

を引き起こし、その結果腫瘍形成が高まったと考えられる。TGF- $\beta_1$ は、Cx43のリン酸化型を減少させることによってGJICを阻害し、またCx43のリン酸化はギャップ結合集合などと関連しているため、TGF- $\beta_1$ がPLLA埋植BALB/cJマウスにおいて重要な役割を果たしている可能性が高いと考え、TGF- $\beta_1$ レベルについて検討したところ、TGF- $\beta_1$ の分泌レベルは、PLLAを埋植したBALB/cJマウスの皮下組織細胞では対照のBALB/cJマウス由来の細胞に比べて有意に増加した。さらに、*in vitro*の実験系で、PLLA埋植していないBALB/cJマウスの皮下組織細胞をTGF- $\beta_1$ 処理の影響について検討したところ、細胞間情報伝達とCx43 mRNA発現が有意に抑制されたことを示した。以上の結果からBALB/cJマウスの皮下にPLLAを埋植した後の早い段階で、TGF- $\beta_1$ の分泌レベルの増加に依存してギャップ結合タンパク質Cx43の発現が抑制された結果、GJICの機能が低下したと考えられた。

### 3. *in vitro*系での免疫隔離膜の機能に関する研究

TNF- $\alpha$ とIFN- $\gamma$ はTh1細胞が産生するサイトカインであり、細胞の免疫反応を伝達し、同種移植片に対する拒絶反応に関わることが示されている。これまでの研究から、TNF- $\alpha$ の血漿レベルは肝臓、心臓、腎臓での急性の拒絶反応時に上昇することが示されている。IFN- $\gamma$ の上昇もまた、肝臓移植時に起こることが報告されている。一方、Th2細胞が産生するサイトカインであるIL-4は動物モデルにおいて移植片生着を上昇させる役割を果たすことが示されている。Th2細胞が産生する別のサイトカインである

IL-13の産生量はそれぞれの状況によって様々であり、急性の肝臓の拒絶反応時にはIL-13の産生は低レベルであるという報告がある一方で、腎臓において同種移植片による拒絶反応が起こらない時と移植による拒絶反応時でその産生量に差がないことが示されている。これらのことから、同種移植片に対する拒絶反応とTh1細胞産生のサイトカインの免疫反応上昇、及び、同種移植片による移植の成功とTh2細胞産生のサイトカインの免疫反応上昇、との間には関連があると考えられた。本研究において、修飾ポリウレタンコーティングがドナー細胞の生存率を高めることを示した。また、修飾ポリウレタンコートしていないバッグを入れてあった培養液中のリンパ球細胞（レシピエントリンパ球）は、修飾ポリウレタンコートしたバッグを入れてあった培養液中の細胞よりもTNF- $\alpha$ とIFN- $\gamma$ の産生量の上昇傾向を見出しており、このことから、修飾ポリウレタンコートしていないバッグを入れてあった培養液中のレシピエントリンパ球とドナーBMLの間で高レベルの免疫反応が起こっていると考えられた。このことから、修飾ポリウレタンコートしたバッグがドナーとレシピエントのリンパ球間での免疫反応のいくつかの効果を抑える働きをしていると考えられた。CD4はヘルパーT細胞の表面に発現している分子であり、CD8はキラーT細胞の表面に発現している分子である。CD4とCD8はどちらも細胞同士が抗原情報のやり取りをするときに重要な働きをするといわれている。本研究の結果から、CD4陽性とCD8陽性のそれぞれのレシピエント細胞の数が、修飾ポリウレタンコートしたバッグでドナー細

胞を隔離した細胞の方が高い傾向が見られた。さらに、CD4 と CD8 の両者が同時に発現しているリンパ球細胞の数もまた、修飾ポリウレタンコートしていないバッグを入れてあった培養液中のレシピエントリンパ球に比べて、修飾ポリウレタンコートしたバッグを入れてあった培養液中のレシピエントリンパ球の方が高い傾向を見出した。以上のことから、修飾ポリウレタンコートによってドナーとレシピエントのリンパ球間の免疫反応を最小限に抑えていると考えられる。本研究の結果から、修飾ポリウレタンコートが移植時における拒絶反応を抑制するのに役立つ可能性を見出した。今後はさらに、修飾ポリウレタンコーティングが抗炎症性の治療力のある因子として、または、生体適合材料用のコーティング材料として利用できる可能性を見出していく必要があるであろう。

#### 4. ヒト軟骨細胞の分化に及ぼす液性因子等についての評価

自家移植の軟骨移植は、軟骨欠損の再生のために整形外科の治療において一般的に行われる処置である。新鮮な自家移植の軟骨の供給は限られているため、多くの研究者達は *in vitro* での軟骨組織の生産に力を入れている。いくつかの成長因子は軟骨細胞の代謝や分化を制御している。本研究において、FeSO<sub>4</sub> 単独や bFGF との組み合わせによって軟骨細胞の分化が有意に促進され、両者とも細胞増殖は control レベルを保っていた。細胞は高密度の微小集積培養 (3D の組織に見立てた) によって培養された。細胞播種 2 時間後 (細胞の定着の時期) には、細胞が凝集することを示した。また、顕微鏡観察により FeSO<sub>4</sub>、特に bFGF との

組み合わせによって、ECM 産物が control よりも多いことが示唆された。この現象は alcian blue を用いて生化学的にも確認された。また、FeSO<sub>4</sub> と bFGF との組み合わせによる効果は相乗効果ではなく相加効果であったと思われる。本研究において、FeSO<sub>4</sub> 単独や bFGF との組み合わせが *in vitro* における軟骨細胞分化を促進させることを見出したが、同様な効果が *in vivo* においても示されるかどうかは、今のところ明らかではない。細胞培養に対する bFGF の効果についてはまだまだ議論の余地がある。ヒトの軟骨細胞において bFGF がマトリックス合成に対して影響を与えないという報告もある。また、ヒトの鼻の中隔の軟骨においても bFGF が細胞増殖を上昇させることはなかったと報告されている。本研究において、bFGF は HAC の増殖をわずかに下げ、反対に分化をわずかに促進した。この結果は、bFGF が軟骨細胞の増殖を促進するというこれまでの報告とは異なる。しかし、本研究における分化の促進は、軟骨細胞欠損部への bFGF の投与により軟骨細胞の分化とマトリックス合成が促進したという最近の報告と一致している。細胞の増殖や分化に対する bFGF の一定しない効果は、違う臓器や組織由来の軟骨を用いて検討していることが一因かもしれない。これまでに、bFGF の効果として、ヒトの耳の軟骨細胞の増殖は上げるが、ヒトの鼻の中隔の軟骨細胞では増加が見られない、といった報告もある。また、同じウサギ由来の肋骨と耳の軟骨を用いた実験で、その細胞増殖への bFGF の効果が違うことも報告されている。bFGF の軟骨の増殖や分化に与える影響は、その添加量も関連している。低濃度の

bFGF (10ng/mL) は軟骨のマトリックス産生を促進するが、高濃度 (1000ng/mL) では阻害するという報告など、bFGF の添加濃度による違いが指摘されている。

