

IL-6 産生を誘導するために必要な LPS の最小濃度は 50 pg/ml 程度であった。また、IL-6 産生量も最大で 1300-1400 pg/ml 程度であったことから、THP-1 細胞の LPS 応答性は MM6-CA8 細胞と比較して非常に低いことが判明した。

(2) TLR リガンドに対する応答性

LPS を初めとした各種の微生物成分は感染に対する宿主の初期免疫応答に関与する生体防御蛋白質群である Toll-like Receptor (TLR) family によって認識される。そこで、種々の TLR リガンドの IL-6 産生誘導能を指標として、MM6-CA8 細胞及び THP-1 細胞の TLR 発現状況を評価し、その結果を表 2 に示した。いずれのリガンドも混入している LPS の影響が観測されない濃度範囲において試験を実施した。リポタイコ酸は EndoTrap 処理により精製した後でも 18.3×10^2 EU/mg の LPS が残存していたため、試験対象から削除した。

大腸菌と黄色ブドウ球菌の乾燥菌体は種々の成分を含んでいるため、複数の TLR により認識される。IL-6 産生を誘導する大腸菌乾燥菌体の最小用量は MM6-CA8 細胞及び THP-1 細胞ともに 1 ng/ml であった。しかし、黄色ブドウ球菌乾燥菌体については応答性に相違が見られ、MM6-CA8 細胞では 5 ng/ml 以上、THP-1 細胞では 500 ng/ml 以上の同菌体により IL-6 産生が誘導された。また、両乾燥菌体により誘導される IL-6 産生量にも相違が認められ、MM6-CA8 細胞の方が高い応答性を示すことが判明した。ペプチドグリカンに対する両細胞の応答性はほぼ同等であり、5-10 ng/ml 以上の濃度で IL-6 産生が誘導された。また、合成リポ蛋白質は 0.1-1 μ g/ml 以上の濃度で両細胞に対する IL-6 産生誘導能を示した。一方、Poly(I:C) に対する応答性には相違が認められ、THP-1 細胞は 10 μ g/ml 以上の濃度で IL-6 を産生するのに対

し、MM6-CA8 細胞の場合、試験に供した濃度範囲では IL-6 産生が誘導されなかった。また、R837 及び大腸菌 DNA は両細胞に対する IL-6 産生誘導能を示さないことが確認された。

(3) 継代に伴う MM6-CA8 細胞の性状変化

HCPT においてライン化細胞を使用する場合、試験に供する細胞数を得るために時間を要することが欠点の 1 つに挙げられる。この問題は細胞を常時継代することにより回避できるが、継代に伴って菌体成分に対する細胞応答性が変化する可能性がある。そこで、MM6-CA8 細胞の継代安定性を評価した結果、図 8 に示したように、細胞形態や老化の指標となる β -ガラクトシダーゼ染色性は 30 代目まで大きな差異が観察されなかった。一方、図 9 に示したように、LPS 刺激に対する IL-6 産生能は、8 代目以降、継代数の増加に伴って応答性が低下する傾向が認められた。

(4) コラーゲン/HA 人工骨からの LPS 回収

コラーゲンは LPS 吸着能が高いと共に、HA も様々な物質を吸着する性質を持っていることから、昨年度、コラーゲン/HA 製骨充填剤の LPS 吸着能を評価した。その結果、同材料の LPS 吸着能は非常に高く、精製コラゲナーゼ/塩酸法を適用したエンドトキシン試験では人工的に添加した LPS が殆ど回収されないことを見出した。

本年度、適切な評価法を確立するため、前処理法に関して検討した結果、表 6 に示したように、LPS を添加した同材料からの LPS 回収率は氷冷下で短時間超音波処理する塩酸抽出法を適用することにより改善されることが判明した。また、LPS 回収率は塩酸濃度の上昇に伴って増加すると共に、希釈溶媒として Tris 緩衝液を使用した際に高い値が得られることも確認された。

一方、抽出操作を行うことなく、固形（粉体）試料 1 mg 相当を直接的に MM6-CA8 細胞と共培養する direct HCPT を適用した時の LPS 回収率は 23.8% であり、1M 塩酸抽出/Tris 緩衝液希釈法を用いたエンドトキシン試験と同等であることが確認された（表 6）。

