

添加量の場合でもエンドトキシン試験の回収率を上回っていた。HCPA 用の細胞としてライン化された保存株を使用する場合、試験に要する細胞数を得るまでに分化刺激の時間を含めて通常 2 週間程度の準備期間が必要になるが、試験液を調製する必要がない、換言すれば抽出効率を考慮する必要がないことは大きな利点である。前述のとおり、検出感度もエンドトキシン試験と大きな差異がなく、HCPA では LPS も含めてサイトカインネットワークを介して発熱を惹起する全ての発熱性物質を検出できる利点もある。生体適合性の劣る材料や微生物学的汚染度の高い材料などを生体内に埋植した際に誘導される炎症反応は好中球やマクロファージなどの免疫担当細胞により惹起される。HCPA では試料に対するヒト免疫担当細胞の応答性を指標としているため、ヒトに対するリスクを直接評価でき、スキャホールドをヒトに適用した際の生体反応を予測する方法として非常に有益である。

予備的に C 社製コラーゲン製品を試料として IL-6 産生誘導能を指標とした HCPA を適用した結果、同製品は MM6-CA8 細胞に対して大腸菌 03 株 LPS 4.3 pg/mg に相当する IL-6 産生誘導能を示した。同製品の LPS 含量は 0.006 EU/mg (1 ng LPS = 5 EU として 30 pg/mg) であり、エンドトキシン試験と HCPA との相関性は低い、LPS には種特異性があり、今回試験に供した C 社製コラーゲン製品に混在する LPS は、アルギン酸由来創傷被覆剤の場合と同様、ヒト細胞に対する反応性が大腸菌 LPS よりも劣ることが示唆された。

今後、試料重量と細胞数の相関性や細胞の継代による反応性変化などを検討した後、

天然材料から製造された市販創傷被覆剤に対する MM6-CA8 細胞の反応性を評価し、過去に実施した同製品に関する菌体成分汚染サーベイ試験の結果と比較検討する予定である。この際、LPS が活性を発現するための種特異性を評価するため、MM6-CA8 細胞の他、マウス由来マクロファージ様 J774.1 細胞を合わせて使用する。また、MM6-CA8 細胞から誘導される IL-6 以外の炎症性サイトカインおよびその他のケモカインに関する網羅的解析を実施することにより、各種菌体成分および材料に対する同細胞の反応挙動の評価や発熱マーカーの特定を行う。その他、粒径の異なる無機材料を使用して、貧食作用による MM6-CA8 細胞の活性化能を検討することにより、HCPA の有用性を総合的に評価する予定である。最終的には、現在市販されているスキャホールドに反応系を最適化した HCPA を適用し、従来法により評価した試験結果と比較検討する。

2. 幹細胞を用いた細胞組織医療機器の開発を目指し、現在多くの研究が行われている。骨髄由来の間葉系幹細胞は、骨、軟骨、脂肪、筋肉への分化能を持つだけでなく、神経細胞や肝細胞、心筋などへの分化も示唆されており、幅広い医療現場での利用が期待されている。骨髄間葉系幹細胞はその取り扱いが比較的容易で、*in vitro* での培養方法も確立されていることから、最も実用化に近い細胞組織医療機器の材料の 1 つであろう。しかしその反面、幹細胞は正常細胞でありながら増殖能力を持つという点で、癌細胞と共通の性質を持つ。そのような背景の中、2005 年の Rubio らの報告 (Cancer Res 2005; 65(8): 3035-9) は、幹細胞の癌化

という可能性を否定できないものであった。このため、本研究では、今年度は幹細胞の癌化の危険性についてヒト骨髄由来間葉系幹細胞 (hMSC) を用いて *in vivo* と *in vitro* の両系で検討した。

まず、ヌードマウスを用いた細胞移植試験では hMSC をマウスの背部皮下へ  $3 \times 10^6$  cells / mouse 移植し 16 週間観察したところ、腫瘍の形成は認められなかった。今回、発癌イニシエーターである 3-methylcholanthrene 処理を施した hMSC についても同様の検討を行った。3-methylcholanthrene は、マウスの BALB/c 3T3 細胞を用いた *in vitro* の発癌試験であるトランスフォーメーション試験のポジティブコントロールとして用いられる発癌イニシエーターであり、イニシエーションの方法もこのトランスフォーメーション試験に準じて行った。この発癌のイニシエーションを施した細胞を用いた hMSC (MC) 群も hMSC を移植した群と同様に、16 週間で腫瘍形成は認められなかった。以上の結果から、未分化の幹細胞を生体内に移植しても、ただちに癌化する可能性は低い事が示唆された。

さらに、幹細胞の癌化の危険性について、*in vitro* の系で簡便に調べる方法を探るために、幹細胞と腫瘍細胞におけるいくつかの遺伝子発現について比較検討し、両者の違いを示す遺伝子の探索を試みた。幹細胞と比較する腫瘍細胞としては、ヒト骨肉腫由来細胞 (HOS) とヒト軟骨肉腫細胞 (OUMS-27) を選択した。なぜならば、幹細胞を用いた細胞組織医療機器として、再生骨、再生軟骨をめざした研究が現在盛んに行われており、その実用化が近いと考え

られるため、本研究では比較対象とした。

まず、癌化と細胞増殖という観点から、細胞増殖に関わり、癌遺伝子でもある *c-myc*、逆に癌抑制遺伝子であり種々のシグナル伝達系にも関わる *Wnt-5A* の mRNA 発現について検討したところ、3 細胞間での発現レベルの差はあるものの、幹細胞 (hMSC) と腫瘍細胞 (HOS, OUMS-27) との間での差は認められなかった (図 6, 7)。さらに、幹細胞の未分化マーカーとなるのではないかと考えられ、癌細胞でもその発現が確認されている *Oct-4* についても検討したところ、3 細胞間でその発現に有意な差は認められなかった (図 8)。以上の 3 遺伝子に関する検討からは、幹細胞と腫瘍細胞との間での違いは示されなかった。

そこで次に、細胞周期の制御に関わる遺伝子についての検討を行った。まず、*TGF $\beta$ 1,2* について比較したところ、どちらも個々の細胞間での発現レベルの差はあるが、幹細胞と腫瘍細胞間での違いは認められなかった (図 9A,B)。*TGF $\beta$*  のレセプターについては、*TGF $\beta$ RI* は幹細胞 (hMSC) に比べて腫瘍細胞 (HOS, OUMS-27) の方がその mRNA 発現レベルは有意に高かった (図 10A)。反対に *TGF $\beta$ RII* は幹細胞に比べて腫瘍細胞の方が有意に発現レベルは低かった (図 10B)。次に、細胞周期の制御やアポトーシスなどに関与し癌抑制遺伝子として知られる *p53* については、HOS が他の 2 細胞に比べて有意に発現レベルが高く、幹細胞と腫瘍細胞間での違いは見られなかった (図 11)。*p53* に誘導され細胞周期制御因子の一つである *p21* については、幹細胞 (hMSC) の方が腫瘍細胞 (HOS, OUMS-27) に比べて有意に発現レベルが高

