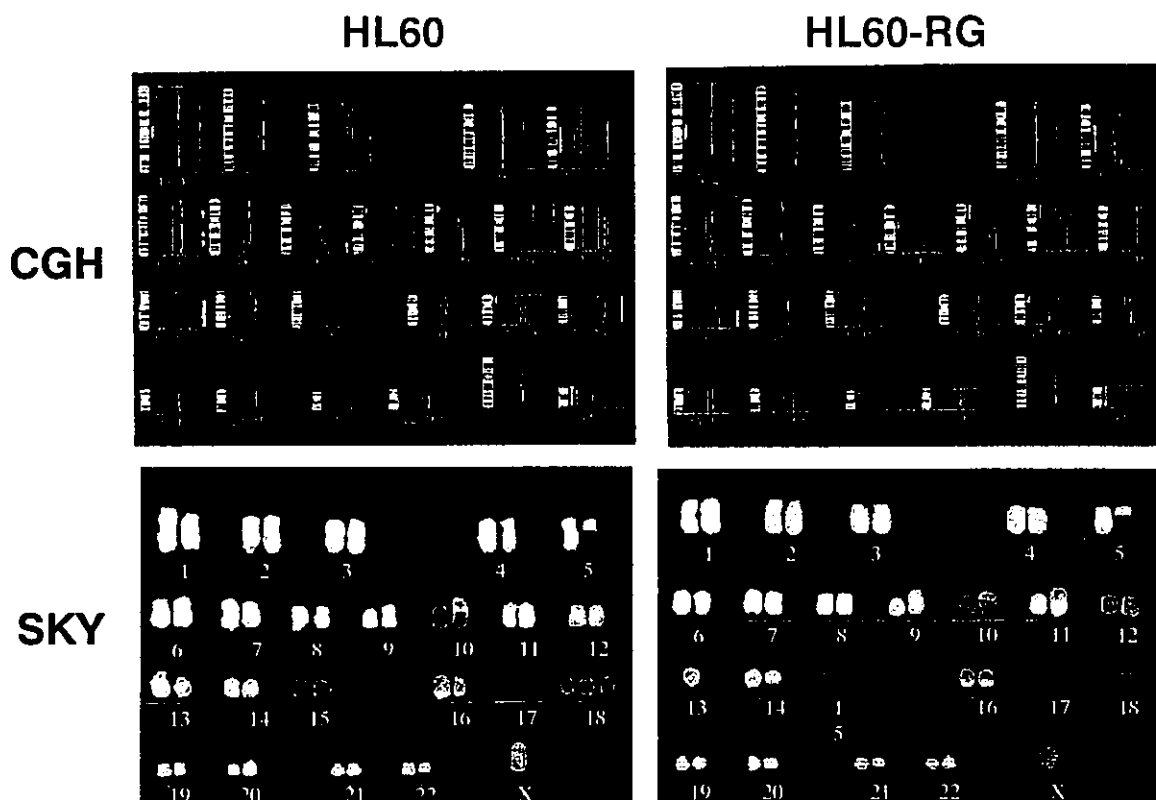
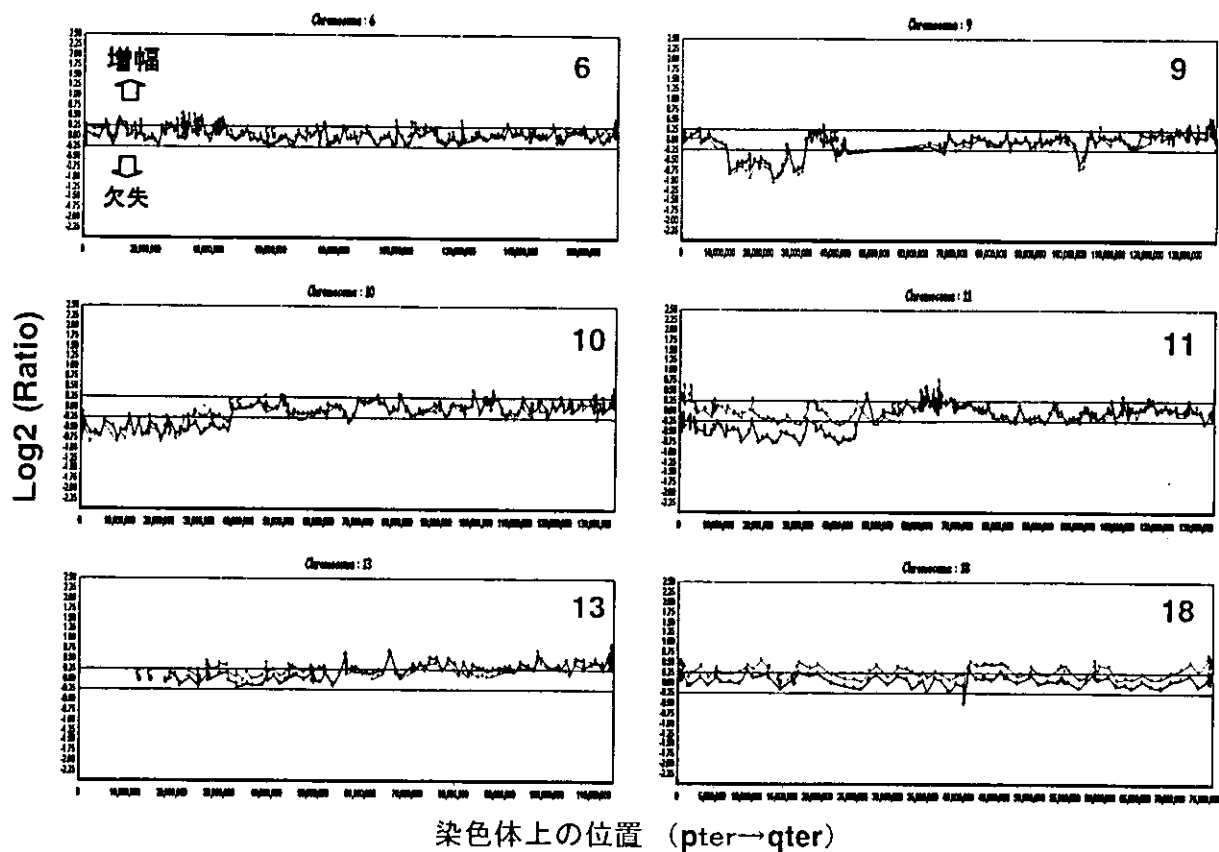