(5) HCPT による市販創傷被覆剤の微生物学的安全性評価

5-1. コラーゲン製品

表 4 に示したように、温水抽出（50℃・24 時間・注射用水）を用いた過去のサーベイ試験において、テルダーミス及びテルプラグはエンドトキシン試験、ウサギ発熱試験、抽出液を用いた HCPT とともに陽性結果が得られている。その他、アロアスク及びノバコールからも僅かに LPS が検出されたが、アロアスクのみが HCPT 陽性となる結果が得られていた。ガイドライン法（室温・72 時間・生理食塩液）を適用したエンドトキシン試験では、アロアスクを除き、大部分が LPS 陰性と判定されるが、抽出条件を最適化した精製コラーゲンゼ／塩酸法を用いて試験を行うことにより、テルダーミス及びテルプラグからの LPS 回収率は飛躍的に改善される。また、同法を適用した場合、ガイドライン法及び温水抽出法において陰性又は擬陽性を示したアビテン、インテگران、ヘリテンからも相当量の LPS が検出される。

これらの性状を示す試料各 1 mg 相当を直接的に MM6-CA8 細胞と共培養した結果、表 7 に示したように、エンドトキシン試験において多量の LPS 汚染が認められたインテگران、テルダーミス、テルプラグは direct HCPT においても顕著な LPS 活性（IL-6 産生能）を示した。アロアスクの LPS 含量は 37.9 EU/g（精製コラーゲンゼ／塩酸法適用時）であったが、direct HCPT では比較的高い活性が認められた。一方、エンドトキシン試験において顕著

な LPS 汚染が観察されたアビテンとヘリテンは direct HCPT 陰性と判定された。

5-2. アルギン酸製品

表 7 に示したように、温水抽出を用いた過去のサーベイ試験では、いずれの製品からも相当量の LPS が検出された。アルギン酸製品の LPS 含量はガイドライン法を用いたエンドトキシン試験によっても測定可能であるが、事前にホモジナイズ処理を施すことにより回収率が改善される。ソープサンはエンドトキシン試験、ウサギ発熱試験及び抽出液を用いた HCPT とともに陽性反応を示す。一方、カルトスタットには相当量の LPS が混入しており、ウサギ発熱試験も陽性となるが、HCPT は陰性を示すことが判明している。また、アルゴダームの場合、エンドトキシン試験及び HCPT とともに陽性となり、特に HCPT では高い活性が観察されるが、ウサギ発熱試験における ΔT_{max} は 0.56℃ であり、擬陽性と判定される。

このような性状を示す試料各 1 mg 相当を direct HCPT により評価した結果、表 7 に示したように、ソープサン及びアルゴダームは非常に高い IL-6 産生誘導能を示すことが確認された。一方、カルトスタットの IL-6 産生誘導能は比較的 low、過去の成績と相関性が認められた。

3. 間葉系幹細胞の均質性／同一性、および品質検査法の開発

多数の骨髄由来間葉系幹細胞株を用いてマーカーの有用性を証明した。腸骨、大腿骨、脛骨、歯槽骨由来のヒト骨髄由来間葉系幹細胞に共通して、ヒト繊維芽細胞よりも高レベルに発現しているマーカー遺伝子を多数同定した。またこれが、骨髄由来間葉系幹細胞移植による臨床研究で役立つことを明らかにした。また母集団より分離した多数の MSC

コロニーでの各マーカーの発現レベルが殆ど同一であることを示して、母集団は単一の細胞 (MSC) から成立している、つまり細胞集団の均質性を証明できた。

4. 幹細胞の安全性に関する研究

骨髄採取を行った 10 症例の間葉系幹細胞の安全性を評価して、細菌、真菌、ウイルス、エンドトキシン、マイコプラズマに異常値は認められなかった。これまでの自家移植例で異常は認められなかった。

再生医療に用いる電子システムソフトを開発し、このソフトに臨床情報を入力したところ、臨床、培養スケジュールを円滑に遂行できたとともに、患者情報、試験データ記録の管理を安全にかつ簡便に行えた。

5. 再生医療に用いる安全な細胞・培養技術の確立とその評価

われわれは HIV 感染男性 (夫)、非感染女性 (妻) 間における挙児希望に対し、夫精液から HIV ウィルスを除去して体外受精-胚移植を行った。52 例 (73 精液標本) に本法を施行後、超高感度 nested-PCR 法により HIV-1 RNA ならびに proviral DNA 検出を行い、全例で HIV-1 陰性が確認された。20 例で妊娠が確認され、27 児が誕生した。母児共に感染例は無かった。