かった(図 12)。さらに、細胞周期制御因子であり細胞老化に関わる p16 については、幹細胞(hMSC)では発現していたが、腫瘍細胞(HOS, OUMS-27)では発現が認められなかった(図 13)。この様に、p16 は幹細胞と腫瘍細胞とで発現の有無という大きな違いが示された。幹細胞は、細胞組織医療機器の材料として利用する場合、生体外で *in vitro* での培養過程を経なければならぬため、次に、培養期間による p16 の発現レベルの変化について調べた。hMSC は、培養期間が長くなると徐々にその増殖能が低下していく事を我々はこれまでに確認している。増殖が盛んな継代数 3 代目(#3)のものからほとんど増殖が停止した 23 代目(#23)までについて hMSC の p16 の発現レベルの変化を調べたところ、培養期間に依存してその発現レベルは上昇した(図 14)。このことから、hMSC における p16 の mRNA 発現レベルの上昇は、細胞増殖能の低下を示す一つの指標となりうる事が示唆された。さらに、細胞の無限増殖能を持つ腫瘍細胞では p16 の発現が認められないことから、細胞周期制御因子である p16 が、細胞増殖能という観点から幹細胞と腫瘍細胞との違いを示す指標の候補遺伝子の一つと考えられた。

幹細胞と腫瘍細胞の遺伝子発現を比較した以上の結果をまとめると、幹細胞と腫瘍細胞間で mRNA 発現に有意な差が見られた遺伝子は TGF $\beta$ RI, TGF $\beta$ RII, p21, p16 であり、幹細胞の方が腫瘍細胞よりも発現レベルが高かったのは、TGF $\beta$ RII と p21、反対に低かったのは TGF $\beta$ RI であった。p16 は、幹細胞でのみその発現が認められ、腫瘍細胞では発現が認められなかった。このこと

から、幹細胞の癌化の危険性を簡便に評価するための指標の候補として p16 が挙げられるであろう。

3. 本年度は、ヒト精子を材料として、DSB、SSB 観察法の基礎的検討を行い、個々の細胞においてこれらを観察できるようになった。また数メガベースの DNA を電気泳動的に展開することが可能となり、次年度においては DNA fiber 上における遺伝子の解析法確立に取り組みたい。

4. 移植用の細胞の均質性と同一性が簡単なテストで検定できるようになったので、科学的な根拠に準拠して細胞治療の治療効果を評価できるようになった。また腸骨および歯槽骨から分離したヒト間葉系幹細胞のマーカー遺伝子について多くが共通していたものの 20%–30%は共通していなかったことは、神経冠由来および中胚葉由来のヒト間葉系幹細胞の性質が異なることを示唆している。

5. 検査手順において、時間的要件と検査試料量を考慮し、移植前に評価できる方法と移植後に評価する方法の組み合わせを決定した。エンドトキシン検査は、バリデーションをとることが必要と考えられた。培養液と培養細胞の検査は、移植前後のそれぞれに評価できる検査方法と検査回数を選択することがより良いと考えられた。

6. 臍帯血由来間葉系細胞の最適な採取に関わる要因、時間、容量条件を得た。また骨、軟骨細胞へ分化しうる細胞が存在していることを明らかにした。今後、*in vivo*での骨、

軟骨形成の詳細を検討する必要がある。

7. 重症心不全に対する同種移植治療では、対象患者が免疫学的に感作されている場合が多く、綿密なアロ免疫応答モニタリングと巧妙な拒絶反応治療が必要になると考えられた。

## E. 結論

1. HCPA は、感度的に既存のリムルス試験と大差がなく、種々の発熱性物質を探知できる利点を持つと共に、試料に対するヒト免疫担当細胞の応答性を指標としているため、スキヤホールドをヒトに適用した際の生体反応を予測する方法として非常に有益であると思われた。

2. 本研究では、幹細胞の癌化の危険性についてヒト骨髄由来間葉系幹細胞 (hMSC) を用いて *in vivo* と *in vitro* の両系で検討した。まず、ヌードマウスを用いた細胞移植試験では hMSC をマウスの背部皮下へ  $3 \times 10^6$  cells / mouse 移植し 16 週間観察したところ、腫瘍の形成は認められなかった。

さらに、幹細胞の癌化の危険性について、*in vitro* の系で簡便に調べる方法を探るために、幹細胞 (hMSC) と腫瘍細胞 (HOS ; ヒト骨肉腫細胞、OUMS-27 ; ヒト軟骨肉腫細胞) におけるいくつかの遺伝子発現について比較検討し、両者の違いを示す遺伝子の探索を試みた。今回調べた遺伝子は、*c-myc*、*Wnt-5A*、*Oct-4*、*TGFβ1*、*TGFβ2*、*TGFβRI*、*TGFβRII*、*p53*、*p21*、*p16* の 10 遺伝子。1 遺伝子は、幹細胞でのみその発現が認められ、腫瘍細胞では発現が認めら

れなかった。さらに hMSC の培養期間に依存してその発現レベルは上昇した。hMSC は、培養期間が長くなると徐々にその増殖能が低下するため、hMSC における mRNA 発現レベルの上昇は、細胞増殖能の低下を示す一つの指標となりうる事が示唆された。さらに、細胞の無限増殖能を持つ腫瘍細胞ではその遺伝子の発現が認められないことから、細胞周期制御因子である 1 遺伝子が、細胞増殖能という観点から幹細胞と腫瘍細胞との違いを示す指標の候補遺伝子の一つと考えられた。

3. ヒト精子の DNA 損傷は極めて多様であり、構造正常性 (DSB、SSB 観察)、遺伝子など多面的な解析が必要であることが示唆された。

4. 間葉系幹細胞のマーカーが移植用細胞としての品質検査に役立つことが判明した。

5. 自家間葉系幹細胞移植に際して、術前から術後までの各検査の時期と方法を検討し病原体の否定試験等の手順を決定し、提案した。

6. ヒトの骨髄間葉系細胞では分離後に増殖させ、目的とする組織細胞に *in vitro* で分化させたて移植に使用するという方法が可能であると考えられている。臍帯血間葉系細胞も骨髄と同様な手法が可能である。臍帯血由来間葉系細胞はドナーへの負担や危険性がなく、また免疫源性も低いとされる。臍帯血由来間葉系細胞は骨、軟骨の再生医療において間葉系細胞ソースとして期待される。

7. 重症心不全に対する同種移植治療では、

対象患者が免疫学的に感作されている場合が多く、綿密なアロ免疫応答モニタリングと巧妙な拒絶反応治療が必要になると考えられた。

#### F. 健康危険情報

6. 臍帯血は採集医療機関施設（東京臍帯血バンク採集医療機関）において、正常産の妊婦より提供目的と研究内容について説明と同意を得た上で、分娩後に採取する。採取に際してドナーの安全性は完全に確保されている。また、採取に際しては、東京臍帯血バンクにおいてはドナーに対して問診及び家族歴の調査を行っており、感染症等の既往歴あるドナーから臍帯血の採取を行わない。臍帯血そのものの安全性については、東京臍帯血バンクにおいてすべて感染症の検査を行っており、安全性の確認された臍帯血の提供を受けている。なお、問診及び家族歴等個人情報東京臍帯血バンクにおいて管理し、匿名化の処理を講じている。以上により、提供を受けた材料は個人のプライバシーが完全に保護されていると同時に、研究従事者の安全性も確保されている。

#### G. 研究発表

##### 1) 論文発表

1. Saiffudin Ahmed, Toshie Tsuchiya, A mouse strain difference in tumorigenesis induced by biodegradable polymers, J. Biomed. Mater. Res. accepted.、2006.
2. Nasreen Banu, Toshie Tsuchiya, Rumi Sawada, Effects of biodegradable polymer synthesized with inorganic tin on the chondrogenesis of human articular cartilage, J Biomed Mater Res, 2005, 77, 84-89.
3. 矢上晶子, 加野尚生, 松永佳世子, 矢上健, 薮島由二, 土屋利江, 国内の天然ゴム製品から溶出する主要なアレルギー蛋白は何か? 日本ラテックスアレルギー研究会誌, accept
4. Nasreen Banu, Yasmin Banu, Masamune Sakai, Tadahiko Mashino, Toshie Tsuchiya, Biodegradable polymers in chondrogenesis of human articular chondrocytes, J Artif Organs, 2005, 8(3), 184-191.
5. Atsuko Matsuoka, Kazuo Isama, Toshie Tsuchiya, In vitro induction of polyploidy and chromatid exchanges by culture medium extracts of natural rubbers compounded with 2-mercaptobenzothiazole as a positive control candidate for genotoxicity tests, J Biomed Mater Res, 2005, 75(2), 439-444.
6. Tsutomu Nagira, Susan Bijoo Matthew, Yoko Yamakoshi, Toshie Tsuchiya, Enhancement of Gap Junctional Intercellular Communication of Normal Human Dermal Fibroblasts Cultured on Polystyrene Dishes Grafted with Poly-N-isopropylacrylamide(PIPAAm), Tissue Engineering, 2005, 11(9-10),1392-1397.
7. Masato Tamai, Ryusuke Nakaoka, Toshie Tsuchiya, In vitro study on the osteogenesis of normal human osteoblasts cultured on the discs of various kinds of calcium phosphate ceramics, Archives of Bioceramics Research., 2005, 5, 158-161.