図20 HL60 と TK6 細胞の染色体ごとの詳細比較



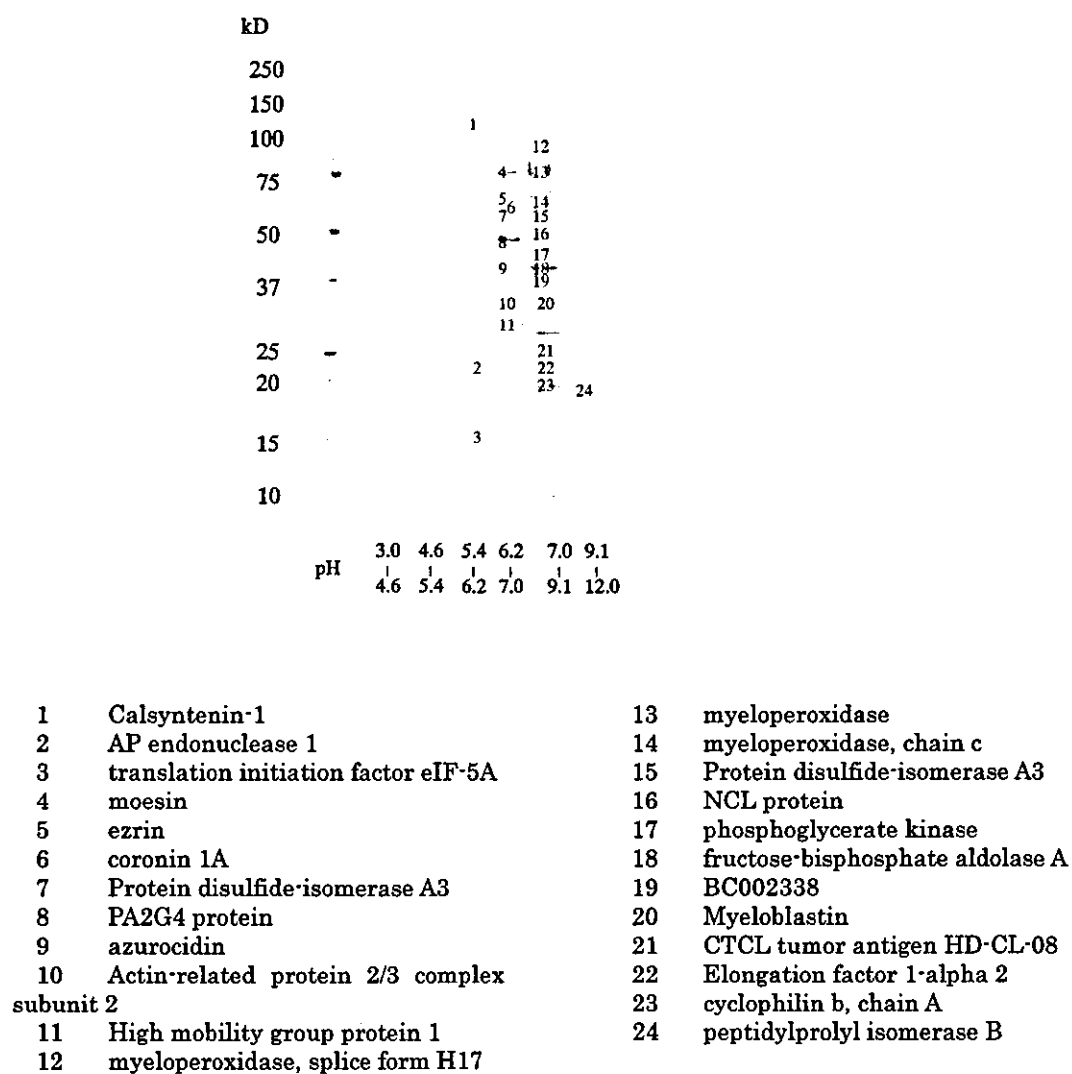


図 2 1. 無担体等電点電気泳動/SDS-PAGE による細胞由来タンパク質の分離と同定

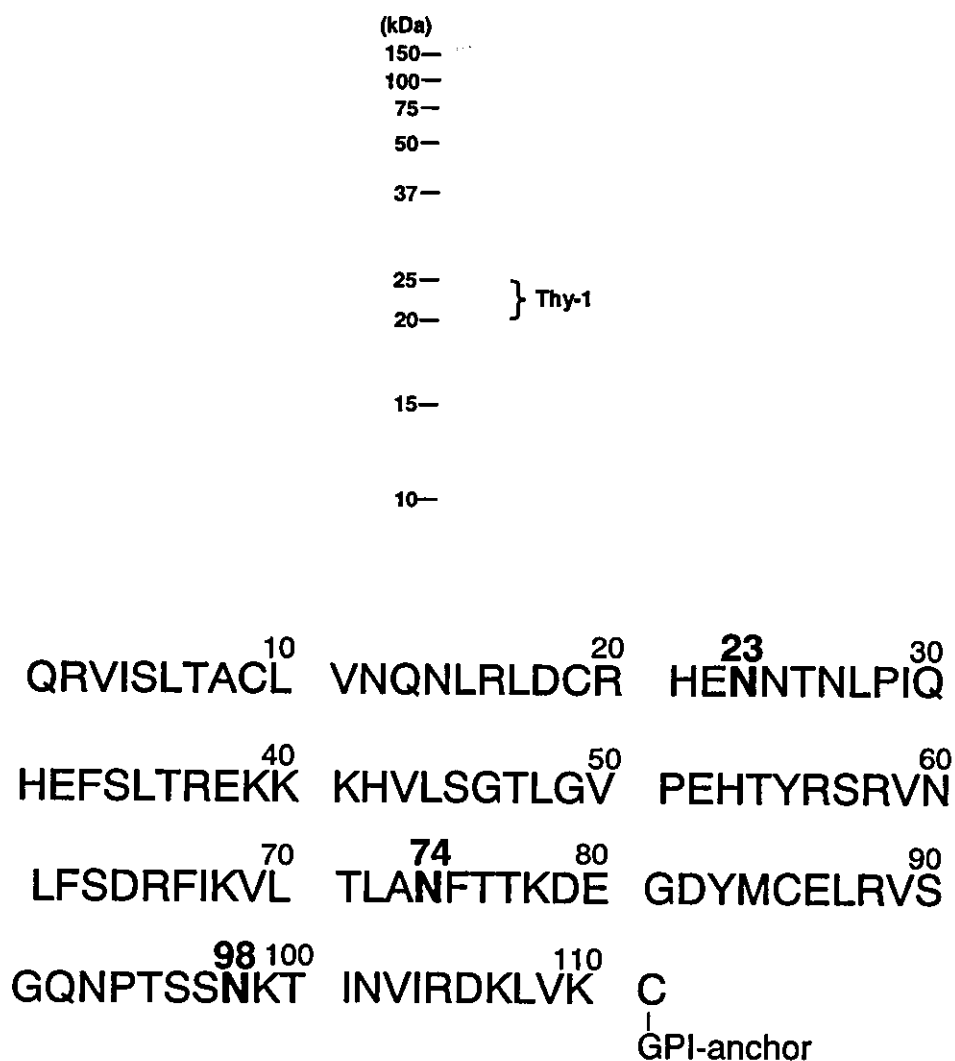