6. 細胞移植・組織移植におけるアロ応答に関するモニタリングと制御に関する研究

1. 心筋梗塞急性期に対するアロ細胞移植の治療効果

A 群および S 群は、C 群と比して左室径短縮率が高く、左室繊維化率が低く、血管密度が高かった。A 群と S 群の間に有意な差は認めなかった。

2. 治療効果のメカニズムの解析

S 群において、細胞移植後 28 日までに移植

細胞の大部分が脱落した。In vitro で MSC は培養液中に VEGF の分泌を認めた。低酸素条件下の培養で MSC の VEGF 分泌量が増加した。A 群および S 群は、C 群と比して心筋における VEGF 転写量および血中 VEGF 濃度が高かった。

3. アロ細胞移植に対する免疫応答

移植後 1 日で、いずれの群の心臓組織においても IL1b および MCP-1 の転写量の上昇を認め、A 群は、S 群および C 群と比して有意に高かった。移植後 1 日でいずれの群においても T 細胞浸潤像を認めず、A 群の細胞移植部位においてマクロファージが多く集積していた。移植後 28 日でいずれの群においても IL1b および MCP-1 の転写量は正常値であった。MSC は in vitro で MHC class I (+)、MHC class II (+dull)、B7.1(-)、B7.2(-) であり、interferon γ を添加しても B7 分子の発現を認めなかった。ACI 由来 MSC 刺激による LEW リンパ球増殖を認めず、interferon γ 存在下で培養した ACI 由来 MSC 刺激においても同様の結果であった。

7. 臍帯血間葉系細胞の骨、軟骨細胞への分化誘導とその評価に関する研究

臍帯血の容量 > 60 g、採集後から分離までの時間が 5 時間以内のサンプルにおいて、コロニーを形成する間葉系細胞の回収率約 70% 得られた。そのコロニーから増幅させた細胞集団について FACS により細胞表面抗原を解析したところ、CD29、CD44、CD49e、CD73、CD90、CD105、CD166 が陽性および CD14、CD31、CD34、CD45 が陰性反応を示し、一般的に知られている間葉系幹細胞マーカーを発現している細胞集団であった。骨、軟骨、脂肪への分化誘導について検討したところ、骨、軟骨には分化しやすいが脂肪には分化しにくい傾向がみられ、臍帯血サンプルによっては多分化能を保持していない細胞集団もあった。

骨再生動物モデル実験において、移植後8週目での移植片をHE染色したところ、正常な骨組織と同じ微細構造をもつ新生骨を形成することが確認された。軟骨再生動物モデル実験では移植後3週目で白く堅い組織が形成された。その組織のパラフィン切片を作製しトルイジンブルー染色したところ、トルイジンブルーにより赤紫色に染色され、円形の軟骨様細胞がみられた。また、軟骨細胞マーカーのタイプIIコラーゲンに対する抗体により免疫染色したところ、円形の軟骨様細胞の周囲に陽性反応が示された。これらの結果から、臍帯血由来間葉系幹細胞はヌードマウス皮下環境において軟骨細胞への分化が増強されることが明らかになった。

免疫寛容実験に関しては、臍帯血由来間葉系幹細胞をPHA刺激ヒト末梢血由来リンパ球に添加し、そのリンパ球増幅を濃度依存的に抑制し、ConA刺激、混合リンパ球培養試験でも同様な抑制効果を示した。

8. 間葉系幹細胞の免疫制御（寛容）システムに関する研究

1) 活性化T細胞への間葉系幹細胞の免疫抑制効果についての検証

マウスのMLRでの細胞増殖をヒトのMSCが抑制するとの報告があったので、その真偽について3ラインのhMSCを用いて細胞増殖だけでなくサイトカインの産生への効果の確認を行った。その結果、hMSCはMLRおよびMitogen刺激による活性化T細胞（マウス由来）の細胞増殖を抑制することが確認できた。一方サイトカインの産生はMitogen刺激とともにIL-2の産生量がhMSCと共培養することで減少していたが、IFN- γ の産生量に関してはそれとは異なる結果が得られた。マウスのMSCで同様の実験を行った場合もhMSCとは異なる結果が得られた。

2) 抑制に関わる液性因子の探索

活性化T細胞とmMSCの共培養の上清を一定分子量で粗分画して、それぞれの分画に抑制効果がみられるか検討した結果、ある分子量の分画に活性化T細胞の増殖およびサイトカインの産生を抑制する効果があることが分かった。