FeSO<sub>4</sub> による細胞増殖と分化の影響の検討は本研究が初めてである。発達段階や大人の軟骨中のコンドロイチン硫酸の局在と FeSO<sub>4</sub> の軟骨細胞との関連に興味を抱き、本検討を行った。さらに、ヒトの膝関節の軟骨細胞に対しても FeSO<sub>4</sub> 処理によって同様の分化促進作用を見出している (data not shown)。ただし、細胞増殖については本研究結果とは逆に増加した。FeSO<sub>4</sub> による軟骨形成促進作用は、以下のように考えられる。硫酸イオン分子がアデノシン 5'-ホスホ硫酸 (APS) を形成するために ATP と相互作用し、さらに硫酸イオン分子が 3'-ホスホアデノシン 5'-ホスホ硫酸 (PAPS) の蓄積に相互作用する。PAPS は活性型の硫酸であり、コンドロイチン硫酸転移酵素が PAPS の硫酸基をコンドロイチン中の N-アセチルガラクトサミンへ転移しコンドロイチン硫酸を形成する。プロテオグリカン中には、コンドロイチン硫酸が多量に存在している。このため、FeSO<sub>4</sub> が APS や PAPS の蓄積のための硫酸の供給物となり、最終的にプロテオグリカンを形成するのではないかと推察した。本研究で用いた硫酸は硫酸第一鉄のみであるが、硫酸第一鉄の形の鉄は通常貧血の治療のために使用されており、すでにヒトが副作用なく大量の硫酸第一鉄を消費できることが明らかにされている。一方、金属製の生体適合材料から放出される銀、銅、水銀、ニッケルのようなイオンは、たとえ低濃度で使用しても有害な生物学的な影響を持つ。以上のように、

FeSO<sub>4</sub> の分化誘導反応と同時に生物学的な安全性から、ヒト軟骨細胞の組織工学における FeSO<sub>4</sub> の有効性を初めて明らかにした。

#### 5. マウス幹細胞の神経分化とテロメラーゼ活性との関係についての評価

神経幹細胞は、未分化状態を維持したまま、無限に増殖できるという自己複製能を有している。さらに、神経幹細胞は、中枢神経系を構成する 3 種類の細胞 (ニューロン、アストロサイト、オリゴデンドロサイト) へと分化することも出来るため、今後の中枢神経系の再生医療への応用において、大きな可能性を秘めていると考えられている。しかしながら、神経幹細胞を大量に、かつ均一な未分化集団として調製することは必ずしも容易ではなく、神経幹細胞の詳細な分化系譜についてはほとんど明らかにされていない。従って、現在、神経幹細胞の増幅や分化を維持する因子の同定、ならびにその制御メカニズムを解明することが非常に重要な研究課題となっている。本研究では、マウス神経幹細胞 (SFME 細胞) の分化系譜におけるテロメラーゼ活性の制御機構について解析を行った。一般に、未分化幹細胞、生殖細胞及び癌細胞のように無限増殖能を有している細胞では、顕著なテロメラーゼの活性化が認められる。そこで、未分化状態の SFME 細胞におけるテロメラーゼの活性化レベルを TRAP アッセイにより測定したところ、高度のテロメラーゼ活性が検出された。この結果は、SFME 細胞には無限増殖能が潜在的に備わっていることを示唆している。実際に、SFME 細胞は無血清培養下では、老化あるいはクライシス (細胞死滅) を抑えることなく、未分化状態を維持したまま長期にわたって継

代培養を行うことが出来ることが確認されている。すなわち、この SFME 細胞における無限寿命性はテロメラーゼの活性化によって保護されているものと考えられる。また、本実験から、TGF- $\beta$ 刺激によって SFME 細胞がアストロサイトへと分化することも示された。また、これまでも SFME 細胞は、血清の添加によりアストロサイトへ分化することも報告されている。以上のことにより、SFME 細胞は、神経幹細胞の分化制御機構を解明する上で、汎用性の高いモデル細胞となることが期待される。

神経幹細胞はさまざまな因子に応答して、前駆細胞を経てニューロン、アストロサイト、オリゴデンドロサイトへと分化する。また、この神経前駆細胞の分化誘導時には、テロメラーゼ活性が減退するということも確認されている。これらの報告と一致して、TGF- $\beta$ によりアストロサイトへと分化した SFME 細胞においても、テロメラーゼ活性の著しい抑制が示された。即ち、神経幹細胞の分化に伴ったテロメラーゼ活性の低下は、その細胞に分化とともに有限寿命が付与されたことを意味しており、やがては細胞老化を迎えるものと推測される。一般に、アストロサイトは種々のサイトカイン (IL-1 $\beta$ , IL-6 など) を分泌し、神経細胞を保護していると考えられている。従って、アストロサイトの分裂加齢に伴った機能変化は、非分裂細胞である神経細胞の生存維持にも異常をきたし、脳の老化進行に影響を与えるものと考えられる。今後、神経細胞の老化メカニズムを研究する上でも、アストロサイトの有限寿命化に関する分子機構解明が必要になると考えられる。また、同時に、*mTERT* の発現も TGF- $\beta$ により抑

制されることが示された。さらにこのアストロサイトへの分化に伴う *mTERT* の発現抑制は、主に転写レベルで制御されていることもプロモーターアッセイの結果により判明した。以上の結果より、TGF- $\beta$ によるテロメラーゼ活性の抑制は、*mTERT* の発現抑制と相関していることが示唆された。最近、Armstrong らは、分化に伴った *mTERT* の発現抑制には *c-myc* の発現低下が関与しているかもしれないと報告している。しかしながら、*mTERT* の転写抑制への *c-Myc* の直接的関与については未だ証明されていない。本実験からも、アストロサイトへ分化した SFME 細胞における *c-myc* の発現量は、著しく低下していたことが確認された。さらに、*mTERT* プロモーター領域内には、2 つの *c-Myc* 結合部位 (E-box) が存在していることも確認された。それ故に、SFME 細胞の分化に伴った *c-myc* の発現低下が誘因となって *mTERT* の転写が抑制されたのではないかと推測される。しかしながら、この点に関しては確証を得るまでには至っておらず、今後、神経幹細胞の分化に伴う *mTERT* 転写抑制と *c-Myc* との相関についてさらなる解析が必要になると考えられる。

