

200501130A

厚生労働科学研究研究費補助金

医薬品・医療機器レギュラトリーサイエンス総合研究事業

先端技術を活用した医療機器の評価に関する研究

平成 17 年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 岡野 光夫

平成 18 (2006) 年 4 月

目 次

I. 総括研究報告	1
先端技術を活用した医療機器の評価に関する研究	
岡野光夫	
II. 分担研究報告	6
1. 先端技術を活用した医療機器の評価に関する研究	
土屋利江	
III. 研究成果の刊行に関する一覧表	15
IV. 研究成果の刊行物・別刷	28

厚生労働科学研究研究費補助金
(医薬品・医療機器レギュラトリーサイエンス総合研究事業)
総括研究報告書

先端技術を活用した医療機器の評価に関する研究

主任研究者 岡野 光夫
東京女子医科大学先端生命医科学研究所所長・教授

研究要旨 近年、小規模ではあるがヒト臨床応用が開始されている細胞組織医療用具の有効性及び安全性の評価技術の確立を目指して、細胞組織医療用具に関する現状把握に関する調査研究、それらに対する評価に関する研究、細胞組織利用医療機器の承認申請マニュアルに関する研究、組織工学用材用の安全性研究をおこなった。特に今年度は生分解性高分子製足場が惹起する炎症反応に着目した実験研究に注力した。これらの成果は、有効性の高い細胞組織医療用具が安全に供給される体制の構築に貢献するものと考えられる。

A. 研究目的

(1) 細胞組織医療用具に関する現状把握に関する調査研究

小規模ではあるがヒト臨床応用が開始されている細胞組織医療用具の有効性及び安全性の評価技術の確立を目指して、細胞組織医療用具に関する現状把握に関する調査研究をおこなう。

(2) 有害事象の原因となりうる細胞組織医療用具特異的問題に関する実験研究

有害事象の原因となりうると思われる細胞組織医療用具特異的問題に関して実験的研究により、その可能

性を検討する。

B. 研究方法

(1) 細胞組織医療用具に関する現状把握に関する調査研究

PubMed (www.pubmed.gov)を用いた文献調査により、細胞組織医療用具(培養人工組織)のヒト臨床に関する報告を検索した。第2年度にあたる本年度では昨年以降、臨床報告が増加している重症心不全治療を目的とする細胞移植に集中して研究をおこなった。

(2) 有害事象の原因となりうる細胞組織医療用具特異的問題に関する実

験研究

現行の再生医療では、注射針を用いた細胞懸濁液移植や、生分解性高分子製足場上で細胞培養をした後に移植するといった技術が一般に検討されている。しかしこれらの方法では、移植後に生じる炎症反応の制御は不十分であり、移植した細胞の生着率の低下等の原因となっていると考えられる。本研究では、これらの方法を用いた際に生じる組織反応を小動物モデルを用いて、特に移植後早期に着目して検討した。

自己細胞移植のモデルと見なされている同系ラットであるLewis ラット (8W, ♂) を用いた。重症心不全に対する自己筋芽細胞移植を模倣することを考慮して、胸部大動脈より単離した血管平滑筋細胞を一度継代して、Lewis ラット (8W, ♂) への移植に供した。平滑筋細胞特異的抗原に対する免疫染色をおこなうことにより、移植された細胞を容易に追跡できる。すなわち、抗平滑筋特異的 α -アクチン抗体を一次抗体として免疫染色をおこなうと陽性に染色される部位を認め、移植された平滑筋細胞が組織に生着していることを確認した。

移植は、細胞懸濁液移植の場合は、背部皮下筋肉中へ注射した。生分解性高分子製足場を用いる場合には、背部皮下筋肉上に縫合により固定化した。

生分解性高分子製足場としては、これまで組織工学研究において用いられてきたバイクリルメッシュ (ポリグラクチン910、Johnson & Johnson社製) を用いた。バイクリルメッシュは、ポリグリコール酸ポリ乳酸の共重合

体であり、移植後6週間までごくわずかしか分解されず、60日から90日の間で完全に分解されることがメーカーより示されている。バイクリルメッシュは細胞接着性が著しく乏しいため、本実験では、プラズマ放電処理により、表面を親水性化してから培養に供した。この素材は、Atalaらが膀胱などの泌尿器領域の再生医療においてすでにヒト臨床に用いているものである。また、Advanced Tissue Science社が開発し、Smith & Nephew社より市販されている他家培養真皮 (Dermagraft) でも同じものが使われている。

C. 研究結果

(1) 細胞組織医療用具に関する現状把握に関する調査研究

2005年度中に刊行された重症心不全の治療を目的とした細胞移植のヒト臨床に関する論文は12報あり(表1)、昨年までの合計13報に比べ、大幅な増加傾向にあると言える。治療を受けた患者数は合計227名であり、昨年までの合計145名に比べ同様に大幅な増加傾向にある。2005年度に報告された12スタディのうち、対照群をおいているのは6スタディであった。前年度までの報告の大半で対照群が存在していなかったことを考えると、大きく前進していると結論できる。対象はすべてが虚血性心疾患であった。追跡期間は論文投稿時点で、52週から32ヶ月と大きくばらついていた。移植に供する細胞はすべて自己細胞であり、骨髄細胞、骨髄由来前駆細胞、筋芽細胞、骨髄および末梢血由来CD133陽性細胞、

CD34陽性単核球であった。

移植は、バルーンカテーテルを用いてステント挿入部位に注射、バイパス術時に注射の2つの方法が用いられていた。バイパス術はすべてオフポンプ術であった。

注目すべき重篤な副作用としては、自己筋芽細胞をバイパス術時に注射した症例で、被験者10名中、1名が7日後に死亡、2名が早期に頻脈を経験していた同様に、カテーテルにより自己骨髄前駆細胞を移植したスタディでも、被験者20名中、1名が心発作により死亡している。しかし多くの症例で新機能の改善が報告されていること、および異なる2つの細胞種で観察されていることから、これらの副作用は、移植に用いる注射針による侵襲が原因ではないかと推測される。今後、この問題については実証的研究により明らかにすべきである。

(2) 有害事象の原因となりうる細胞組織医療用具特異的問題に関する実験研究

細胞懸濁液移植では、移植された部位に、移植した細胞を検出できないサンプルが複数見られた。細胞懸濁液の注射時に移植した細胞が組織に生着することなく流れてしまったためではないかと考えられた。

対照実験としておこなった培地の筋肉内注射では目立った炎症反応が見られなかったが、細胞移植群では、移植にともなう皮下筋組織の線維化を認めた。すなわち、移植後3日目、5日目頃から線維化が観察され始め、20日目には移植部位の全域で顕著な線