8. Masato Tamai, Ryusuke Nakaoka, Toshie Tsuchiya, Cytotoxicity of Various Calcium Phosphate Ceramics, *Bioceramics*, Key Material Eng. 2005, Vol.309-311, 263-266.
9. Masato Tamai, Ryusuke nakaoka, Kazuo Isama, Toshie Tsuchiya, Novel calcium phosphate ceramics: The remarkable promoting action on the differentiation of the normal human osteoblasts, *Bioceramics*, 2005, Key Material Eng. 2005. Vol. 309-311, 97-100.
10. Ryusuke Nakaoka, Toshie Tsuchiya, Enhancement of differentiation and homeostasis of human osteoblasts by interaction with hydroxyapatite in microsphere form, *Bioceramics*, 2005, Key Material Eng. 2005, Vol. 309-311, 1293-1296.
11. Yuping Li, Tsutomu Nagira, Toshie Tsuchiya, The effect of hyaluronic acid on insulin secretion in HIT-T15 cells through the enhancement of gap junctional intercellular communication, *Biomaterial*, 2006, 27, 1437-1443.
12. Sadami tsutsumi, Duck-Young JUNG, Yu-Bong KANG, Toshie Tsuchiya, A Novel Non -Destructive Method To Measure Elastic Moduli Of Cartilage Cell In Situ, *IFMBE*, 2005, in press.
13. Ryusuke Nakaoka Saifuddin Ahmed, Toshie Tsuchiya, Hydroxy apatite microspheres enhance gap junctional intercellular communication of human osteoblasts composed of connexin 43 and 45, *J Biomed Mater Res A*, 2005, 74(2), 181-186.
14. Misao Nagahata, Ryusuke Nakaoka, Akira Teramoto, Koji Abe, Toshie Tsuchiya, The response of normal human osteoblasts to anionic polysaccharide polyelectrolyte complexes, *Biomaterials*, 2005, 26(25), 5138-5144.
15. Kazuo Isama, Toshie Tsuchiya, Osteoblast Differentiation and Apatite Formation on Gamma-Irradiated PLLA Sheets, *Key Engineering Materials*, 2005 288-289, 409-412.
16. 石黒（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（報文）*，2005，61，98-102
17. 土屋利江，再生医療・繊維工学・人工臓器に使用される医療用材料の安全性・有効性に関する基本的考え方，*繊維学会誌（繊維と工業）*，2005，61，148-149.
18. Nagahata M, Tsuchiya T, Ishiguro T, Matsuda N, Nakatsuchi Y, Teramoto A, Hachimori A, Abe K, A novel function of N-cadherin and Connexin43: marked enhancement of alkaline phosphatase activity in rat calvarial osteoblast exposed to sulfated hyaluronan. *Biochem Biophys Res Commun*. 2004, 315(3), 603-11.
19. Atsuko Matsuoka, Toshie Tsuchiya, Gene expression changes in BALB/3T3 transformants induced by poly(L-lactic acid) or polyurethane films. *J Biomed Mater Res A*. 2004, 68(2), 376-82.
20. Toshie Tsuchiya, A useful marker for

- evaluating the safety and efficacy of tissue engineered products, *Tissue Engineered Medical Products (TEMPS) ASTM 2004, STP 1452, 254-261*
21. 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*
  22. 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.
  23. 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
  24. 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-, 2004, 22-2, 69-70, 200 4.
  25. 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, 2004, 3巻, 2月号, 107-110.
  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, 2004, 53巻, 3月号, 144-146
  27. 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, 2004, 3巻, 5月号, 71-75
  28. 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-, 2004, 22-4, 258-264
  29. 増田茂樹, 土屋利江, 臨床研究・治験に係る規制の概要, バイオマテリアル-生体材料-, 2004, 22-5, 333-342
  30. Takeshi Yagami, Yuji Haishima, Toshie Tsuchiya, Akiko Tomitaka-Yagami, Hisao Kano, Kayoko Matsunaga, Proteomic Analysis of Putative Latex Allergens, *Allergy Immunology, 2004, 135, 3-11.*
  31. 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, 2004, 2, 1-8
  32. 矢上健, 薮島由二, 土屋利江, 富高晶子, 加野尚生, 松永佳世子, プロテオミクスの手法を用いたラテックスアレルギーの解析. 日本ラテックスアレルギー研究会誌, 2003, 7, 38-43
  33. 伊佐間和郎, 土屋利江, 金属製医用材料のヒト骨芽細胞の骨分化機能に及ぼす影響評価. *Bull. Natl. Inst. Health Sci., 2003, 121, 111-112*
  34. Kazuo Isama, Toshie Tsuchiya, Enhancing effect of poly(L-lactide) on the differentiation of mouse osteoblast-like MC3T3-E1 cells, *Biomaterials, 2003, 24, 3303-3309.*
  35. Yoshinori Katakura, Eriko Nakata, Yukiko Tabira, Takumi Miura, Kiichiro Teruya, Toshie Tsuchiya, and Sanetaka Shirahata, Decreased Tumorigenicity In Vivo When Transforming Growth Factor  $\beta$  Treatment Causes Cancer Cell Senescence. *Biosci, Bioechnol. Biochem, 2003, 67(4), 815-821*
  36. Haishima Y, Hasegawa C, Yagami T, Tsuchiya T, Matsuda R, Hayashi Y, Estimation of uncertainty in kinetic-colorimetric assay of bacterial endotoxins. *J Pharm Biomed Anal, 2003, 32(3), 495-503.*