以上の結果より、TGF- $\beta$  はヒト肺がん細胞株 (A549細胞) のみならず神経幹細胞 (SFME 細胞) においても、テロメラーゼ活性ならびにテロメラーゼ触媒サブユニット遺伝子の発現を抑制することが明らかとなった。即ち、TGF- $\beta$  のシグナル伝達系は、テロメラーゼ活性を特異的に抑制し、その細胞へ有限寿命を付与させるのではないかと推察される。しかしながら、神経幹細胞の分化に伴ったテロメラーゼ活性の抑制機

構については、単にその現象を捉えただけに過ぎず、さらなる解析が必要になると考えられる。今後、この分野における研究がさらに進展すれば、神経幹細胞の増殖、分化を維持している因子の同定ならびにその機構解明へ向けて大きく貢献できると期待される。

## 6. 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

本研究では、細胞組織医療機器の材料として期待されるヒト間葉系幹細胞 (hMSC) についてその有効性、安全性及び品質評価に関する検討を *in vitro* の系で行った。同時にやはり細胞組織医療機器の材料として現在すでに臨床の場で用いられている PLLA が幹細胞に及ぼす影響についても検討した。

幹細胞は無限増殖能を持つと言われているが、実際、hMSC は継代が進むにつれてその増殖能が低下することが確認された (図 21)。この様な細胞の増殖能の変化が細胞の癌関連遺伝子の発現に及ぼす影響について DNA チップを用いて検討した (表 5)。その結果、細胞の増殖能低下に伴い *c-myc oncogene* の発現は低下するものの、*oncogenes and tumor suppressors genes* は全体的に上昇しており、シグナル伝達系で重要な働きを持ち発癌にも関わると考えられている *Wnt-8B* 及びそのレセプターである *frizzled homolog 9* の上昇や DNA ミスマッチ修復遺伝子である *mutS homolog 2* の上昇などが見られた。以上のことから、幹細胞の増殖能は徐々に低下していくため無限増殖を続ける癌細胞とは異なる特性を持つと思われる一方で癌化の危険性が高まる可能性も否定できないことが

わかった。

一方、hMSC の癌関連遺伝子の発現に及ぼす PLLA の影響について検討したところ、*oncogenes and tumor suppressors* 遺伝子は全体的に低下したものの、*frizzled homolog 9* の上昇などは観察され、PLLA によって hMSC の遺伝子発現に様々な変化が起こることがわかった。

hMSC の継代数の違いによる遺伝子発現の変化について検討した DNA チップ解析の結果 (図 21) から、*c-myc oncogene* 及び *Wnt-8B* についてさらに詳細に調べるために、hMSC の継代数を 4 点 (#1,3,5,10) 取り、それぞれの mRNA 発現量について Real time RT-PCR による定量的解析を行った。同時に癌細胞 (HeLa S3 と HepG2) と比較検討した。また、幹細胞と癌細胞の増殖に関わるとされているタンパク質 *nucleostemin* の mRNA 発現量についても検討した。その結果、*c-myc oncogene*、*nucleostemin*、*Wnt-8B* とともに幹細胞では癌細胞 (HeLa S3, HepG2) に比べてかなり発現が低かった (図 22, 24, 26)。*c-myc oncogene*、*nucleostemin* については、継代数の増加に伴う発現レベルの低下が認められた (図 23, 25)。以上のことから、増殖能の低下に伴う遺伝子発現の変化は、癌化の可能性の上昇と直結するものではないが、上記の遺伝子の発現を確認することによって、幹細胞の有効性・安全性・品質を評価できる一つの指標となりうるかもしれない。

## 7. 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—ヌードマウス移植

ポリラクチドは、広く臨床の場で用いられている生体吸収性のポリエステルである。PLLA はゆっくりと分解していくため、骨

折時に使用するプレート、釘、ネジといった整形外科用の医療用具用の生体適合材料に適用されている。ラットにおいて PEU、PE、PLLA によって腫瘍を形成したといういくつかの報告がある。本研究において、PLLA プレート埋植することによって BALB/cJ マウスではクロスを形成し接触阻害を抑制するといった細胞の形態に違いが出ることを明らかにした (図 27-B)。その原因を確かめるために、GJIC 機能への影響について着目した。本研究では (PLLA プレート埋植後 10 ヶ月の細胞を用いた) これまでの著者らの研究結果と同様に PLLA 埋植によって GJIC 機能もまた有意に阻害される事がわかった (図 28)。ギャップジャンクションは Cx 分子の C 末端領域の翻訳後のリン酸化によって制御されており、Cx 分子のリン酸化は GJIC の阻害と密接に関わっている。そのため、ギャップジャンクションは PLLA 誘導性腫瘍形成において主な役割を果たしているようである。Cx43 のタンパク質と mRNA の発現について検討を行ったところ、Cx43 のタンパク質発現は PLLA を埋植した BALB/cJ マウス由来の細胞では対照の BALB/cJ マウス由来の細胞に比べて抑制された (図 29)。Cx43 の mRNA 発現もまた、PLLA を埋植した BALB/cJ マウス由来の細胞では対照の BALB/cJ マウス由来の細胞に比べて抑制された (図 30)。Cx43 のアンチセンス RNA によって Cx43 のタンパク質発現を低下させると腫瘍形成能が増したとの報告がある。遺伝子の変化や Cx43 のタンパク質の翻訳後の変化によって GJIC の機能低下と腫瘍形成が関連するかもしれない。そのため、PLLA による GJIC 阻害効果が Cx43 タン

パク質の変化を誘導し、腫瘍形成能を高めるのかもしれない。TGF- $\beta$ 1 はリン酸化型 Cx43 を減少することによって GJIC 機能を弱め、また ECM の発現を上昇させる。本研究では、4 種類の細胞における TGF- $\beta$ 1 の産生量を検討した。その結果、TGF- $\beta$ 1 分泌量は PLLA を埋植した BALB/cJ マウス由来の細胞では対照の BALB/cJ マウス由来の細胞に比べて有意に上昇した。しかし、SJL/J マウスでは PLLA 埋植によって TGF- $\beta$ 1 分泌量は逆に減少した (図 31)。さらに、これら 4 種類の細胞 (埋植後 1 ヶ月と 10 ヶ月に採取したもの) についてのジーンチップ解析において、主な ECM タンパク質 (ファイブネクチン、プロコラーゲン VIII  $\alpha$ 1 サブユニット、OPN)、IGFBP3、CRIP は PLLA を埋植した BALB/cJ マウス由来の細胞では上昇することを見出した (図 32)。これらのタンパク質は直接腫瘍形成を引き起こすという報告もある。