維化が生じていた。

移植後1日目では、細胞を播種・培養したバイクリルメッシュは宿主組織に完全には生着しておらず、組織切除時に宿主組織より離脱した。また周囲の結合組織の肥大化が顕著に観察され、炎症細胞が多く観察された。すでに移植後1日目でも、アザン染色で青く染色される結合組織の形成が観察された。3日目に、バイクリルメッシュはようやく宿主組織へ生着していた。移植後3日目と5日目では、バイクリルメッシュは縫合した筋層側よりも、表皮側の結合組織でより強い線維化が起きていた。また、移植後5日後から内に少量の血管形成が認められ始めた。移植後20日目でバイクリルメッシュの軽度の分解が観察された。

D. 考察

(1) 細胞組織医療用具に関する現状把握に関する調査研究

重症心不全に対する自己細胞移植は、2005年に入り多くの成果が論文として報告されたが、様々な細胞が移植に用いられており、参加条件、評価方法にもそれぞれ違いがあり、またそれぞれの症例数が決して多くないため、それぞれの細胞種に限った場合、結論を導くことは容易ではない。今後、参加条件や評価方法を統一化したマルチセンタースタディが必要であると考えられる。

細胞ソースとしては、骨髄ないし末梢血から採取した細胞を培養することなく用いる場合、GMP準拠のCPC（セルプロセッシングセンター）が必要

なく、比較的容易に施行することができ、移植された細胞のキャラクタライズは十分でない場合がほとんどであった。この場合、同一の手技により採取・調整したとしても、個々の患者毎に骨髄や末梢血中の細胞の状態（頻度など）が異なると考えられる。この観点からの十分な実証的研究が必要であると思われる。また、これらの細胞を移植することにより心機能の改善のメカニズムが十分明らかでないことも大きな問題である。

細胞ソースとして自己骨格筋筋芽細胞を用いる場合、5グラム程度の筋肉の採取、筋芽細胞の単離・培養が必要となり、手技的には非常に煩雑になるといわざるをえない。培養に少なくとも2週間以上を要しており、患者の容態の変化を考えると、培養基間の短縮等、細胞調整のステップに関して検討すべき課題も少なくない。また、先の場合と同様に、骨格筋筋芽細胞を移植することによる心機能の改善のメカニズムが十分明らかでないことも大きな問題である。これらについても十分な実証的研究が必要である。

（2）有害事象の原因となりうる細胞組織医療用具特異的問題に関する実験研究

細胞の筋肉内注射に起因する筋肉内の線維化反応は、培地だけの筋肉内注射では観察されなかったことから、注射針による一過的な筋肉の切削だけでは生じず、損傷部位に細胞塊が留置されることによって生じることが明らかになった。このような異物反応と、上述の重症心不全患者への注射針

による細胞移植で生じた不整脈などの合併症との関係を今後明らかにする必要がある。

E. 結論

（1）細胞組織医療用具に関する現状把握に関する調査研究

昨年度までに比べ、重症心不全患者に対する自己細胞移植に関する論文報告は顕著に増加しており、この治療法が世界的に大きな注目を集めていることは明らかである。しかし、細胞調整法はいまだ十分確立しているとはいえないこと、また細胞移植による心不全の治療効果についてメカニズムが十分明らかでないなど、これらの問題を解決するための基礎的研究の充実が必要である。また、臨床結果の長期フォローアップはきわめて重要である。

（2）有害事象の原因となりうる細胞組織医療用具特異的問題に関する実験研究

注射針による移植の場合、対照群として用いた培地単独の移植では、線維が化が生じず、細胞塊の留置により線維化が生じるとの治験はきわめて重要である。この観点からは移植する細胞数は、無制限に多くあるべきではなく、可能な限り最少限に留めることが、副作用の予防において重要であることが示唆された。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) T. Umemoto, M. Yamato, K. Nishida, J. Yang, Y. Tano and T. Okano, "p57Kip2 is expressed in quiescent mouse bone marrow side population cells", *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **337**(1), 14-21 (2005).
- 2) T. Umemoto, M. Yamato, K. Nishida, C. Kohno, J. Yang, Y. Tano, T. Okano, "Rat limbal epithelial side population cells exhibit a distinct expression of stem cell markers that are lacking in side population cells from the central cornea", *FEBS Lett.*, **579**(29), 6569-6574(2005).
- 3) T. Umemoto, M. Yamato, K. Nishida, J. Yang, Y. Tano and T. Okano, "Limbal epithelial side-population cells have stem cell-like properties, including quiescent state", *Stem Cells*. **24**(1), 86-94(2006).

2. 学会発表

- 1) 第26回日本炎症・再生医学会
2005. 7. 12-13 東京
・梅本晃正, 大和雅之, 西田幸二,
 田野保雄, 岡野光夫, “角膜輪部
 上皮SP細胞の幹細胞様の性質と
 増殖能”, 炎症・再生, **25**(4),
 307(2005).
- 2) 第78回日本生化学会大会
2005.10.19-22 神戸
・梅本晃正.大和雅之. 西田幸二. 岡

野光夫. “Cdk inhibitors regulate quiescent state of limbal epithelial side population cells”, 生化学, **77**(8)125 (2005).

- 3) 第28回日分子生物学会 2005.12.7-10 福岡

・梅本晃正, 大和雅之, 西田幸二
 田野保雄, 岡野光夫, “CDK inhibit
 or による輪部上皮SP細胞の細胞周
 期の静止”, 日本分子生物学会年
 会 **733** (2005).

H. 知的財産権の出願・登録状況 なし

分担研究報告書

先端技術を活用した医療機器の評価に関する研究

分担研究者 土屋利江 国立医薬品食品衛生研究所 療品部

研究要旨：

（１）ヒトアストロサイトの増殖と遺伝子発現に及ぼす生分解性ポリマーと使用される触媒等による影響について

ポリ L 乳酸 (PLLA) は頭蓋の再生移植手術に用いられる。しかしながら、有機スズが、ポリ L 乳酸の合成の触媒として用いられることが知られており、ヒトアストロサイト (NHA) におけるポリ L 乳酸と有機スズ等の安全性を評価した。3 タイプの PLLA の効果を分析するため、ヒトアストロサイトを様々の濃度の PLLA3000 (分子量: 3000)、PLLA5000 (分子量: 5000)、PLLA11000 (分子量: 11000) の存在下で 1 週間培養し、MTT アッセイを用いて、ヒトアストロサイトの増殖度を測定した結果、PLLA5000、50 μ g/ml の濃度ではヒトアストロサイトの増殖は、コントロールの 73% で、PLLA3000、50 μ g/ml の濃度では約 4%、PLLA11000、50 μ g/ml の濃度では 0% であった。次に、ポリ L 乳酸のモノマーである乳酸 (LA) では、ヒトアストロサイトの増殖には 50 μ g/ml の濃度までは、影響は認められなかった。アストロサイトは、ニューロン (神経細胞)、オリゴデンドロサイト、アストロサイト (星状細胞) に分化する、神経幹細胞の能力を有すると示唆されてきた。よって、神経幹細胞の能力を有するヒトアストロサイトの分化における、PLLA5000 の効果を分析した。我々は、ヒトアストロサイトを各種 PLLA 濃度とともに 1 週間培養し、リアルタイム RT-PCR によって神経細胞に特異的なマーカーを検出した。神経前駆体細胞に特異的な遺伝子であるネスチンの発現は、濃度依存的に減少し、50 μ g/ml の濃度では、コントロールの 36% であった。一方、ニューロン (神経細胞) に特異的な遺伝子である Nurr-1 と Id-3 の発現、そしてアストロサイトに特異的な遺伝子である GFAP の発現は、コントロールの発現とほぼ同じだった。次に、ヒトアストロサイトの増殖における、ジブチルチン (DBT)、トリブチルチン (TBT) またはチタンテトラブトキシモノマー (TTBM) の効果を分析した。DBT、TBT または TTBM はヒトアストロサイトの増殖を抑制した。DBT は、15000pg/ml 以上の濃度でヒトアストロサイト増殖を抑制し、一方 TBT と TTBM は、ヒトアストロサイト増殖をそれぞれ 160pg/ml、40pg/ml 以上の濃度で抑制した。全ての PLLA、DBT、TBT、と TTBM はヒトアストロサイトの機能を抑制した。これらの結果は、PLLA、有機スズと TTBM は、ヒトアストロサイトの増殖と再分化能力を減少させることを示唆している。