37. Nakagawa Y, Murai T, Hasegawa C, Hirata M, Tsuchiya T, Yagami T, Haishima Y, Endotoxin contamination in wound dressings made of natural biomaterials. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater.* 2003, 66(1), 347-55.
38. J. Yang, A. Ichikawa, T. Tsuchiya, A novel function of connexin 32: Marked enhancement of liver function in a hepatoma cell line. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2003, 307, 80-85.
39. R. Sawada, T. Ito, Y. Matsuda, and T. Tsuchiya "Safety evaluation of tissue engineered medical devices using normal human mesenchymal stem cells", *Animal cell technology*, in press
40. N. Bauu, T. Tsuchiya, and R. Sawada "Effects of a biodegradable polymer synthesized with inorganic tin on the chondrogenesis of human articular chondrocytes, *J. Biomed. Mater. Res*, in press
41. Yoshida S, Shimmura S, Shimazaki J, Shinozaki N, Tsubota K. Serum-free spheroid culture of mouse corneal keratocytes. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2005 46:1653-1658.
42. Shimmura S, Miyashita H, Konomi K, Shinozaki N, Taguchi T, Kobayashi H, Shimazaki J, Tanaka J, Tsubota K. Transplantation of corneal endothelium with Descemet's membrane using a hydroxyethyl methacrylate polymer as a carrier. *Br J Ophthalmol.* 2005 89:134-137.
43. Kaneko S, Human sperm processing in assisted reproduction technology. *J. Mamm. Ova Res.* 22 : 224—228, 2005
44. Matsubara, T., Suardita K., Ishii, M., Igarashi, A., Oda, R., Nishimura, M., Saito, M., Nakagawa, K., Yamanaka, K., Miyazaki, K., Shimizu, M., Tsuji, K., Nakamura, K., Kato, Y. Alveolar bone marrow as a cell source for regenerative medicine: differences between alveolar and iliac bone marrow stromal cells. *Journal of Bone and Mineral Research*, 20(3), 399-409, 2005.
45. Ishii, M., Koike, C., Igarashi, A., Yamanaka, K., Pan, H., Higashi, Y., Kawaguchi, H., Sugiyama, M., Kamata, N., Iwata, T., Matsubara, T., Nakamura, K., Kurihara, H., Tsuji, K., and Kato, Y. Molecular Markers Distinguish Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells from Fibroblasts. *Biochemical and Biophysical Research Communication.* 332(1), 297-303, 2005.
46. 歯周組織の細胞移植療法、骨髄間葉系幹細胞を用いた歯周組織再生療法 河口浩之、林秀昭、水野智仁、藤田剛、長谷川直彦、柴秀樹、中村茂夫、日野孝宗、吉野宏、栗原英見、田中英夫、木村明朗、辻紘一郎、加藤幸夫. 株式会社医薬ジャーナル社 CLINICAL CALCIUM, 第 15 巻 7 号 99—104, 2005



47. Zhang X, Mitsuru A, Igura K, Takahashi K, Ichinose S, Yamaguchi S, Tsuneo A. Takahashi. Mesenchymal progenitor cells derived from chorionic villi of human placenta for cartilage tissue engineering. *Biochem Biophys Res Commun.*340, 944-952, 2006.
48. Okada H, Nagamura-Inoue T, Mori Y, Takahashi TA. Expansion of V $\alpha$ 24(+)V $\beta$ 11(+) NKT cells from cord blood mononuclear cells using IL-15, IL-7 and Flt3-L depends on monocytes. *Eur. J. Immunol.*36, 236-244, 2006
49. Yasurake M, Zheng Y, Nagamura-Inoue T, Akagawa E, Tokushima Y, Terashima S and Takahashi TA. SCID repopulating activity of human umbilical cord blood derived hematopoietic stem and/or progenitor cells in a nonobese diabetic/Shi SCID mice serial xenotransplantation model and immune cell activities in vitro: a comparative study of the filter method and the hydroxyethyl starch method. *Transfusion* 45, 1899-1908, 2005.
2. 学会発表
1. 伊藤友実, 澤田留美, 藤原葉子, 脊山洋右, 土屋利江: 「ヒト間葉系幹細胞における TGF- $\beta$  の関与する増殖機構に関する研究」第 5 回日本再生医療学会総会 (2006.3) 岡山
2. 土屋利江: 「医用材料・医療器具の安全性」バイオメディカルエンジニアリング-工学技術による新しい医療の創出-(2006.2) 東京
3. 玉井将人, 中岡竜介, 伊佐間和郎, 土屋利江: 「Nb イオン置換型新規ハイドロキシアパタイトセラミックスの合成とその骨形成能」第 4 回ナノテクノロジー総合シンポジウム (JAPAN NANO 2006) (2006.2) 東京
4. 土屋利江: 「ナノイメージングによる分子構造と機能解析-新規材料開発-」萌芽的先端医療技術 (ナノメディシン) ナノイメージング成果報告部会 (2006.1) 東京
5. Banu Nasreen, Toshie Tsuchiya: Novel role of different tin products on chondrogenesis of human articular chondrocytes. *JSAO* 2005, 2005.12, Tokyo
6. Ahmed Saifuddin, Toshie Tsuchiya: Effect of stannous 2-ethylhexanoate in human normal astrocytes. *JSAO* 2005, 2005.12, Tokyo
7. Bayar Hexig, 中岡竜介, 土屋利江: 「吸収性局所止血材量・癒着防止材料の安全性評価に関する研究 (1) 細胞毒性試験による評価」第 43 回日本人工臓器学会大会 (2005.12) 東京
8. 澤田留美, 土屋利江: 「医療機器に併用される抗血栓薬の適合性評価手法の開発-ワーファリン関連遺伝子に関する SNP 解析-」第 43 回日本人工臓器学会大会 (2005.12) 東京
9. Masato Tamai, Ryusuke Nakaoka, Toshie Tsuchiya: Cytotoxicity of Various calcium Phosphate Ceramics. *Bioceramics*18, 2005 12, Kyoto
10. Masato Tamai, Ryusuke Nakaoka, Kazuo Isama, Toshie Tsuchiya: Novel calcium phosphate ceramics: The remarkable promoting action on the differentiation of the normal human osteoblasts. *Bioceramics*18, 2005 12, Kyoto
11. Ryusuke Nakaoka, Toshie Tsuchiya: Differentiation of human osteoblasts was enhanced by co-culture with hydroxy apatite

- microspheres but not with alumina and polymeric microspheres. *Bioceramics*18, 2005 12, Kyoto
12. 伊佐間和郎、齋島由二、長谷川千恵、鹿庭正昭、土屋利江：「紫外線照射によるポリ塩化ビニルの細胞毒性変化」第 42 回全国衛生化学技術協議会総会・研究会 (2005.11) 東京
  13. 伊佐間和郎、小林郁夫、土屋利江：「Ti-Zr 基合金の正常ヒト骨芽細胞を用いた骨組織適合性評価」第 27 回日本バイオマテリアル学会大会 (2005.11) 京都
  14. Bayar Hexig, 中岡竜介、土屋利江：「外科手術材料の安全性に関する研究 (1) 細胞毒性試験による評価」第 27 回日本バイオマテリアル学会大会 (2005.11) 京都
  15. 伊藤友実、澤田留美、土屋利江：「ヒト間葉系幹細胞の細胞老化に関する研究」第 27 回日本バイオマテリアル学会大会 (2005.11) 京都
  16. 中岡竜介、土屋利江：「ナノ蛍光イメージングによる細胞-多糖 Scaffold 間相互作用観察の試み」第 27 回日本バイオマテリアル学会大会 (2005.11) 京都
  17. 齋島由二、長谷川千恵、小園知、佐々木和夫、矢上健、土屋利江：「菌体成分含有コラーゲンの生体親和性と組織再生に対する影響」第 27 回日本バイオマテリアル学会大会 (2005.11) 京都
  18. 齋島由二、伊佐間和郎、松岡厚子、長谷川千恵、松田良枝、柚場俊康、中橋敬輔、矢上健、土屋利江：「表面改質処理を施した軟質 PVC シートの化学的・生物学的特性評価」第 27 回日本バイオマテリアル学会大会 (2005.11) 京都
  19. Ahmed Saifuddin, Toshie Tsuchiya: Novel role of modified hyaluronic acid on normal human astrocytes. 27<sup>th</sup> Annual Meeting of the Japanese Society for Biomaterials, 2005.11, Kyoto
  20. Banu Nasreen, Toshie Tsuchiya: Effects of various kinds of tin catalysts on chondrogenesis of human articular. 27<sup>th</sup> Annual Meeting of the Japanese Society for Biomaterials, 2005.11, Kyoto
  21. Masato Tamai, Ryusuke Nakaoka, Toshie Tsuchiya: In vitro study on the osteogenesis of normal human osteoblasts cultured on the discs of various kinds of calcium phosphate ceramics. 5<sup>th</sup> Asian BioCeramics Symposium (ABC2005), 2005 10, Sapporo
  22. Sadami Tsutsumi, Duk Young Jung, Yu Bong KANG, Toshie Tsuchiya: A NOVEL NON-DESTRUCTIVE METHOD TO MEASURE ELASTIC MODULI OF CARTILAGE CELLS IN SITU. The 7<sup>th</sup> International Conference on Cellular Engineering, 2005.9, Korea
  23. 中岡竜介、土屋利江：「軟骨組織再生を目指した新規アルギン酸ゲルの in vitro 機能評価」第 8 回日本組織工学会 (2005.9) 東京
  24. 伊藤友実、澤田留美、土屋利江：「ヒト間葉系幹細胞の細胞老化における TGF- $\beta$  発現への影響」第 8 回日本組織工学会 (2005.9) 東京
  25. 松岡厚子、土屋利江：「In vitro 培養ヒト間葉系幹細胞の安全性評価法の開発」第 8 回日本組織工学会 (2005.9) 東京
  26. Ahmed Saifuddin, Toshie Tsuchiya, Effect of modified hyaluronic acid on the cellular function of normal human astrocytes. 第 8 回日本組織工学会 (2005.9) 東京
  27. Masato Tsunoda, Kyoko Ito, Yoko Inoue, Takeo Miki, Mitsuyasu Watanabe, Yuichiro Kudo, Toshihiko Satoh, Yoshiharu Aizawa, Toshie Tsuchiya: The effects of dibutyltin, octyl acid tin and poly-L-lactides on the viability of murine astrocyte-lineage cells. 第 15 回金属