BALB/cJ マウスにおいて、PLLA プレートを埋植 10 ヶ月後に埋植部位に増殖した組織が形成された。この増殖した組織が腫瘍なのかそれとも体内異物 (PLLA) による炎症反応の結果形成されたものなのかを確かめるために、著者らはヌードマウスを用いて腫瘍形成試験を行った。PLLA を埋植した BALB/cJ マウス由来の細胞を注入したヌードマウスにおいて大きくて急速な腫瘍増殖が観察された (図 33)。組織病理学的評価によってこの腫瘍は monophasic fibrous synovial sarcoma であることがわかった (図 34)。しかしながら、これらの腫瘍細胞は軟寒天培養法ではコロニー形成は認められなかったが、これはテロメラゼ活性が低いからかもしれない。

以上のことから、PLLA は TGF- $\beta$ 1 の分泌を上昇させ、GJIC の阻害、ECM タンパク質と IGFBP の発現の上昇を引き起こし、腫瘍を形成することが示唆された。さらに、PLLA は CRIP と OPN の発現も上昇させた。最終的にこれら全ての因子が腫瘍形成を亢進させるのであろう。(図 38)

#### 8. ヒト骨芽細胞の骨分化における年齢の違いについて

加齢に伴う骨形成能の低下のメカニズムについては、未だ明らかとなっていない。この骨形成能の低下に関わる分子や遺伝子を解析することは、骨再生能の低い患者に効果のある医薬品、生体材料の開発にとって重要である。そこで本研究では、年齢の異なるヒト骨芽細胞の分化機能発現について微小集積培養法を用いて検討した。

骨芽細胞の増殖能について検討したところ、増殖における年齢の差は認められなかった。初期分化マーカーである ALPase 活性を評価したところ、1D は活性が高く、16Y、41Y は活性が低く、年齢の差が顕著に認められた。マウス由来骨芽細胞 MC3T3-E1 は継代数が増えると、ALPase 活性や最終分化マーカーのオステオカルシンの発現が低下することが報告されている。また、ラット骨芽細胞においても、juvenile (若年) の石灰化能は adult (成体) の 40 倍程度高いことが報告されている。本実験結果でも、ヒト骨芽細胞は年齢が高くなると、骨分化能が低下することが示唆された。これより、ラット、マウス、ヒトの骨芽細胞は種に関係なく、年齢が上がると骨形成能は低下することが明らかとなった。以上のことから、ヒト骨芽細胞の石灰化は初期分化マーカーの ALPase 活性が大きく関与していると考え

えられる。

#### E. 結論

##### 1. 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

コラーゲンスポンジにより作製した *in vitro* バイオヒト皮膚モデルを用いて  $10^0 \sim 5$  個の HIV 感染細胞汚染時の細胞動態の観察及び HIV-1 検出を行うことができた。RT-PCR 法では、HIV は 10 個の OM10.1 接種後 3 日目から検出され、P24 抗原検出法の千倍の感度を示した。さらに一個から数個の OM10.1 接種で 6 日目に HIV を検出できた。以上の結果より、*in vitro* バイオヒト皮膚モデルによる実験方法は組織工學品のウイルス検出検査に応用可能であろうと考えられた。

##### 2. 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—埋植 1 ヶ月短期予測

BALB/cJ マウスの皮下に PLLA を埋植した後の早い段階で、TGF- $\beta$ 1 の分泌レベルの増加に依存してギャップ結合タンパク質 Cx43 の発現が抑制された結果、GJIC の機能が低下した。それと同時に Cx43 mRNA の発現が腫瘍形成し易い BALB/cJ マウスでは抑制されたのに対し、腫瘍形成しにくい SJL/J マウスでは抑制されないことを見出した。*in vitro* の BALB/cJ マウス細胞において TGF- $\beta$ 1 もまた Cx43 mRNA の発現及び GJIC 機能を抑制することも判明した。以上の結果は、PLLA による腫瘍形成の新しいメカニズムを示すであろう (Fig.2-6)。この様に、発癌に対する感受性の違う 2 つのマウスの系統間での PLLA 埋植による作用の違いを初めて明らかにした。

##### 3. *in vitro* 系での免疫隔離膜の機能に関する

## る研究

同種間の臓器や組織移植後の免疫反応の軽減に対するポリウレタンコーティングの有効性についてラットのリンパ球を用いた *in vitro* の系で検討した。その結果、ポリウレタンコーティングがドナー細胞の生存率を高めることを示した。また、レシピエントリンパ球の TNF- $\alpha$  と IFN- $\gamma$  の産生量が免疫隔離膜のポリウレタンコートにより減少傾向を見出した。さらに、CD4 陽性と CD8 陽性のレシピエントリンパ球細胞の数もまた、ポリウレタンコートによって上昇する傾向を見出した。以上のことから、ポリウレタンコートによってドナーとレシピエントのリンパ球間の免疫反応を最小限に抑えていると考えられ、ポリウレタンコートが移植時における拒絶反応を抑制するのに役立つ可能性を見出した。

### 4. ヒト軟骨細胞の分化に及ぼす液性因子等についての評価

ヒト軟骨の培養において FeSO<sub>4</sub> が軟骨形成を促進させる可能性を見出した。その分化誘導反応と同時に生物学的な安全性から、ヒト軟骨細胞の組織工学における FeSO<sub>4</sub> の有効性を初めて明らかにした。今後は *in vivo* における FeSO<sub>4</sub> の時間依存的、濃度依存的な効果についても検討していく必要があるであろう。また、初代の未分化細胞への影響や、他の分子との相互作用なども検討すべきであろう。

### 5. マウス幹細胞の神経分化とテロメラーゼ活性との関係についての評価

TGF- $\beta$  は SFME 細胞のアストロサイトへの分化誘導を促す共に、SFME 細胞のもつテロメラーゼ活性をも低下させることが判明した。すなわち、無限増殖性の SFME 細