（２）ヒト軟骨細胞の増殖と分化に及ぼすスズ含、不含ポリグリコール酸による影響について

グリコール酸の重合体である (ポリグリコール酸) (PGA) は、生分解ポリマーとして、整形外科の治療 (整形患者の治療) にも幅広く用いられてきた。有機スズ、鉛、アンチモン、亜鉛は、PGA 合成触媒として一般的に用いられてきた。この研究において、我々は、無機スズを触媒として用いて合成した PGA、および触媒として用いないで合成した PGA の安全性を、ヒト軟骨細胞のマイクロマス培養システムで評価した。Sn(II) を触媒として用いて合成した PGA と培養した際に、軟骨細胞の増殖の著しい増加と、コラーゲンタイプ II 遺伝子発現の著しい増加が観察された。しかしなが

ら、アグリカン遺伝子の発現は、コントロール培養とほぼ同じだった。また、コラーゲンタイプ II タンパク量は、PGA(Sn)群において増加した。対照的に、触媒なしで合成された PGA は、軟骨細胞の軟骨への分化を包括的に阻害した。PGA(Sn)の *in vitro* の結果のみは、優れているが、臨床応用においては、生体内での複数の細胞組織との相互作用があり、*in vitro* 系での特定の細胞での判定結果は、*in vivo* での多様な細胞集団での結果と相関性がないことが知られており。生分解性材料の安全性には慎重な検証が必要である。

A. 研究目的

(1) ヒトアストロサイトの増殖と遺伝子発現に及ぼす生分解性ポリマーと使用される触媒等による影響について

脳及び神経の手術は急速に進歩しており、また、移植技術も同様に、進歩している。しかしながら、移植に用いられるマテリアルの安全性については十分に理解されてはいない。脳と神経細胞の増殖と分化における、埋植マテリアルの効果と安全性について、研究する必要がある。

神経幹細胞は自己増殖が可能であり、central nervous system(CNS)においてアストロサイト、オリゴデンドロサイトとニューロン（神経細胞）への分化が可能である。CNSにおける神経細胞発生及び膠神経発生の正確なメカニズムは、完全には解明されていない。終脳の神経上皮細胞は、アストロサイトやオリゴデンドロサイトを含む、神経および膠系統（neuronal and glial lineages）に分化する神経前駆体細胞を含んでいる。発達中の脳における神経前駆体細胞の分化の方向性は、内在性の細胞プログラムとサイトカインや生体マテリアルの移植を含めた、外部の刺激等によって決まると考えられている。Doetsch らは、通常の脳、及び再生中の脳においても脳質下帯（SVZ）のアストロサイトは、神経幹細胞として活動することを明らかにした。長きにわたり、脳は再生不可能だとみなされていたが、近年のCNSにおける幹細胞個体群の発見が、強い関心を引き起こしている。central nervous system(CNS)による再生のために、神経幹細胞は、再生治療の潜在的な可能性を持つことが明らかにされた。

神経幹細胞は、生体内で脊髄に内発的に存在し、

傷に反応して増殖し、また新生細胞の多くはグリア線維性酸性蛋白(GFAP)陽性のアストロサイトである。さらに、成長した海馬由来神経幹細胞は、成人の脳、小脳や線状等の領域に移植された際、主に膠細胞に分化することが報告されてきた。

生分解性ポリマーは、分解されて新しい組織が形成されるため、スキャホールド（足場材料）の有望な候補である。これらのスキャホールド（足場）は、いろいろな組織形成の研究で、大きな成果を示したが、ヒトの臨床と動物の研究において、異物反応、炎症、腫瘍形成等の有害な結果が報告された。スキャホールド（足場材料）の原理の理解は不十分であり、さらに、神経組織における効果と安全性は未知である。生分解性ポリマーであるポリ-L-乳酸（PLLA）は、臨床手術の場で多く用いられている。我々はこれまでに、PLLA は胎児ラットの中脳神経前駆細胞の増殖と分化を抑制していることを報告した。

トリブチルチン、ジブチルチンのような有機すずは、NHAs に有毒であることが報告されてきた。触媒として PLLA 合成に使用され、PLLA から放出される各種有機すずの神経毒性については、明らかになっていない。

本研究において、ヒトアストロサイト（NHAs）の増殖と分化における、3種の PLLA とジブチルチン（DBT）、トリブチルチン（TBT）、チタンテトラブトキシモノマー（TTBM）の影響を検証する。

(2) ヒト軟骨細胞の増殖と分化に及ぼすスズ含、不含ポリグリコール酸による影響について

特殊な合成物質である生分解可能なポリマーは、生物工学、繊維工学の分野で重要性が認識されている。近年、コラーゲン、アルギン酸塩、フィブリン、ゼラチンといったような、多種類の天然の生体吸収性ポリマーの可能性を評価する研究が数多く行われているが、合成される生分解性ポリマーは一般的に天然素材以上に利点を示す。主要な利点とは、様々な用途に適合するように、力学的特性や分解性を変える性質である。合成ポリマーの中では、ポリエステルが臨床に多く用いられる。ポリエステルはまた、組織工学、特に骨組織工学の分野における開発に用いられている。