- の関与する生体関連反応シンポジウム(2005.6) 大阪
28. 土屋利江：「わが国の医療機器規制の動向」第2回次世代医療システム産業化フォーラム 2005 (2005.5) 大阪
  29. 土屋利江：「再生医療実用化に向けて—学官産の連携を—」第2回未来医療交流会 (2005.4) 大阪
  30. 靄島由二. 感染因子含有材料の in vivo 動態評価手法の開発. 医薬品・医療機器等レギュラトリーサイエンス総合研究事業「医療機器・医用材料の安全性評価手法開発に関する研究」成果発表会 (2006. 3)
  31. 靄島由二, 長谷川千恵, 小園 知, 佐々木和夫, 矢上 健, 土屋利江. 菌体成分含有コラーゲンの生体親和性と組織再生に対する影響. 第27回日本バイオマテリアル学会大会 (2005. 11)
  32. 伊藤友実, 澤田留美, 土屋利江「ヒト間葉系幹細胞の細胞老化におけるFGF-2のTGF- $\beta$ 発現への影響」第8回日本組織工学会 (2005. 9)
  33. 澤田留美, 伊藤友実, 土屋利江「細胞組織医療機器に利用される幹細胞の安全性評価に関する研究」第42回幹細胞研究会 (2005. 11)
  34. 伊藤友実, 澤田留美, 土屋利江「ヒト間葉系幹細胞の細胞老化に関する研究—FGF-2による増殖能上昇機構の解明—」第27回日本バイオマテリアル学会 (2005. 11)
  35. 澤田留美, 土屋利江「医療機器に併用される抗血栓薬の適合性評価手法の開発—ワーファリンの薬効関連遺伝子に関するSNP解析—」第43回日本人工臓器学会 (2005. 12)
  36. 伊藤友実, 澤田留美, 藤原葉子, 脊山洋右, 土屋利江「ヒト間葉系幹細胞におけるTGF- $\beta$ の関与する増殖機構に関する研究」第5回日本再生医療学会 (2006. 3)
  37. 澤田留美, 伊藤友実, 土屋利江「細胞組織医療機器に利用される幹細胞の品質及び安全性評価」日本薬学会第126年会 (2006. 3)
  38. 兼子智, 小林健介, 片山昌勅, 松田兆史, 中川博之, 宮地系典, 富永英一郎, 岸郁子, 北岡芳久, 谷垣伸治, 岡崎雅子, 石川博通, 高松潔「細胞外DNAを指標とする造精機能評価に関する基礎的検討」第23回日本受精着床学会学術講演会(2005. 8)
  39. 郡山純子, 兼子智, 中川博之, 宮地系典, 富永英一郎, 岸郁子, 北岡芳久, 谷垣伸治, 岡崎雅子, 石川博通, 高松潔「アルカリコメット法では, 精子DNA損傷を観察できない」第23回日本受精着床学会学術講演会(2005. 8)
  40. 五十嵐晃, 河本健, 栗原英見, 河口浩之, 東幸仁, 鎌田伸之, 杉山勝, 邵金昌, 辻紘一郎, 加藤幸夫「再生医療における移植用間葉系幹細胞の検定の重要性和検定方法の検討」第4回日本再生医療学会総会 (2005.3)
  41. 山中克之, 五十嵐晃, 坂井将典, 吉松真一郎, 栗原英見, 河口浩之, 東幸仁, 杉山勝, 辻紘一郎, 加藤幸夫「下顎骨からヒト間葉系幹細胞を採取・増幅するための骨髓液の質の評価方法」第4回日本再生医療学会総会 (2005.3)
  42. 原真依子, 瀬越和美, 邵金昌, 五十嵐晃, 石井正和, 辻紘一郎, 加藤幸夫「ヒト間

- 葉系幹細胞の特徴：未分化状態での骨、軟骨、脂肪関連遺伝子の発現及び VD3 に対する応答性」第 4 回日本再生医療学会総会 (2005.3)
43. 山中克之、山本克史、坂井裕大、金子正、辻紘一郎、加藤幸夫「間葉系幹細胞の増幅・分化に適した生分解性 Scaffold (ポリ乳酸系) の表面構造」第 4 回日本再生医療学会総会 (2005.3)
44. 清水正和、河本健、五十嵐晃、阪恵美、山中克之、西村正宏、辻紘一郎、加藤幸夫「間葉系幹細胞の遺伝子発現パターン解析 I」第 15 回中国・四国骨代謝研究会 (2005. 7)
45. 阪恵美、河本健、清水正和、五十嵐晃、西村正宏、辻紘一郎、加藤幸夫「間葉系幹細胞の遺伝子発現パターン解析 II」第 15 回中国・四国骨代謝研究会 (2005. 7)
46. Y.Kato, M.Shimizu, A.Igarashi, M.Ishii, H.Kawaguchi, N.Kamata, M.Sugiyama, H.Kurihara, K.Tsuji, and T.Kawamoto. Application of Mesenchymal Stem Cells (MSC) to Regenerative Dentistry and Identification of Molecular Markers for MSC. Hiroshima Conference on Education and Science in Dentistry, 2006 (2006.1)
47. H.Kawaguchi, H.Hayashi, T.Mizuno, T.Iwata, T.Fujita, N.Hasegawa, H.Shiba, S.Nakamura, T.Hino, H.Yoshino, H.Tanaka, A.Kimura, K.Tsuji, Y.Kato, and H.Kurihara. Basic and Clinical Studies of Periodontal Tissue Regeneration by Transplantation of Own Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells. Hiroshima Conference on Education and Science in Dentistry, 2006 (2006.1)
48. Current status and future perspectives of intrathoracic organ transplantation in Japan. 日本胸部外科学会シンポジウム (2005.10)
- H. 知的財産の出願・登録状況
- 特願 2005-126591 生体組織補填材の製造方法  
特願 2005-025603 ヒトの細胞の培養方法、培養容器および生体組織補填体  
特願 2005-294058 生体組織補填材とその製造方法  
米国出願 Material for repairing biological tissues, product for repairing biological tissues, and method of manufacturing material for repairing biological tissues (2005.11.8).  
欧州出願 Material for repairing biological tissues, product for repairing biological tissues, and method of manufacturing material for repairing biological tissues. 05024220.5, (2005.11.7).  
特願 2005-104563 分子マーカーを用いた間葉系幹細胞の識別方法及びその利用  
特願 2005-223242 動物幹細胞培養用無血清培地  
国内特許 1 件 出願準備中  
米国出願準備中 1 件  
欧州出願準備中 1 件