胞に有限寿命が付与されたことを示唆している。さらに TGF- $\beta$  によるテロメラーゼの活性抑制は、*mTERT* の発現低下に伴って誘導された現象であることが示唆された。また、テロメラーゼの活性化に重要とされている *c-myc* の発現も、TGF- $\beta$  処理によって低下していたことが示され、テロメラーゼ活性の減退は、*c-myc* の発現低下に依存して誘導された現象であると推定された。また、*mTERT* プロモーター領域内には *c-Myc* の結合部位 (E-box) が 2 つ存在していたことも判明した。TGF- $\beta$  による *mTERT* の発現抑制は、*c-myc* の発現低下に起因した *mTERT* 転写抑制機構によって誘導された現象であるものと考えられる。以上の結果より、TGF- $\beta$  による *mTERT* の発現抑制は、主に転写レベルで誘導されていること、さらにはこの転写抑制には、少なくとも *c-myc* の発現低下が関与していることが示唆された。

### 6. 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

幹細胞の安全性の評価を目的として、正常ヒト間葉系幹細胞 (hMSC) の継代数の違いや硬組織用材料であるポリ-L-乳酸 (PLLA) との相互作用による hMSC の遺伝子発現の変化について DNA チップを用いて検討した。また、細胞増殖や発癌に関わる遺伝子の発現についても幹細胞と癌細胞とを比較検討した。DNA チップの解析結果より、細胞の増殖能低下に伴い *c-myc* の発現は低下するものの、癌遺伝子及び癌抑制遺伝子は全体的に上昇しており、Wnt-8B 及びそのレセプターである frizzled homolog 9 の上昇や DNA ミスマッチ修復遺伝子である mutS homolog 2 の



上昇などが見られた。一方、PLLA の影響については、*oncogenes and tumor suppressors* 遺伝子は全体的に低下したものの、*frizzled homolog 9* の上昇などが観察された。*c-myc*、*Wnt-8B*、*nucleostemin* については、どの遺伝子についても癌細胞 (HeLa S3, HepG2) では幹細胞に比べてかなり高い発現を示した。*c-myc*、*nucleostemin* については、継代数の増加に伴う発現レベルの低下が認められた。

#### 7. 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—ヌードマウス移植

2 つの系統のマウス (腫瘍形成し易い BALB/cJ マウスと腫瘍形成しにくい SJL/J マウス) を用いて、それぞれ皮下に PLLA プレートを埋植し、その 1 ヶ月及び 10 ヶ月後に埋植部位の皮下組織を採取し評価した。BALB/cJ マウスでは、PLLA を埋植していない対照に比べて埋植したマウスのギャップジャンクション依存性細胞間情報伝達 (GJIC) と Cx43 タンパク質の発現は有意に低下したのに対し、*transforming growth factor-beta 1* (*TGF- $\beta$ <sub>1</sub>*) 分泌及び細胞外マトリックス (ECM)、*insulin-like growth factor binding protein* (*IGFBP*) 3、*cystein-rich intestinal protein* (*CRIP*) は有意に上昇した。さらに、PLLA は *CRIP* と *OPN* の発現も上昇させた。また PLLA を埋植した BALB/cJ マウス由来の細胞を注入したヌードマウスにおいて腫瘍が形成された。組織病理学的評価によってこの腫瘍は *monophasic fibrous synovial sarcoma* であることがわかった。

Okabe(2004)らが報告しているテロメア結合タンパク *TRF1* の癌化指標としての可能性についても検討した。ヒトおよび動物

由来の正常および癌化した細胞について比較検討した結果、かれらとは、逆の結果を得た。従って、癌細胞間で *TRF1* の発現レベルは、異なり、癌化指標とはなりえないことを明らかにした。(data not shown)

#### 8. ヒト骨芽細胞の骨分化における年齢の違いについて

本研究では、採取年齢の異なるヒト骨芽細胞を用いて、骨芽細胞の分化機能発現について検討を行った。骨芽細胞は年齢が上がるほど骨分化能の低下が認められた。従って、細胞組織医療用具の有効性・安全性を評価するためには、高年齢の対象患者の治癒・組織再生過程を評価可能な動物モデルでの前臨床試験の実施や、高年齢でも治癒組織再生を可能にするに細胞・組織医療機器の開発が必要である。

#### F. 研究発表

##### 1. 論文発表

1. 長幡 操、寺本 彰、阿部康次、中岡竜介、土屋利江、ラット頭蓋冠由来骨芽細胞の *ALPase* 活性を促進する硫酸化ヒアルロン酸の効果 繊維学会誌、印刷中
2. Nagahata M, Nakaoka R, Teramoto A, Abe K, Tsuchiya T, The response of normal human osteoblasts to anionic polysaccharide polyelectrolyte complexes. *Biomaterials*, accepted.
3. Nakaoka R, Ahmed S, Tsuchiya T, Hydroxy apatite microspheres enhance gap junctional intercellular communication of human osteoblasts composed of connexin 43 and 45. *J. Biomed. Mater. Res. A*, accepted.
4. Saifuddin Ahmed, 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. *Animal Cell Technology* accepted.
5. Rumi Sawada, Tomomi Ito, Yoshie Matsuda, and Toshie Tsuchiya, Safety evaluation of tissue engineered medical devices using normal human mesenchymal stem cells. *Animal Cell Technology* accepted.
6. Nasreen Banu, Toshie Tsuchiya, Saifuddin Ahmed, and Rumi Sawada, Studies on the efficacy, safety and quality of the tissue engineered products: Effects of a catalyst used in the synthesis of biodegradable polymer on the chondrogenesis of human articular cartilage. *Animal Cell Technology* accepted.
7. Yuping Li, Tsutomu Nagira and Toshie Tsuchiya, Increase of the insulin secretion in hit-t15 cells: Gap Junctional Intercellular communications Enhanced by Hyaluronic Acid. *Animal Cell Technology* accepted.
8. Nasreen Banu and Toshie Tsuchiya, Markedly different action of the Hyaluronic acids and Chondroitin sulfate-A on the differentiation of human articular chondrocytes between micromass and 3-D honeycomb rotation cultures. *Biomaterials*, Submitted
9. Tsutomu Nagira, Susan Matthew, Yoko Yamakoshi and Toshie Tsuchiya, A Remarkable Enhancement of Gap junctional Intracellular Communication of Normal Human Dermal Fibroblasts Cultured on Polystyrene Dishes Grafted with Poly-N-isopropylacrylamide (PIPAAm). *Tissue Engineering*, Submitted
10. Nasreen Banu, Yasmin Banu, Toshie Tsuchiya, Studies on the development of evaluation method and the biocompatibility of functional biomaterials. *J. Artificial Organs*, Submitted
11. Toshie Tsuchiya A useful marker for evaluating the safety and efficacy of tissue engineered products. *ASTM, STP1452, 254-261, 2004.*
12. Misao Nagahata, Toshie Tsuchiya et. al, A novel function of N-cadherin and Connexin43 :Marked enhancement of alkaline phosphatase activity in rat calvarial osteoblast exposed with sulfated hyaluronan, *Biochem. Biophys. Res. Commun* , 315(3), 603-611, 2004
13. 土屋利江, 第 7 章 再生医療とその周辺 再生医療をとりまく規制とその現状・今後, 立石 哲也, 田中 順三, 図解 再生医療工学, 工業調査会, 296-303, 2004.
14. 柳楽 勤, 土屋利江, メカニカルストレスに対する細胞応答の分子機構, 大森豊明, 生体物理刺激と生体反応, フジテクノシステム, 667-677, 2004
15. 土屋利江, バイオマテリアルの安全性を考える, バイオマテリアル・生体材料-, 22-2, 69-70, 2004
16. 土屋利江, バイオマテリアルの許認可と留