医療応用における生分解性ポリマーとしてのPGA（脂肪ポリエステルのうちの1つ）の魅力は、その分解生産物であるグリコール酸が、天然の代謝物質であるということである。複数の研究によって、グリコール酸共重合体が、ラットモデルにおいて神経の再生を促進していることが明らかにされてきたが、また、PGAで作られた人工神経コンポジットにより、80mm 神経ギャップの再生が報告されている。PGAは異なった触媒を使用して合成することができる。よく用いられる触媒としては、有機スズ、鉛、アンチモン、亜鉛がある。現在の水生の生態系においては有機、無機スズの合成物は有毒性であり、また動物に行動上の異常を引き起こさせる。有機スズの化合物は、人間や他の哺乳類の細胞において生体内および生体外で、神経毒性、細胞毒性、免疫毒性、遺伝毒性の影響を及ぼすことが知られている。また有機スズの化合物は、正常ヒトB細胞の生体外における生存率、増殖、分化の減少を引き起こすという現象も報告されている。ラットにおける無機スズの投与効果は、骨において、無機スズの毒性が深刻な影響を与えることを示唆し、不相応に小さくなっている症候群（それは躯幹でなく四肢に影響を及ぼす）は、特定のスズの合成物を注射されたネズミにおいて見られた。無機スズ触媒を用いて合成されたか、無機スズ触媒を用いないで合成されたかにかかわらず、PGA合成物が軟骨へ分化させる効果を有するという研究報告は、我々の知る限りにおいてない。本研究は、マイクロマス培養システムにおいてヒト関

節軟骨細胞を用いて、無機スズ触媒を含む、あるいは含まないPGAの生物学的適合性を解析したものである。

B.研究方法

(1) ヒトアストロサイトの増殖と遺伝子発現に及ぼす生分解性ポリマーと使用される触媒等による影響について

細胞培養

我々は正常ヒトアストロサイト (NHAs) を用いた。(Cambrex Bio Science, Walkersville, MD). NHAs は RT-PCR 分析のために 12 - well プレートに RT-PCR 分析のために 2×10^4 の濃度で播種し、MTT分析のために 4 - well プレートに 1×10^4 の濃度で播種し、AMB 培地 (Cambrex Bio Science, Walkersville, MD) には 5%FCS、ヒト組み換え型の EGF を添加し、摂氏 37 度 95%の空気 (5%の二酸化炭素を含む) で加湿した。

材料

ジブチルチン (DBT)、トリブチルチン (TBT) とチタンテトラブトキシモノマー (TTBM) は和光株式会社 (東京、日本) より購入した。PLLA3,000、PLLA5,000、PLLA11,000 はナカライテスク株式会社および多木化学より購入した。PLLA3,000 は触媒なしに合成し、PLLA5,000 は、モノブチルチン (MBT) または DBT を含有していた。PLLA11,000 は Sn(II)Cl₂ を触媒に用いてテラーメードで合成されたものを使用した。

PLLA 調製法

PLLA 溶液は、ジメチルスルフォキシド (DMSO) を使用して最終濃度が 0.1%DMSO になるように調製した。この濃度は NHAs の増殖、再分化に影響しない。コントロール培養は、0.1%DMSO で培養された。乳酸と塩化スズの溶液は、ABM 培地から直接作成した。

スズ化合物の調製

スズ化合物の溶液は、ジメチルスルフォキシド (DMSO) を使用して最終濃度が 0.1%DMSO になるように調製した。コントロール培養は、0.1% DMSO で培養された。

チタンテトラブトキシモノマー調製法

チタンテトラブトキシモノマー (TTBM) 溶液はジメチルスルフォキシド (DMSO) を使用して最終濃度が 0.1%DMSO になるように調製した。コントロール培養は、0.1%DMSO によって培養された。

MTT 定量による細胞数決定

細胞を PLLA 存在下で 1 週間培養し、MTT 法によって NHAs の生存率を決定する。具体的には、TertraColor ONE(生化学工業、東京、日本)を使用して、細胞数の変化を測った。この定量は、トルチウム-チミジン吸収に代わる、非放射性のものである。このシステムは、生きている細胞のミトコンドリアによる、テトラゾリウム塩合成物の、可溶性 formazan 産生への変換を測定する。24 well プレートの NHAs は上述したように培養された。1 週間、培地または PLLA とともに培養した後、培地は 6 μ l の TetraColor ONE 試薬を含む 300 μ l の新鮮な培地に交換され、2 時間後、サンプルをマイクロプレートリーダーで測定した。

リアルタイム RT-PCR 法による神経細胞特異的マーカーの検出

RNA 量は、NHAs を用いて緩和したグアニジン酸チオシニン酸-フェノールクロロホルム法によって調製した。Rnase-free Dnase (Boehringer Mannheim, Mannheim, Germany) によって処理された totalRNA は、オリゴ g(T)ポリマー (東洋紡、東京、日本) を用いて反転写され、R Nase H 処理に続いて摂氏 42 度でスーパースクリプト II 反転写酵素に 30 分間さらされた。1/20 量の cDNA は Lightcycler システムの PCR 分析のためにテンプレートとして用いられた。1 μ l の R T 反応液、2 μ l の Lightcycler Fast Start Reaction Mix SYBR Green 1 (Roche, Mannheim, Germany), 0.5 M/liter の各プライマーと 3mmol/liter の塩化マグネシウムを含む総量 20 μ l の混合液で PCR 増幅を行った。PCR プログラムは 94°C 8 秒、65°C 5 秒、72°C 10 秒のサイクルを 40 サイクルで構成されている。Nurr-1 増幅のためのプライマーは AGGAGGAGATTGGACAGGACAGG-3' と 5'-

AGTGGTGGCAGTGATTT-3' であり、GFAP 増幅のためのプライマーは

5'-TCCGCTGCTCGCCGCTCCTAC-3' と

5'-CATCTCTCTGCCCCGCTCACTGG-3' であり、

Id-3 増幅のためのプライマーは

5'-TCGCCCTGCCCACTTGACTTC-3' と

5'-TTCCACACACCTCGCCCGCCGCTCCTAC-3' は

であり、ネスチン増幅のためのプライマーは、

5'-GAGATCAGAGCCCAGGATGTGA-3' と

5'-CTGAGGGGTGGTGCCAAGGAG-3' である。

5'-ACCACAGTCCATGCCATCACAC-3' と

5'-GAGATCAGAGCCCAGGATGCT-3' は GAPDH

の増幅に用いられた。RNA 調製法と PCR は 3 点測定で行われた。

統計学的分析

Fisher の PLSD は、PLLA 濃度と神経細胞特異的マーカー mRNA の相対発現レベルを比較するために用いられた。

(2) ヒト軟骨細胞の増殖と分化に及ぼすスズ含、不含ポリグリコール酸による影響について 細胞増殖のための媒体及びポリマー

軟骨細胞増殖培地は、Bio Whikkaker 社から購入した。無機スズ(II)[PGA(Sn)](Mw=1,500)を使用して合成した PGA と、触媒なしで合成した PGA (Mw=1,100) は、オーダーメイド (多木化学、加古川、日本) であり、ジメチルスルフォキシド (DMSO) に溶解して使用した。(Sigma Chemical 社、St. Louis, MO, USA)。