表1 ヒト細胞を利用した in vitro 発熱性物質試験法(HCPA)の利点と欠点

利 点	欠 点
動物を使用せず、ヒトにおける反応(発熱)強度を直接試験できる	サイトカインネットワークを介さない機序により発熱を誘導する物質を検出することができない
エンドトキシン以外の発熱性物質も検出可能である	ヒト単球やマクロファージに作用する薬物などを測定することができない (例: サイトカイン受容体阻害剤、細胞毒性物質、非生理的溶液、リコンビナント INF- $\gamma$ )
検出感度も比較的高く、IL-1 および IL-6 を指標とした場合の検出限界はエンドトキシン量として、それぞれ <50 pg/ml、3 pg/ml 程度である	発熱性物質に対する反応性が末梢血ドナーまたは細胞の状態により変動する
ウサギ発熱試験およびリムルス試験において評価できない発熱性の検出が可能である(例: リムルス反応阻害・促進剤、固体試料など)	ヒト末梢血の安全性と安定供給に関する問題
基本的に発熱性物質の抽出操作を必要としない	
コストパフォーマンスと操作性に優れている	

参照資料 2 から引用

表2 市販スキャホールドの性状

販売会社名	材質	平均重量(mg)	体積(cm <sup>3</sup> )	ポアサイズ(mm)
A 社	コラーゲン/HA	148.3	1.0	150-300
B 社	$\beta$ -TCP	51.0	0.125	100-400
C 社	コラーゲン	3.5	0.039	100-200
C 社	リン酸カルシウム	45	0.058	200-400
C 社	ポリ乳酸	5.2	0.039	100-200

表3 市販スキャホールドの微生物汚染サーベイ試験

販売会社名	材質	菌体成分		
		LPS (EU/mg)	$\beta$ -グルカン (pg/mg)	ペプチドグリカン (pg/mg)
A 社	コラーゲン/HA	nd*	0.19	nd
B 社	$\beta$ -TCP	nd	nd	nd
C 社	コラーゲン	0.006	nd	nd
C 社	リン酸カルシウム	nd	nd	nd
C 社	ポリ乳酸	nd	nd	nd

\*nd, not detected (検出限界以下)

表4 各種菌体成分の LPS 含有量

菌体成分	LPS 含量 (EU/mg)	
	Endo Trap 処理前	Endo Trap 処理後
$\beta$ (1→3)-D-グルカン	nd*	nt**
ペプチドグリカン	102.0	nd
TSST-1	74.9	0.16
黄色ブドウ球菌菌体	0.48	nt

\*nd, not detected(検出限界以下), \*\*nt, not tested

表5 MM6-CA8 細胞に対する固形試料の IL-6 産生誘導能

材 料	菌体成分	添加量 (EU/mg)	IL-6 産生量 (pg/ml)
コラーゲンシート	大腸菌 O3 LPS	0	12.0
		1.1	550
		2.1	3,211
		10.7	13,640
	大腸菌 O111 菌体	0	12.0
		3.8	2,245
		7.6	17,370
		38.1	34,660
	黄色ブドウ球菌菌体*	0	12.0
		0.1	16.6
		1.0	26.3
		10.0	81.0
コラーゲン/HA 複合シート	大腸菌 O3 LPS	0	51.0
		0.4	248
		0.8	1,603
		4.0	2,220
	大腸菌 O111 菌体	0	51.0
		1.4	7,620
		2.9	9,220
		14.3	35,000
ネオボーン	—	—	11.9

IL-6 産生バックグラウンド 7.5 pg/ml, \*黄色ブドウ球菌菌体添加量  $\mu\text{g}/\text{mg}$

表6 LPS 含有コラーゲンシートからのリムルス試験と HCPA による LPS 回収率

LPS 添加量 (pg/mg)	LPS 活性回収量			
	リムルス試験*		HCPA**	
	実測値 (pg/mg)	回収率(%)	実測値 (pg/mg)	回収率(%)
0	4.4	—	5.0	—
40.0	31.6	68.2	38.0	82.5
80.0	61.8	71.8	98.0	116.3
400.0	134.5	32.5	213	52.0