- 意点、バイオマテリアル-生体材料-, 22-4, 258-264, 2004
17. Haishima Y, Matsuda R, Hayashi Y, Hasegawa C, Yagami T, Tsuchiya T, Risk assessment of di(2-ethylhexyl)phthalate released from PVC blood circuits during hemodialysis and pump-oxygenation therapy. *International Journal of Pharmaceutics*, 274, 119-129, 2004
18. Saifuddin Ahmed, Toshie Tsuchiya, Novel mechanism of tumorigenesis: Increased transforming growth factor-beta 1 suppresses the expression of connexin 43 in BALB/cJ mice after implantation of poly-L-lactic acid. *J Biomed Mater Res*, 70, 335-340, 2004
19. Takeshi Yagami, Yuji Haishima, Toshie Tsuchiya, Akiko Tomitaka-Yagami, Hisao Kano, Kayoko Matsunaga, Proteomic Analysis of Putative Latex Allergens. *Allergy and Immunology*, 135, 3-11, 2004
20. 土屋利江、バイオマテリアルの安全性について組織工学用材料を中心として、*日本再生歯科医学会誌*, 2, 1-8, 2004
21. 土屋利江、ティッシュエンジニアリング用マテリアルの製品化条件と国際標準化、*再生医療*, 3巻, 5月号, 71-75, 2004
22. Eiji Okada, Yuka Komazawa, Masaki Kirihara, Hideshi Inoue, Naoki Miyato, haruhiro Okuda, Toshie Tsuchiya, Yoko Ymamakoshi, Synthesis of C60 derivatives for photoaffinity labeling, *Tetrahedron Letters*, 45, 527-529, 2004
23. Tsuchiya T, Sakai M, Ikeda H, Mashino T, Banu Y, Biocompatible biomaterials for the human chondrocyte differentiation estimated by RT-PCR method, *Animal cell technology*, 13, 475-479, 2004
24. Saifuddin Ahmed and Toshie Tsuchiya, Different expression on Gap junctional protein connexin43 in two strains of mice after one-month Implantation of Poly-L-Lactic acid, *Animal cell technology*, 13, 481-485, 2004
25. Rahman MS, Banu Y, Matsuoka A, Ichikawa A, Sakai M, Ikeda H, Tsuchiya T, Evaluation of the immuno-protective effects of the new-type of bags using ELISA and FACS-analysis, *Animal cell technology*, 13, 277-280, 2004
26. 土屋利江, 細胞組織医療機器等の製品化のためのガイドライン・環境整備について *高分子*, 53巻, 3月号, 144-146, 2004
27. 土屋利江, 細胞組織医療機器等の品質・安全性確保について, *再生医療*, 3巻, 2月号, 107-110, 2004
28. Atsuko Matsuoka, Toshie Tsuchiya, Gene expression changes in Balb/3T3 transformants induced by poly(L-lactic acid) or polyurethane film, *J. Biomed. Mater. Res*, 68A, 376-382, 2004
29. 土屋利江「医療材料・医療機器の安全性と生体適合性」を編集 (2003. 11)
30. 土屋利江 細胞組織医療機器等の製品化のためのガイドライン・環境整備について、*高分子*, 53巻, 3月号 (2004) 144-146
31. 土屋利江 細胞組織医療機器等の品質・安全性確保について、*再生医療* 3巻, 2月号 (2004) 107-110
32. 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).
33. 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).
34. Ahmed S and T Tsuchiya, Different expression on Gap junctional protein connexin43 in two strains of mice after one-month Implantation of Poly-L-Lactic acid. *Animal cell technology*, accepted.
35. Jeong Ung Park and Toshie Tsuchiya, Evaluation of the cornea cells affected by multi-purpose solutions for contact-lens. *Animal cell technology*, accepted.
36. Rahman MS, Bunu Y, Matsuoka A, Ichikawa A, Sakai M, Ikeda H, Tsuchiya T, Evaluation of the immuno-protective effects of the new-type of bags using elisa and facs-analysis. *Animal cell technology*, accepted
37. Tsuchiya T, Sakai M, Ikeda H, Mashino T, Banu Y, Biocompatible biomaterials for the human chondrocyte differentiation estimated by RT-PCR method. *Animal cell technology*, in press
38. Tsuchiya T, Ikarashi Y, Uchima T, Doi H, Nakamura A, Ohshima Y, Fujimaki M, Toyoda K, Kobayashi E, Yoneyama T, and Hamanaka H, A method to monitor corrosion of chromium iron alloys by monitoring the chromium ion concentration in urine. *Mater Trans.* in press.
39. 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 Yang J, Ichikawa A, tsuchiya T, A novel function of connexin32: marked enhancement of liver function in a hepatoma cell line. *BBRC*, 2003, 307, 80-85
40. Nakamura A, Kanazawa Y, Sato H, Tsuchiya T, Ikarashi Y, W H.D Jong, K E. Andersen, B B. Knusen, Ebaluation of Allergic Potential of Rubber Products: Comparison of Sample Preparation Methods for the Testing of Polymeric Medical Devices. *J Toxicology*, 2003, 22, 169-185
41. Nakaoka R, Tsuchiya T, Nakamura A, Neural differentiation of midbrain cells on various protein-immobilized polyethylene films. *J Biomed Mater Res*, 2003, 64A, 439-446
42. Nakagawa Y, Murai T, Hasegawa C, Hirata M, Tsuchiya t, Yagami T, Haishima Y, Endotoxin Contamination in Wound Dressings Made of Natural Biomaterials. *J.*