細胞と増殖方法

膝関節部分のヒト関節軟骨細胞 (HAC) は、Bio Whittaker 社から購入した。高密度マイクロマス培養は、Coster 24-well 組織培養マイクロプレート (Costar type 3526, Corning 社) に、 4×10^5 個の細胞を培地 20 μ l の容積でスポットして培養した。2 時間後、37°C で CO₂ インキュベーターに、取り付けて、培養培地 (1ml/well) を各ウェル (well) に加えた。DMSO (0.8 μ l/ml)、PGA と PGA (Sn) (50 μ g/ml) を培地に添加した。DMSO と培養したヒト関節軟骨細胞は、コントロールとして用いら

れた。培養は 4 週間継続され、1 週間に 2 回培地を交換した。

細胞増殖研究

細胞増殖はクリスタルバイオレット染色法（和光純薬、大阪、日本）によって定量的に行われた。培養後、細胞は 100%メタノールによって室温で固定された後に、0.1%クリスタルバイオレットの加えられたメタノールによって染色された。適度に洗浄した後、細胞は再びメタノールにさらされ、各ウェルから 100 μ l が新たに 96 穴プレートに移され、ELISAreader(Bio-Tek 社、Winooski, VT, USA)を使用して、波長 590nm で吸光度を測定した。ブランク値は、バックグラウンド値を除去するために、培地のみを実験に使用した well での値から得た。

分化測定

細胞分化アッセイは、アリシアンブルー染色法によって行われた。細胞は、pH1.0 3% acetic acid の 1% (v/v) アリシアンブルー染色液で染色した。軟骨のプロテオグリカンは 4M グアニジン溶液で抽出し、結合した色素を microplate reader(Bio-Tek 社、Winooski, VT, USA)を使用して、波長 600nm で測定した。新しい 4M グアニジン溶液をブランクとした。

市販されているアッセイキット（コラーゲンとグリコサミノグリカン [GAG] アッセイキット、Bicolor 社、Newtownabbey, Northern Ireland）は培養した細胞のコラーゲンと硫酸化 GAGs を測定するのに用いる。

GAG アッセイのために、4 M グアニジン-HCl、0.5M ナトリウム酢酸塩 pH6、と 1mM benzimidazole-HCl、1mM フェニルメチルスルホニル（PMSF）、1mM N-ethylmaleimide(NEM)を溶剤として用いて、GAG を培養した細胞から抽出した。インキュベーション（定温培養）は摂氏 4 度の状態で、しんとう器で 12—20 時間行った。抽出後、サンプルは遠心分離機にかけられ、上清を、blyscan 色素試薬(有機緩衝剤に 1.9-ジメチルメチレンブルーを溶解させたもの)と混合した。GAG-色素複合体は遠心沈

殿法によって集められた。ペレットと結合した色素は、次に分離反応物とともに混ぜられ、溶解された。サンプルの吸光度は、紫外線分光光度器を用いて波長 656nm で測定された。

培養された軟骨細胞の総コラーゲン量（酸溶解性およびペプシン溶解性画分）も測定された。酸溶解性のコラーゲンは、培養細胞に 0.5M 酢酸を加えることで除去され、遠心沈殿法にかけられた。残ったペプシン溶解性コラーゲンは、続いて培養細胞から抽出された。ペプシン溶解液（1mg/10mg 組織サンプル 10mg 中に 1mg、シグマ）を細胞に加え、摂氏 37 度で一晩インキュベーションされた。酸溶解性およびペプシン溶解性の両者のコラーゲンサンプルは 30 分しんとう器にかけられ可溶性色素試薬と混合して、アッセイのために分離された、そして、コラーゲン-色素複合体は、遠心分離されて回収された。コラーゲンのペレットと結合した色素は、アルカリ試薬を用いて可溶化され、サンプルの吸光度を、紫外線分光光度器を用いて波長 540nm で測定した。この実験用の標準曲線を使用して、酸溶解性タイプ I コラーゲン量を測定した。リアルタイムポリメラーゼ連鎖反応（PCR）

コラーゲンタイプ II とアグリカンを検出するために、First-Strand cDNA キット (Amersham Pharmacia Biotech, Uppsala, スウェーデン) を使用して、逆転写反応を行い、1 μ g の totalRNA から、第一標準 cDNA を合成した。その後、LightCyclerFastStartDNA SYBR Green1 (Roche Diagnostics, Penzberg, ドイツ) を使用して LightCycler システムを用いてリアルタイム PCR を行った。LightCyber™-Rrimer セット (Roche Diagnostics) を、コラーゲンタイプ II とアグリカン遺伝子の定量的検出に用い、またハウスキーピング遺伝子 (housekeeping gene)、グリセルアルデヒド 3-リン酸デヒドロゲナーゼ (GAPDH) 量を定量化した。初期変性段階は摂氏 95 度を 10 分間で、続いて増幅、拡大段階として 35 サイクル (摂氏 95 度を 10 秒、摂氏 68 度を 10 秒、72 度を 16 秒)、最終増幅段階として、58 度を 10 秒であった。データの定量化は、LightCyber 分析ソフトウェアで

行った。

統計上の研究

ポリマーで処理した細胞とコントロールサンプルの間に、統計学的な有意差があるかどうかを検証するために Student t テストを用いた。グループの比較手段として、分析変動の one-way 分析法を行った。有意差が見いだされた際には、ペアをなす Tukey 's pairwise 比較を用いて、違いの性質を解析した。統計上の有意性は $p < 0.05$ で認められた。値は図 3 以外、 $\text{mean} \pm \text{SD}$ (標準偏差) である。各ケースで、4 サンプルを分析した。全ての実験は少なくとも 2 回繰り返され、似通った結果を得ることができた。

C. 研究結果

(1) ヒトアストロサイトの増殖と遺伝子発現に及ぼす生分解性ポリマーと使用される触媒等による影響について

PLLA の細胞増殖への影響

我々は、PLLA3,000、PLLA5,000、PLLA11,000 の三種の PLLA を用いた。PLLA3,000 (PLLA、Mw3,000) は触媒なしに合成した。PLLA5,000 (PLLA、Mw5,000) は有機すずの触媒を用いて合成した。PLLA5,000 からは MBT と DBT が抽出された。PLLA11,000 (PLLA、Mw11,000) は 590ppm のスズを含む塩化スズを触媒として合成した。NHAs における PLLA の細胞毒性を検出するため、我々は PLLA の、NHAs 増殖における影響を分析した。1 週間 PLLA とともに培養した後、MTT 分析によって NHAs の数を決定した。細胞数は、PLLAs の濃度に依存して減少した。NHAs は各 PLLA3,000、PLLA5,000、PLLA11,000 に $50 \mu\text{g/ml}$ の濃度で培養した場合、各々、コントロールの細胞数の 3.4%、73%、0%の結果となった (図 1A-C)。

細胞増殖における乳酸の影響

乳酸 (LA) は、PLLA の構成要素であるモノマーであるが、PLLA は、培地の中で加水分解する。LA モノマーが毒性であるか否かを決定するため、我々は MTT 分析によって NHAs 増殖における乳