図22 ラット脳可溶性GPIアンカー型タンパク質のSDS-PAGE, 及びラットThy-1のアミノ酸配列(太字は, N-型糖鎖結合位置を示す)

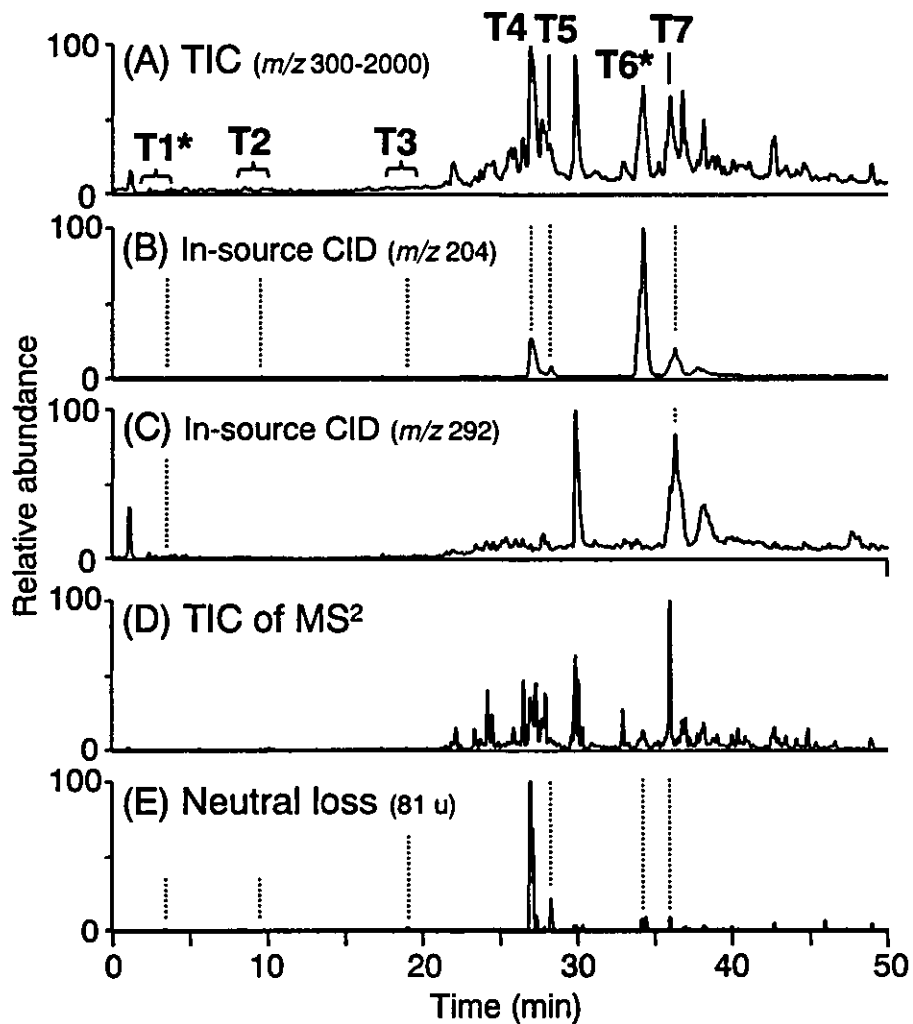


図23 トリプシン消化物のTIC (m/z 300-2,000)(A), in-source CIDによって生じた m/z 204(B), 及び m/z 292(C)イオンのマスクロマトグラム, MS²のTIC(D), MS²によって81 uのneutral lossが生じた結果生成したイオンのマスクロマトグラム(E)