\*リムルス試験: EndoTrap 精製コラーゲナーゼ消化/HCl (pH 3) 法

\*\*HCPA: 固形試料 1 mg により直接測定

大腸菌 O3 株 LPS: 1 ng = 27.5 EU

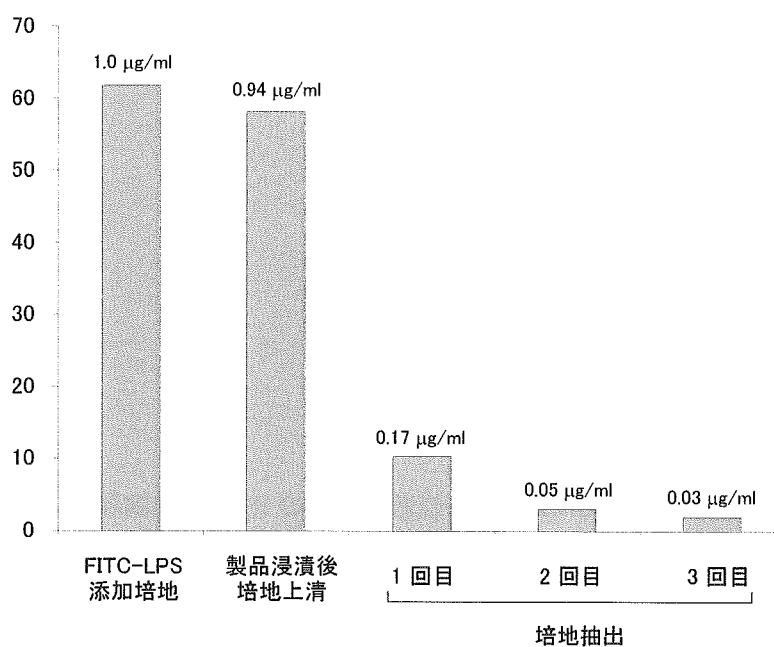


図1 FITC 標識 LPS を使用した A 社製スキャホールドに対する LPS 吸着能の評価

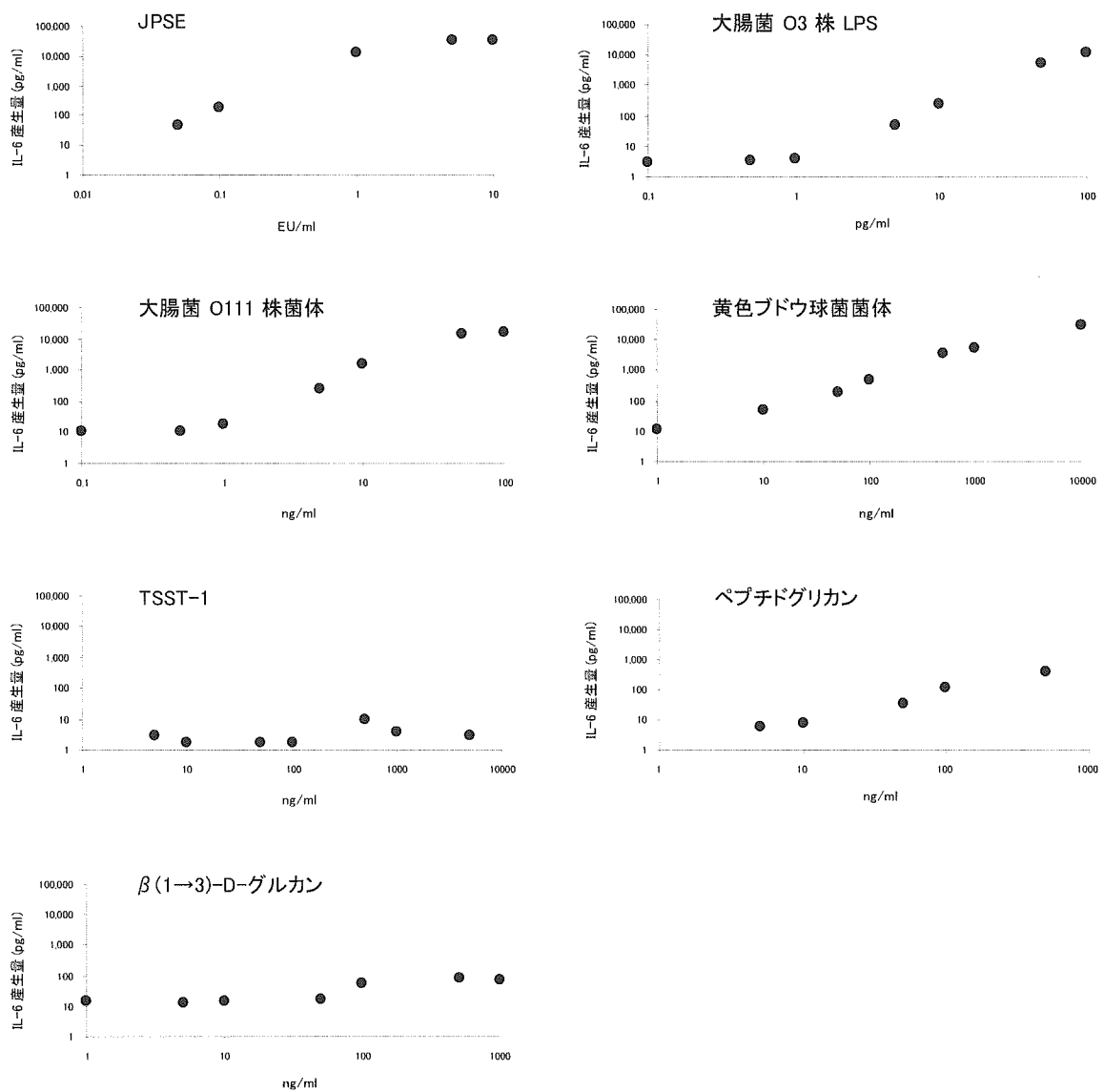


図2 MM6-CA8 細胞に対する各種菌体成分の IL-6 産生誘導能の評価



表7. リアルタイム(RT)-PCRに用いたプライマーの配列とアニーリング温度

Gene name	Primer orientation	Nucleotide sequence	Annealing Temp (°C)
c-myc	Forward	5'- GCG AAC ACA CAA CGT C -3'	50
	Reverse	5'- CAA GTT CAT AGG TGA TTG CT -3'	
Wnt-5A	Forward	5'- TTCACAGGTTCTCAGCCCAAG -3'	65
	Reverse	5'- ATCACATCACAACACGGAGGAAT -3'	
Oct-4	Forward	5'- CTT GCT GCA GAA GTG GGT GGA GGA A -3'	65
	Reverse	5'- CTG CAG TGT GGG TTT CGG GCA -3'	
p21	Forward	5'- TTG ATT AGC AGC GGA ACA -3'	60
	Reverse	5'- GGA GAA ACG GGA ACC AG -3'	
p16	Forward	5'- CAC TCA CGC CCT AAG C -3'	60
	Reverse	5'- GCA GTG TGA CTC AAG AGA A -3'	

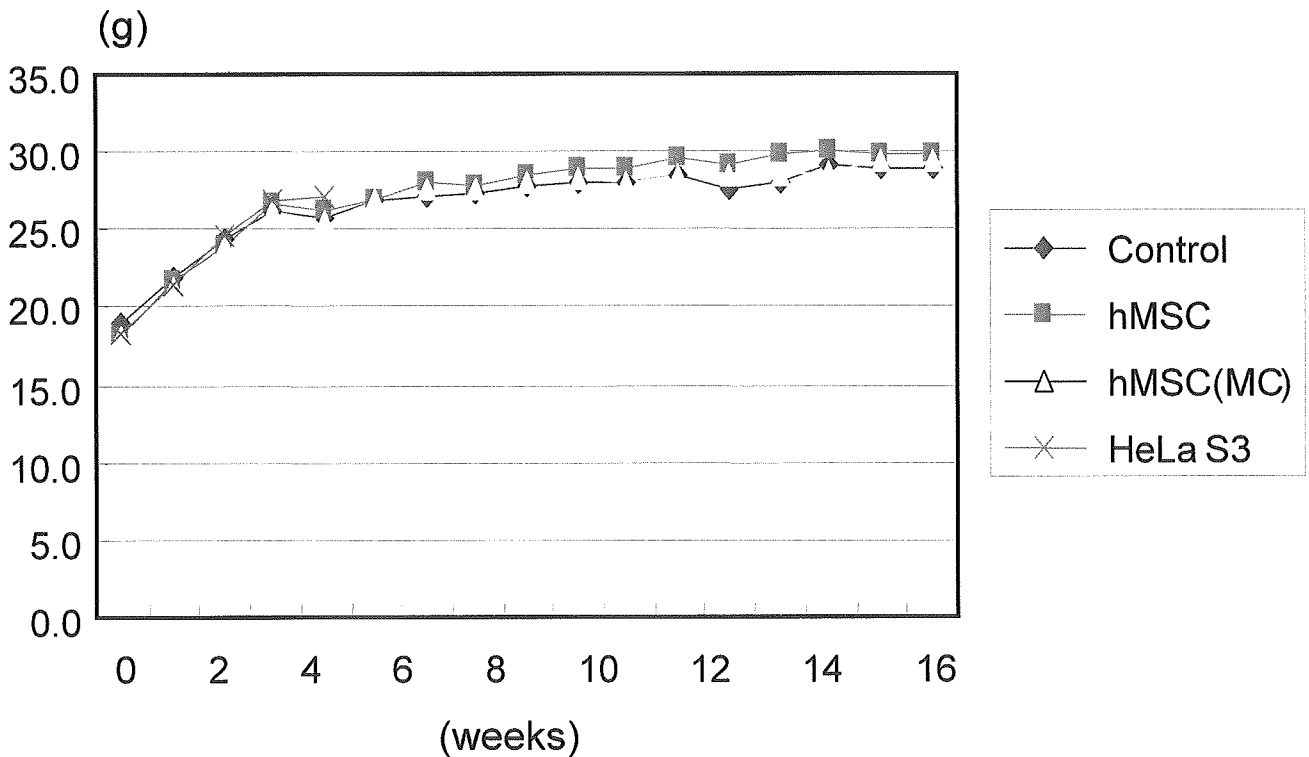
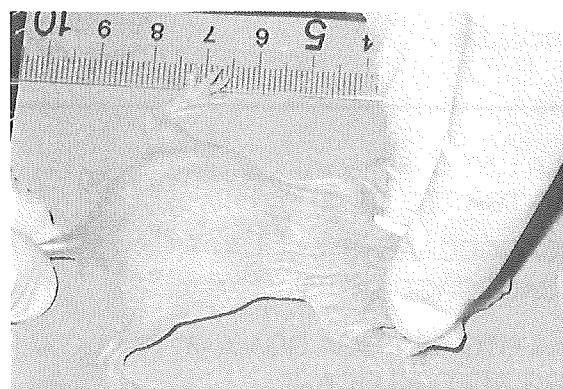
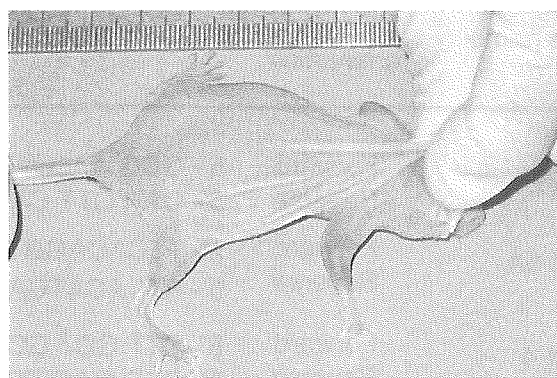