酸の効果を検証したが、NHAs の増殖には影響がないことが明らかになった (図 2)。

PLLA の神経の特異的マーカー発現に対する影響

アストロサイトは、ニューロン、オリゴデンドロサイト、アストロサイト自体に分化する神経幹細胞の活性を有するということが示唆されてきた。

ゆえに、NHAs は、NHAs 固有の特異的遺伝子、神経細胞特異的マーカーを発現する。神経先駆細胞は、クラス IV の中間繊維タンパク質であるネスチンを発現する。分化したニューロンは、転写因子 Nurr-1 の発現と、転写阻止因子 Id-3 を発現する。アストロサイトは膠単繊維酸化タンパク質である GFAP を発現する。この分化における PLLA の効果を分析するため、我々はリアルタイム RT-PCR 分析を行った。NHAs の増殖における PLLA の影響の分析は、PLLA5,000 が他の PLLA よりも少ない細胞毒性を持つことを示したことから、我々は、神経幹細胞活性を有する NHAs の分化における、PLLA5,000 の影響を分析した。1 週間 PLLA5,000 とともに培養した後、我々は神経細胞特異的マーカーの遺伝子出現を決定した。神経先駆細胞マーカーであるネスチンの発現は、PLLA5,000 の投与量に依存して減少する。 $50 \mu\text{g/ml}$ の PLLA5,000 で培養した NHAs におけるネスチンの発現は、コントロールの約 36%であり、PLLA5,000 は神経先駆細胞を減少させることが示唆された。(図 3)。本研究の分析において検証された、他の遺伝子の発現は、コントロールとほぼ同じであることを示し (図 4、5)、PLLA5,000 はアストロサイトへの分化にもニューロンへの分化にもつながらないことを示唆した。

細胞増殖におけるスズ化合物の影響

またそれは、PLLA 合成に触媒として用いられる有機すずが、神経細胞に損傷を与え、結果として細胞死を誘導することを示唆する。基本的に、PLLA は DBT のような有機すずを用いて合成される、しかしながら、PLLA は、塩化スズのような無機すずや、TTBM を使用しても合成できる。様々な有機すずは、アストロサイトに毒性である

ことが報告されてきた。DBT は PLLA5,000 から抽出されたものであるゆえ（データは示していないが）、本研究では、我々は NHAs の増殖における DBT、TBT の影響を分析した。加えて、PLLA はチタンテトラブトキシドモノマーを触媒として使用して合成することができるので、我々は NHAs 増殖におけるチタンテトラブトキシドモノマーの影響を分析した。DBT、TBT、TTBM とともに 1 週間、培養した後、我々は MTT 分析によって NHAs の細胞数を検出した。NHAs は濃度 1,500 pg/ml 以下で DBT と培養した場合は、細胞数はコントロールとほぼ同じであるが、15,000 pg/ml 以上では濃度依存的に減少する（図 6）。

TBT と培養した後の NHA の数は、16pg/ml 以下の濃度ではコントロールとほぼ同じであるが、160pg/ml を超えると劇的に減少した（図 7）。

TTBM と共に培養された NHAs の細胞数は、4pg/ml 以下の濃度では、コントロール群とほぼ同じであるが、40pg/ml の濃度をを超えると濃度依存的に減少した（図 8）。これらの結果は、DBT の細胞毒性が、TBT と TTBM の細胞毒性より少ないことを示している。しかし、DBT は、15ng/ml で通常の分析では、Sn の検出限界以下の低濃度で細胞毒性を示すことが明らかになった。

(2) ヒト軟骨細胞の増殖と分化に及ぼすスズ含、不含ポリグリコール酸による影響について 細胞の増殖

軟骨細胞の増加はクリスタルバイオレット染色法により定量化され、平均コントロール値のパーセンテージによって表した（図 9）PGA(Sn)処理されて培養された細胞の増加は、コントロール培養と比較して、1.8 倍 ($p < 0.05$) 増加したのに対して、PGA 処理された細胞の増加は、DMSO 処理されたコントロール培養とほぼ同じであった。

細胞の分化

軟骨細胞の分化は、アルシアンブルー染色によって評価され、その量は、平均コントロール値のパーセンテージとして表した。PGA 処理された軟骨細胞は、コントロール群での培養と比較して細

胞の分化が 0.76 倍 ($p < 0.01$) に減少した。同時に、PGA(Sn) 処理された細胞は細胞分化においてごくわずかの減少を見せた（図 10）。

細胞外マトリクス遺伝子の発現

細胞外マトリクスの遺伝子の発現は、リアルタイム PCR によって定量測定した。コントロール培養と比較すると、コラーゲンタイプ II 遺伝子は、PGA(Sn)処理された軟骨細胞において、PGA 処理培養された軟骨細胞よりも強く発現した ($p < 0.01$) [図 11 (A)]。アグリカン遺伝子の発現は後者において抑制されたが、前者とコントロール培養の間に全く違いは見られなかった。[図 11(B)]

コラーゲンタイプ II タンパク質の測定

ペプシン溶解性であり、軟骨特異的であるコラーゲンタイプ II プロテインの量は、コントロール培養と比較して、PGA 処理された軟骨細胞および PGA(Sn)処理された軟骨細胞の両者において、増加が確認された（図 4）。しかしながら、このコラーゲンタイプ II プロテインの量増加は、後者のケースよりも前者の方が顕著である。

総コラーゲン量の測定

酸溶解性コラーゲン、ペプシン溶解性コラーゲン両者の総量は、コントロール培養と比較すると PGA(Sn)処理された軟骨細胞で減少していた。同時に、コントロールサンプルと比べて、PGA 処理された軟骨細胞の総コラーゲン量は若干の増加が見られた。

硫酸塩グリコサミノグリカン濃度の評価

硫酸化 GAG の量は、コントロール軟骨細胞より PGA(Sn)処理された軟骨細胞において、減少が見られた。しかしながら、同じ実験において、PGA 処理された軟骨細胞とコントロール軟骨細胞の間に、ほとんど量の違いは現れなかった。

D. 考察

(1) ヒトアストロサイトの増殖と遺伝子発現に及ぼす生分解性ポリマーと使用される触媒等による影響について

現在、生分解性ポリマー PLLA はヒトに移植する物質として用いられているが、PLLA の効果と

安全性については明確ではない。我々の先行研究において、PLLA は、胎児ラットの中脳神経先駆細胞の、細胞の成長と分化を抑制することを示唆し、PLLA は多くのヒト神経細胞にも毒性があるということを提唱してきた。ゆえに、我々は NHAs におけるいくつかの PLLA タイプの影響と安全性について分析した。