Biomedical Materials Research Applied Biomaterials, 2003, 66B, 347-355

43. Isama K, T Toshie, Enhancing effect of poly(L-lactide) on the differentiation of mouse osteoblast-like MC3T3-E1 cells. Biomaterials, 2003, 24, 3303-3309

44. Taizo Sumide and Toshie Tsuchiya, Effect of multi-purpose solutions (MPS) for hydrogel contact lenses on gap-junctional intercellular communication (GJIC) in rabbit corneal keratocytes. J. Biomedical Materials Research Applied Biomaterials, 2003, 64B, 57-64

## 2. 学会発表

1. 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 (March, 2005)

2. 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)

3. 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)

4. 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)

5. 中岡竜介、Susan Hsiong、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)

6. 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)

7. 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)

8. 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)

9. 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)

10. 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).

11. 土屋利江: 「ISO TC194 医療機器の生物学的評価と動物福祉」第27回日本学会会議 トキシコロジー研究連絡委員会シンポジウム (2004. 11) 東京

12. 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
13. 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
14. Yuping 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
15. 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
16. 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
17. Toshie Tsuchiya: Regulation and Activities of Standardization for Tissue Engineered Products and Medical Devices in Japan. 4<sup>th</sup> ASIAN INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON BIOMATERIALS 2<sup>nd</sup> INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON FUSION OF NANO AND BIO TECHNOLOGIES (FNB) 2004 11. Tsukuba
18. 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
19. 中岡竜介、Susan Hsiong、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
20. 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的異常の誘発」日本バイオマテリアル学会シンポジウム 2004 (2004. 11) つくば
21. 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
22. 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
23. 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
24. 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

25. 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
26. Toshie Tsuchiya: Evaluation of Cell and tissue Based Products in Japan. The 2<sup>nd</sup> KFDA-KRIBB Joint International Symposium International Harmonization on Biopharmaceuticals. 2004 10. Korea
27. 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
28. 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42回日本人工臓器学会大会 (2004. 10) 東京
29. 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
30. 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
31. 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
32. 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
33. 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
34. 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
35. 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
36. 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
37. 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
38. 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
39. 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- $\beta$  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
40. 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
- 41.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
- 42.Toshie Tsuchiya, Nasreen Banu, Sadami Tsutsumi: Different action on the chondrogenesis of human articular chondrocytes with hyaluronic acid and collagen matrix. 7<sup>th</sup> World Biomaterial Congress (2004,5) Sydney
- 43.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)
- 44.Toshie Tsuchiya: Overview on Biological and Clinical Evaluation. International Conference on Biomaterials and Tissue Engineering 2004 (2004,5) Kuala Lumpur. (invited lecture).
- 45.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
- 46.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
- 47.土屋利江:「医療機器及び細胞組織医療製品の安全性・有効性の基本的な考え方」2<sup>nd</sup> BMC-NIMS シンポジウム 平成16年3月 つくば
- 48.土屋利江:「再生医療のための細胞の評価と標準化」第4回分子・細胞医療におけるME研究会 平成16年2月 東京
- 49.Toshie Tsuchiya: Standards and guidelines for the second development of the medical devices and tissue engineered products. High-level workshop on international standards for medical technologies 2004. 2. Geneva, Switzerland
- 50.鈴木寿、土屋利江、吉原なみ子: コラーゲンスポンジ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17回日本エイズ学会 平成15年11月
- 51.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」日中シンポジウム 平成16年2月 北京、中国
- 52.土屋利江:「再生医療実用化への課題」第3回再生医療学会総会「再生医療フォーラム」平成16年3月 幕張
- 53.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」第3回再生医療学会総会パネルディスカッション 平成16年3月 幕張
- 54.土屋利江:「細胞間結合機能の評価」第3回再生医療学会サテライトシンポジウム 平成16年3月 幕張
- 55.Nasreen Banu, Toshie Tsuchiya: Effect of the catalyst used in the biodegradable polymers on chondrogenesis of human articular cartilage 第3回再生医療学会総会



- 平成 16 年 3 月 幕張
56. 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  
ヒト表皮角化細胞及びヒト間葉系幹細胞  
の分化促進効果 第 3 回再生医療学  
会総会 平成 16 年 3 月 幕張
57. 澤田留美、土屋利江、伊藤友実、松田良  
枝、松岡厚子：ヒト幹細胞を用いた細胞  
組織医療機器の安全性評価に関する研  
究(1) 第 3 回再生医療学会総会 平  
成 16 年 3 月 幕張
58. Saifuddin Ahmed, Toshie Tsuchiya：  
Studies on the different tumorigenic  
activities of PLLA between two strains  
of mice 第 3 回再生医療学会総会 平  
成 16 年 3 月 幕張
59. Jun Yang, Toshie Tsuchiya：  
Enhancement of E-cadherin  
expression and liver functions of  
HepG2 in alginate gel 第 3 回再生医  
療学会総会 平成 16 年 3 月 幕張
60. 松岡厚子、配島由二、長谷川千恵、土屋  
利江：医療材料関連物質による核内倍加  
の誘発 第 32 回日本環境変異原学会  
平成 15 年 11 月 津
61. Sadami Tsutsumi and Toshie  
Tsuchiya：Recent Japanese  
regulations for tissue engineered  
medical products and trials for  
evaluation of their mechanical  
properties. 2<sup>nd</sup> Japanese-Swiss  
Workshop on Biomaterials 2003. 11.  
Tsukuba
62. 土屋利江：招待講演「組織工学材料と細胞  
組織医療機器の標準化：国際的な動向  
とわが国の現在・近未来について」第  
3 回日本バイオマテリアル学会シンポジ  
ウム 平成 15 年 9 月 札幌
63. 伊佐間和郎、配島由二、土屋利江：ガン  
マ線照射コラーゲンの骨芽細胞に及ぼ  
す影響 第 25 回日本バイオマテリアル  
学会大会 平成 15 年 12 月 大阪
64. Saifuddin Ahmed, Toshie Tsuchiya：  
The different effects of PLLA plates on  
surrounded tissues between two  
strains of mice 第 25 回日本バイオマ  
テリアル学会大会 平成 15 年 12 月 大  
阪
65. Nasreen Banu, Toshie Tsuchiya,  
Sadami Tsutsumi：Different action on  
the chondrogenesis of human articular  
chondrocytes with two types of  
hyaluronic acid 第 25 回日本バイオマ  
テリアル学会大会 平成 15 年 12 月 大  
阪
66. 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  
間連絡機構抗進効果 第 25 回日本バ  
イオマテリアル学会大会 平成 15 年 12  
月 大阪
67. バヌーナスリン、土屋利江：起源の異な  
るヒアルロン酸のヒト軟骨細胞の増殖  
と分化に及ぼす相反する効果 第 6 回  
日本組織工学会大会 平成 15 年 6 月  
東京
68. 柳楽勤、スーザンマチュー、山越葉子、  
土屋利江：正常ヒト皮膚繊維が細胞のギ  
ャップ結合細胞間連絡機能に及ぼす温  
度応答性ポリ-N-イソプロピルアクリル  
アミドの促進効果 第 6 回日本組織工  
学会大会 平成 15 年 6 月 東京