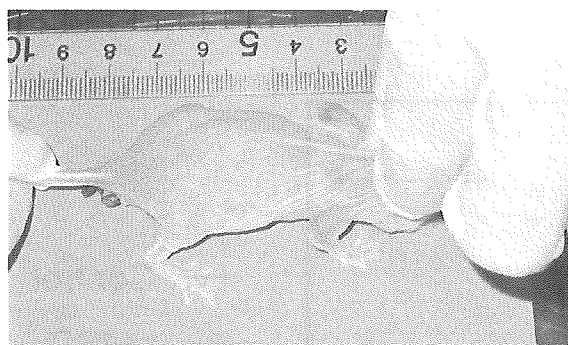
図3. ノードマウスの体重変化



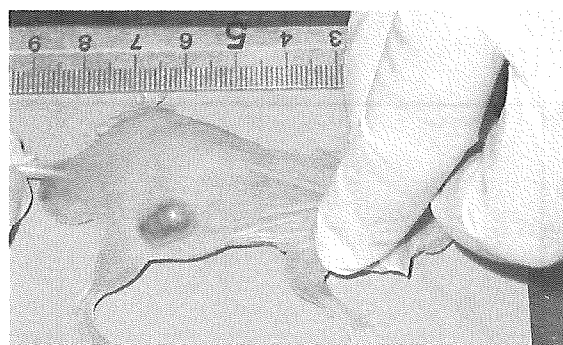
Control



hMSC

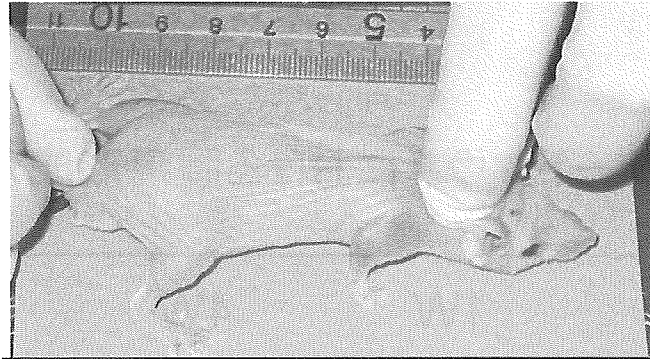


hMSC(MC)

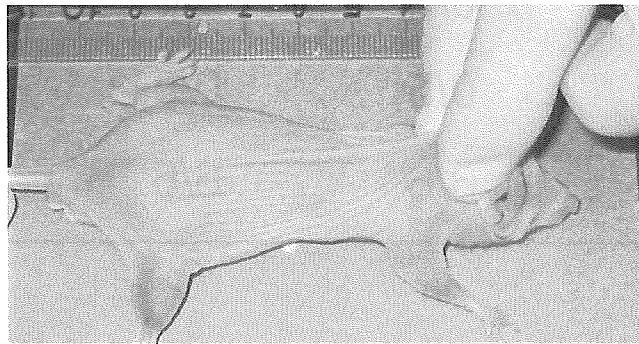


HeLa S3

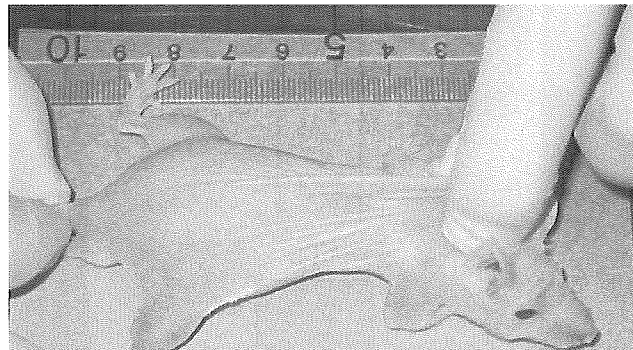
図4. 細胞移植1週間後のヌードマウスの様子



Control



hMSC



hMSC(MC)

図5. 細胞移植16週間後のヌードマウスの様子

表8. ノードマウスにおける腫瘍形成

groups	1W	4W	16W
Control	0/6	0/6	0/6
hMSC	0/5	0/5	0/5
hMSC(MC)	0/5	0/5	0/5
HeLa S3	6/6	6/6	

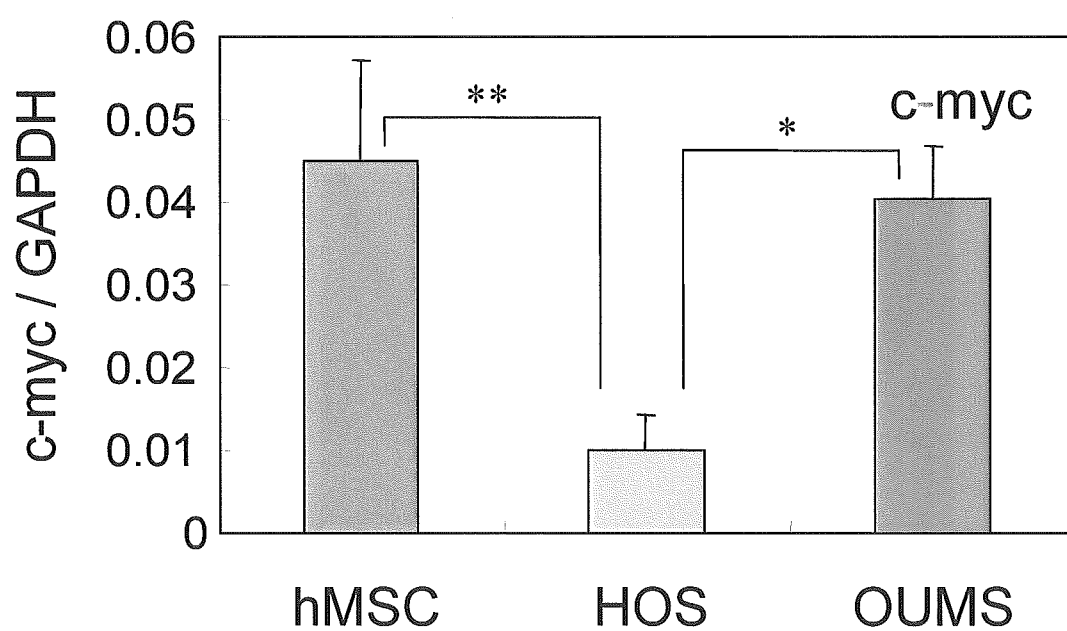


図6. hMSC, HOS, OUMS-27におけるc-myc mRNA発現