50 μ g/ml の PLLA 5,000 とともに培養した場合は、NHAs の細胞数がコントロールの 73%であったが、一方では、同条件で PLLA3,000 または PLLA11,000 存在下の NHAs の細胞数は著しく減少した。PLLA3,000 は触媒なしで合成したが、PLLA11,000 は塩化スズを触媒として合成した。モノマー LA とともに培養した場合、NHAs の細胞数に影響はなかった。これらの結果は、NHAs における PLLA の影響には、分解された LA モノマーは、関係していないことを示し、また PLLA 自体、あるいは分解された LAオリゴマーは NHAs に毒性があることを示している。NHAs 増殖における PLLA の影響の視点から、PLLA の分子量と構造が PLLA の安全性を決める重要な要素であると言えるのではないだろうか。

ラム(Lam)と彼の分担研究者は、分解前の PLLA (P-PLLA; 25 kGy gamma-irradiation) が、細胞損傷、細胞死、大量の P-PLLA 分子の食菌(捕食?)作用による細胞の溶解、の徴候を引き起こすことを証明した。PLLA のオリゴマーは NHAs の増殖と成長に影響を及ぼした。(図 1)。

NHAs を PLLA5,000 と培養した時、ネスチン発現だけが減少した。それは PLLA5,000 が神経先駆細胞の個体数を、特に減少させることを示している。50 μ g/ml の PLLA5,000 で培養された NHAs の細胞数はコントロールの 73%である一方、神経先駆細胞におけるネスチンの発現はコントロールの 36%であり、神経先駆細胞が、特に減少することを示している。神経先駆細胞の減少には二つの理由が可能性として考えられる。(1) PLLA5,000 はグリア細胞の分化を誘導する。中島(Nakashima)らは、グリア細胞への分化はネスチンを発現する細胞数と、ニューロンマーカーで

ある微小管に連結した蛋白質 2 (MAP2) を発現する細胞数を劇的に減少させることを報告している。アストロサイト特異的マーカーである GFAP の発現は、コントロールより増えない。よって、PLLA5,000 はオリゴデンドロサイトの分化を誘発するのかもしれない。

(2) 神経先駆細胞が特に PLLA5,000 を貪食する時、神経先駆細胞はプログラム細胞死、すなわちアポトーシスに陥るか、神経先駆細胞に分化する能力を失う。ラムらは、多量の PLLA 分子の貪食が、細胞損傷、細胞死、溶解の徴候をひき起こすことを証明した。PLLA の貪食作用は NHAs の増殖や発達に影響を及ぼす。PLLA への接触が神経前駆細胞の数を減少させるならばニューロン、オリゴデンドロサイト、アストロサイトの再生は減少する。

DBT、TBT と TTBM は、PLLA より低い濃度で、多くの NHAs を減少させた。DBT の細胞毒性は TBT や TTBM の毒性より低い。ブチル基のグループ数が、DBT と TBT の毒性が異なる原因であることを示唆される。

TBT は、酸化のストレスによってアストロサイトにおいて形態的変化を誘導する。しかし、フリーラジカルスカベンジャーまたは酸化防止剤は、TBT が誘導する細胞損傷を止める。それは、TBT がアストロサイト内、またはその付近で酸化ストレスを生み出していることを指している。酸化のストレスが細胞死の主要な原因の一つであることを考慮すると、DBT もまた、NHAs に対して酸化ストレスを生み出している可能性がある。TBT もポスフィリラーゼ C、MAPKK、チロシンホスファターゼの活性化を促し、細胞内カルシウム濃度を上昇させる、これは、DBT もまた同様の活動を誘発していることを示唆している。これらの活動は DBT と TBT の引き起こす細胞死の鍵となる重要な因子であると推測される。

有機すずは NHAs の増殖に強い毒性を示した。DBT は PLLA5,000 から抽出され、その濃度は 1.5ppm 以下である(データは示していない)。この結果は、10 μ g/ml、20 μ g/ml、50 μ g/ml の

PLLA5,000 は各々、15pg/ml、30pg/ml、75pg/ml 以下の DBT 濃度を含み、この濃度は毒性以下のレベルであることを示している (図 6,)。ゆえに、PLLA に含まれる DBT は NHAs の増殖に毒性を示すのではなく、PLLA5,000 そのものが NHAs の増殖に毒性を示すのである。この結果は PLLA に含まれる有機すずが、in vitro の試験で十分に毒性以下のレベルであるというだけでなく、PLLA 自体も、NHAs に対して安全なマテリアルとして合成すべきであることを示している。NHAs に対する PLLA の毒性を防止するには、移植される PLLA に含有される DBT 濃度が 1,500pg/ml 以下であることである。微量の有機すずは NHAs に影響を及ぼさないが、埋植される有機すずの総量が 0,5 μ g/ml 以上になると 0,5 μ g の 10000 倍以上のオルガノチンは有毒である。ゆえに、移植における有機すずの細胞毒性を避けるため、我々は有機すずの影響を十分に見定め、十分に安全な有機すず濃度を基準として設けねばならない。更なるこのような毒性のメカニズムに関する研究が、安全な生分解性ポリマーの開発に必要である

(2) ヒト軟骨細胞の増殖と分化に及ぼすスズ含、不含ポリグリコール酸による影響について

完全な生物学的適合性ポリマーおよび生分解性ポリマーを見出すための実験が過去 10 年間に渡って行われてきた。理想的な生物素材は、その目的を満たすものであり、異物反応のあらゆるリスクを除去するために生分解される。合成物質である生分解性ポリマーは、ポリエステル族に属するのは特に、組織工学において重要な役割を担う。脂肪質ポリエステルである PGA、は二つの方法で分解することができる、一方は加水分解によるもので、他方は非特異性エステラーゼとカルボキシペプチダーゼによるもので、続いて、この二つは尿によって排出されるか、トリカルボキシル酸回路に入る。

有機スズ、アンチモン、亜鉛、鉛は PGA の高分子重合プロセスに触媒として用いられる。異なるスズ化合物は、ラットの関節軟骨細胞の単層培

養において細胞毒性を示し、無機スズはラットの骨に深刻な毒性を触発することが明らかになった。ゆえに、本研究において、我々は将来の臨床応用のための生物学的適合性を明らかにすることを目的として、無機スズ触媒を使用して合成した PGA と、使用しないで合成した PGA で処理されたヒト関節軟骨細胞の軟骨分化への効果を評価することを望む。

特定のスズ化合物の特定の濃度の経口投与が、ラットの軟骨増殖に効果があることが報告されている。この結果と一致して、本研究においても増殖アッセイの結果、マイクロマス培養において PGA(Sn)処理が、ヒト関節軟骨細胞の増殖に効果があることが証明された (図 9)。その一方で、PGA は軟骨細胞の増殖を刺激することもなく、阻害することもなく、よって無機スズは触媒としてヒト関節軟骨細胞の増殖に刺激を与えることが見出された。我々の実験において、無機スズを触媒として合成した PGA は、細胞分化においてほとんど変化をもたらさないが、PGA 処理された細胞は、コントロール軟骨細胞と比較して顕著な減少を示した。(図 9)。さらに、リアルタイム PCR による細胞外マトリックス遺伝子発現の定量的評価により、軟骨特異的タンパク質であるコラーゲンタイプ II は、PGA 処理培養された軟骨細胞より PGA(Sn) 処理培養された軟骨細胞において強く発現することを明らかになった [図 11(A)]。しかしながら、アグリカン遺伝子の発現は、PGA 処理により阻害されたが、PGA(Sn)処理された軟骨細胞とコントロール軟骨細胞の間にほとんど違いは見られなかった [図 11(B)]。