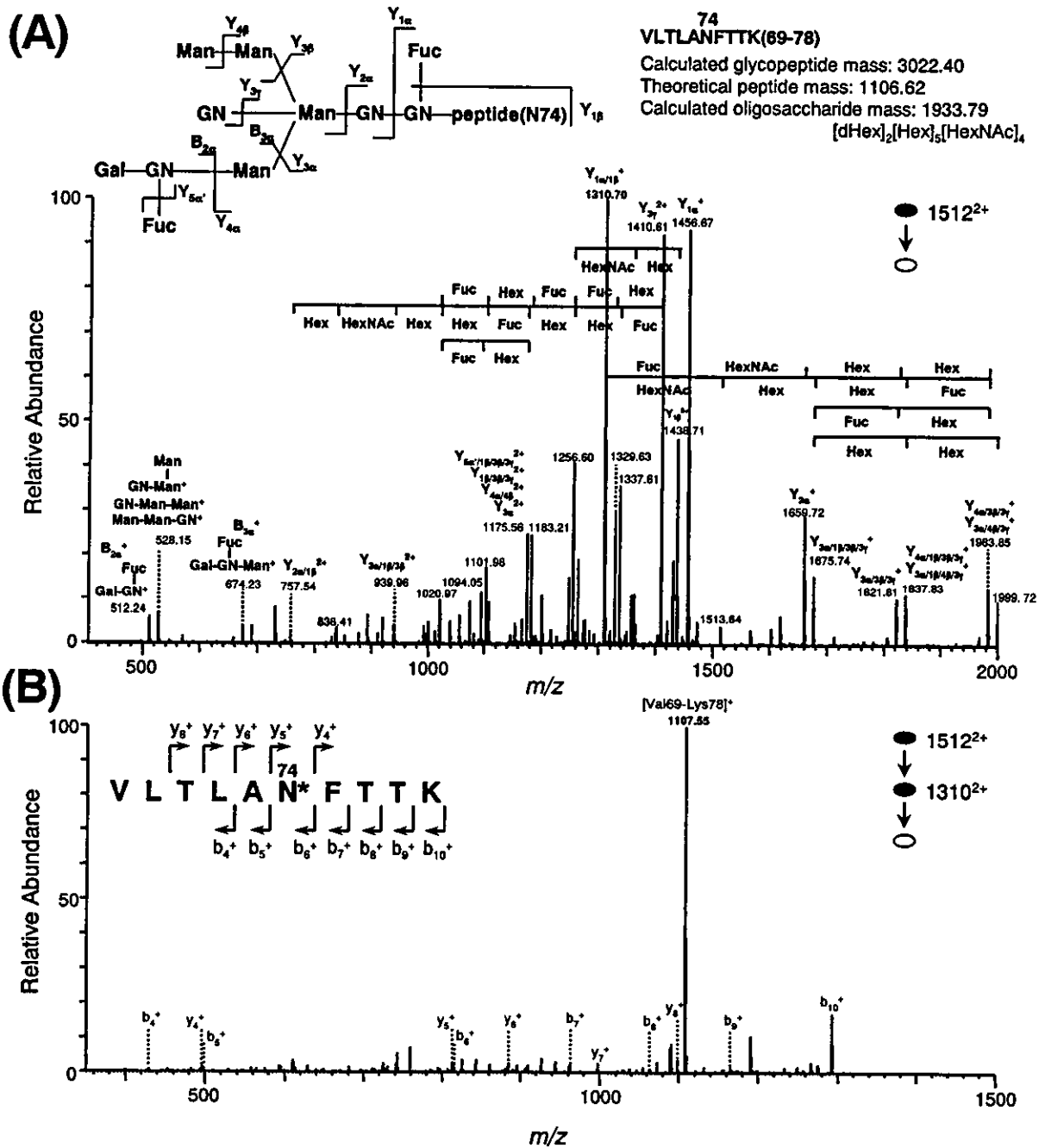


図24 (A)ピークT6中の糖ペプチド(m/z 1512.21²⁺)のプロダクトイオンスペクトル図中に、推定された結合糖鎖構造を示す。(B)MS³プロダクトイオンスペクトル (C)MS⁴プロダクトイオンスペクトル