- 69.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 平成15年6月  
東京  
体組織補填体  
特願準備中：生体組織補填材の製造方法  
協力研究者
- 70.土屋利江：医療機器に関連した薬事法改  
正と有効性・安全性・品質確保の考え  
方について 第133回日本金属学会  
2003年秋季大会 平成15年10月 札  
幌  
澤田 留美  
サイフデン・アーメド  
石黒 操  
伊藤 友実  
(国立医薬品食品衛生研究所 療品部)
- G. 知的財産権の出願・登録状況
1. 特許取得予定
- 特願 2002-78407 宿主内埋め込み用構  
造体および繁殖方法  
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 細胞制御学教室)
- 特願 2003-8855 ギャップ機能抑制剤  
吉原なみ子  
(国立感染症研究所 エイズ研究センタ  
ー)
- 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、その製造方法、及びその用途
- 特願 2004-330417 生体組織補填材および生

図1. . NHDFとOM10.1の添加培養における細胞増殖

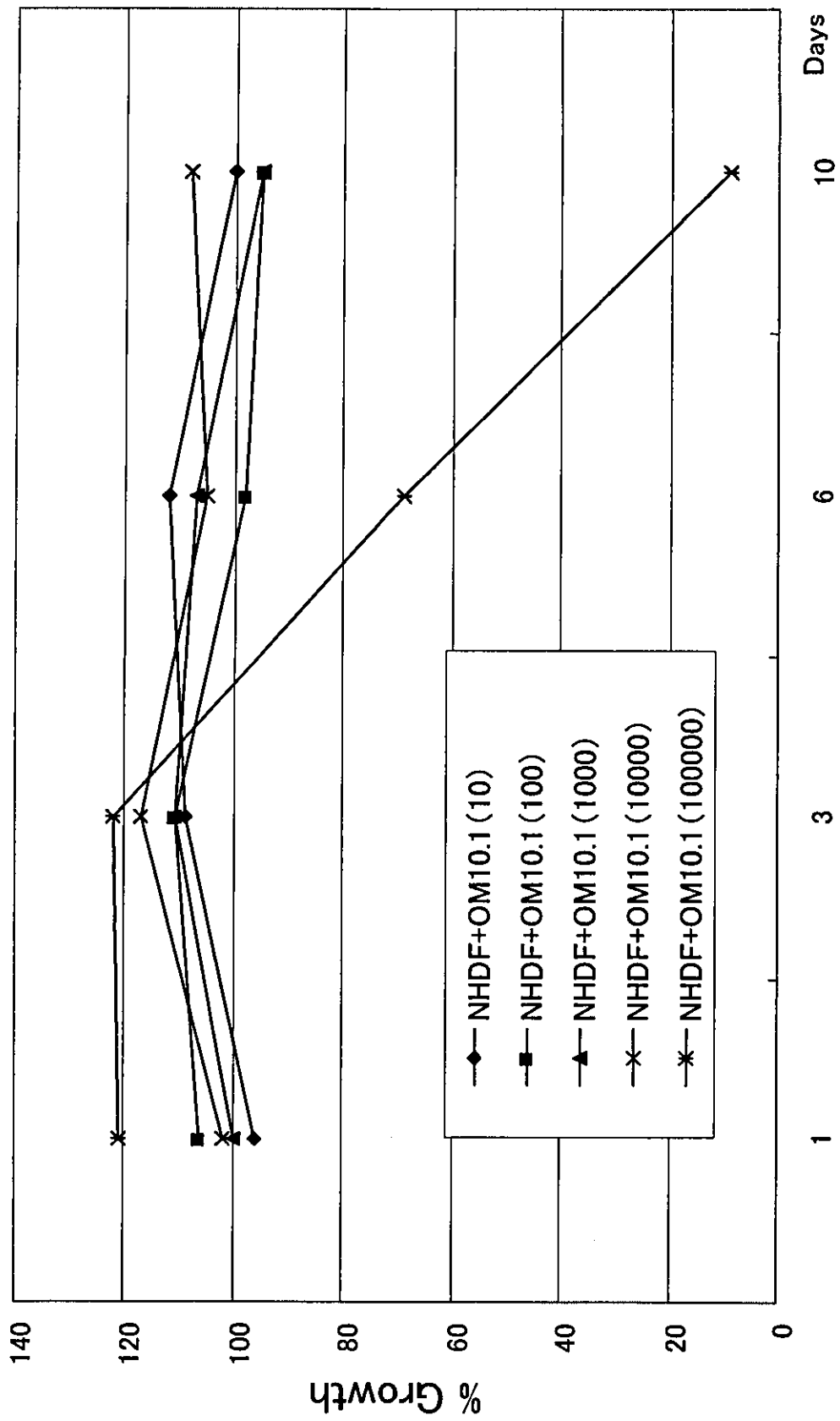


表2. NHDFとの共培養におけるHIV-1p24Ag と RT-PCR

days after culture (cells)	1		3		6		10	
	p24Ag	PCR	p24Ag	PCR	p24Ag	PCR	p24Ag	PCR
1. OM10.1 ( $10^1$ )	0.3	-	0.3	+	0.4	+	0.5	+
2. OM10.1 ( $10^2$ )	0.3	+	0.3	+	0.4	+	1.5	+
3. OM10.1 ( $10^3$ )	0.4	+	0.5	+	2.1	+	12.6	+
4. OM10.1 ( $10^4$ )	1.1	+	2.9	+	15.8	+	29.5	+
5. OM10.1 ( $10^5$ )	10.7	+	26.3	+	31.2	+	34.5	+