無機スズのラットに対する経口投与は DNA 合成の抑制と、それに引き続くコラーゲン合成の阻害も伴うことで軟骨細胞の増殖において減少を引き起こした。逆に、我々の結果では、PGA(Sn)処理されたヒト関節軟骨細胞の生体外培養において細胞増殖、コラーゲンタイプ II 遺伝子の発現、コラーゲンタイプ II プロテインの量の増加が見出された。我々は、投与方法の違いが、無機スズ化合物の異なった効果を引き起こしたという可能性を

推測した。前述したように、スズ化合物で処理されたウサギ関節軟骨の単層培養は、硫酸化 GAG の合成の減少に続いて、コアプロテインの合成抑制を引き起こす³²。この結果の一致により、我々の実験結果は PGA(Sn)処理されたヒト関節軟骨細胞において硫酸 GAG の量が減少することも明らかになった。当研究室の、マイクロマス培養システムでヒト関節軟骨細胞を使用した研究によって、有機スズ触媒を用いて合成した PGA が細胞増殖を減少させるが、細胞分化が顕著に促進されるということがすでに明らかとなったが、この結果は、我々の現在の結果と正反対である。PGA(Sn)の分子量と SnCl₂ やジブチルスズのようなスズ生産物の種類は、ヒト関節軟骨細胞における軟骨分化の様々な効果の鍵となる重要な要素である。

我々の知る限りにおいて、未だ、マイクロマス培養システムでヒト関節軟骨細胞を使用して、無機スズを触媒として合成した PGA の軟骨分化における効果を解析した先行研究はない。我々の研究は、マイクロマス培養システムでヒト関節軟骨細胞における、PGA 内の無機スズの生物学的活動を初めて示すものである。我々の研究では、低濃度の無機スズを PGA ポリマー合成に用いる時、スズポリマーなしに比較して、低い濃度の無機スズを用いる場合の方が、軟骨細胞において、スズ化合物の効果が高いことがわかった。それは、PGA の存在下では、無機スズの浸透性が増すからである。しかしながら、更なる研究が PGA(Sn)の臨床応用には必要である。

E. 結論

(1) ヒトアストロサイトの増殖と遺伝子発現に及ぼす生分解性ポリマーと使用される触媒等による影響について

結論として、PLLA、有機スズ、TTBM は NHAs に有毒であり、結果として神経組織再生を阻害する。PLLA や他の触媒によって誘引される神経細胞の毒性については、考慮せねばならない。

(2) ヒト軟骨細胞の増殖と分化に及ぼすスズ含、不含ポリグリコール酸による影響について

無機スズは、ヒト軟骨細胞の増殖促進、collagen typeII 遺伝子発現を顕著に促進するが、aggrecan 遺伝子発現は無添加コントロール群と同レベルであった。また、グリコサミノグリカン量は無機スズ存在下、低下した。

F 研究発表

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. 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.
4. 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.
5. 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.
6. Masato Tamai, Ryusuke Nakaoka, Toshie Tsuchiya, Cytotoxicity of Various Calcium Phosphate Ceramics, Bioceramics, Key Material Eng. 2005, Vol.309-311, 263-266.
7. 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..
8. 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.
 9. 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..
 10. Sadami tsutsumi, Duck-Young JUNG, Yu-Bong KANG, Toshie Tsuchiya, A Novel Non -Destructive Method To Measure Elastic Mduli Of Cartilage Cell In Situ, IFMBE, 2005, in press.
 11. 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.
 12. 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.
 13. Kazuo Isama, Toshie Tsuchiya, Osteoblast Differentiation and Apatite Formation on Gamma-Irradiated PLLA Sheets, Key Engineering Materials, 2005 288-289, 409-412
 14. 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
- (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- β 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ー工学技術による新しい医療の創出ー(2006.2) 東京
 3. 玉井将人、中岡竜介、伊佐間和郎、土屋利江：「N b 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ー新規材料開発ー」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ーワーファリン関連遺伝子に関する SNP 解析ー」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. Bioceramics18, 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. Bioceramics18, 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. Bioceramics18, 2005 12, Kyoto
 12. 伊佐間和郎、薮島由二、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

(特願)

1. 特願 2001-311484 ギャップ機能亢進剤

2. 特願 2001-311485 ギャップ機能抑制剤
3. 特願 2002-075407 宿主内埋め込み用構造体および繁殖方法 (宇部循環)
4. 特願 2003-8855 ギャップ機能抑制剤
5. 特願 2004-193233 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
6. 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
7. 特願 2004-234069 生体組織補填材および生体組織補填体
8. 特願 2005-126591 生体組織補填材の製造方法
9. 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
10. 特願 2005-294058 生体組織補填材とその製造方法
1. 11.特願出願準備中 細胞の増殖を促進し、かつ炎症を抑制する人工器官
11. 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).
12. 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).
13. 米国出願準備中 1件
14. 欧州出願準備中 1件

研究成果の刊行に関する一覧表

別紙4
雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表雑誌	巻号	ページ	出版年
T. Umemoto, M. Yamato, K. Nishida, J. Yang, Y. Tano and T. Okano	p57Kip2 is expressed in quiescent mouse bone marrow side population cells	Biochem. Biophys. Res. Commun.	337(1)	14-21	2005
T. Umemoto, M. Yamato, K. Nishida, C. Kohno, J. Yang, Y. Tano,	p57Kip2 is expressed in quiescent mouse bone marrow side population cells	FEBS Lett.	579(29)	6569-6574	2005
T. Umemoto, M. Yamato, K. Nishida, J. Yang, Y. Tano and T. Okano	Limbal epithelial side-population cells have stem cell-like properties, including quiescent state	Stem Cells	24(1)	86-94	2006
Saiffudin Ahmed, Toshie Tsuchiya	A mouse strain difference in tumorigenesis induced by biodegradable polymers	J. Biomed. Mater. Res	in press		2006
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	77	84-89	2005
Nasreen Banu, Yasmin Banu, Masamune Sakai, Tadahiko Mashino, Toshie Tsuchiya	Biodegradable polymers in chondrogenesis of human articular chondrocytes	J Artif Organs	8(3)	184-191	2005
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(Tissue Engineering	11(9-10)	1392-1397	2005
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	5	158-161	2005
Masato Tamai, Ryusuke Nakaoka, Toshie Tsuchiya	Cytotoxicity of Various Calcium Phosphate Ceramics,	Key Material Eng	Vol.309-311	263-266	2005