3) PGE₂合成阻害への影響

各種-inhibitor)を用いてPGE₂合成阻害をしたが、mMSCの活性化T細胞の増殖抑制効果およびIL-2, INF- γ の産生量への影響を比較した。

9. 動物組織由来製品の安全性に関する研究

本年度の情報収集の中で得た重要な知見としては、

1, これまでBSEに関しては清浄国と汚染国をその発生数などからOIE（国際獣疫事務局）が5つの分類を行っていて、医療機器原料としての動物由来材料はその分類にしたがって安全性を判断することとなっていた。しかし、OIEはこの考え方を改め、新たなクライテリアに基づく、清浄性の判断を行うことがすでに決められていることが明らかとなった。内容はいまだ公表されていないが、我が国では厚生労働省の通知において、未だ発生を見ていない国からの輸入を求めており、今回の取り決めから異なりうる可能性がある。

2, これまで若いウシについてはより安全であるとの考え方が支配的であったが、これがかならずしも妥当ではないことの理解がすすんだ。とくに動物由来飼料の給餌を禁止してからの期間が重要だと考えられ、これまでの実際の例を勘案して、相当期間をおいてからでない危険性はさがないという認識がでた。

3, これまで我が国主張してきた原案の修正

意見はすべて採択された。

D. 考察

1. 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

骨髄由来間葉系幹細胞を細胞組織利用医療機器に利用するためには幹細胞を生体内から取り出して *in vitro* で培養して増殖させるという工程を経なければならない。そのため、*in vitro* での培養期間中の幹細胞の安全性の確保についての検討は大変重要であると思われる。

本研究では、まず細胞の培養条件の一つとして、酸素濃度に着目した。通常の培養条件では大気中の酸素濃度と同様に 20% であるが、生体内における酸素濃度は 2%~5% 程度であると言われている。そのため、通常の培養条件では酸化ストレスを受けている可能性も高い。またその影響で、培養期間が長くなるにつれ増殖能が低下し細胞が老化するのかもしれない。そこで本研究では、hMSC を通常の培養条件 (20%O₂) 下と生体内環境に近い培養条件 (5%O₂) 下とでそれぞれ培養し、増殖や老化及び細胞周期制御に関わる遺伝子の発現レベルなどを比較した。その結果、細胞周期制御に関わる遺伝子の mRNA 発現レベルは、11 継代目において酸素濃度の違いによる変化が多少見られるものの、hMSC の増殖や老化には培養中の酸素濃度による有意な違いは認められなかった。このことから、hMSC の培養において、通常の培養条件である 20%O₂ 濃度では 5%O₂ 濃度に比べて明らかな酸化ストレスは認められないことがわかった。

さらに昨年度、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 が挙げられるとの見解を示したが、昨年度の検討は 1 ドナーからの MSC を用いた実験であったため、今年度は、hMSC の *in*

vitro 培養期間による遺伝子発現の変化について、複数のドナー由来の幹細胞を用いて比較することにより、その共通性について検討した。培養期間としては、実際に細胞組織利用医療機器の材料として間葉系幹細胞を用いる場合を想定し、妥当な期間内 (~50 日) で検討した。

4 ドナー由来の hMSC についてその増殖について比較した所、その増殖速度に個人差がみられた。今年度はこの様に個人差のある 4 ドナー全てにおいて、*in vitro* で培養期間中にその mRNA 発現に変化のなかった遺伝子の抽出を試みた。#1, 20days, 50days の時間軸 3 点を Technical duplicate で行ったため計 6 点全てで発現しているとみなされた遺伝子の中から、#1 と比較して 20days, 50days とともにその発現レベルが 0.8~1.2 倍であった遺伝子を「変化なし」の遺伝子として抽出したところ、1,898 遺伝子抽出された。さらに抽出された 1,898 遺伝子の中から様々な機能や疾病と関連している遺伝子を抽出したところ、528 遺伝子あった。そのうち cancer と cell cycle に関わるものはのべ 159 遺伝子含まれていた。そこでこの 159 遺伝子の中から癌化の危険性を評価するための指標の候補を探索していくことにした。まず、cancer と cell cycle のどちらにおいても、多くのカテゴリーに含まれる c-myc に着目した。そこで、定量的リアルタイム PCR にて c-myc の mRNA 発現レベルを測定したところ、各ドナーとも DNA アレイの結果と同様に培養期間における発現レベルに変化は見られなかったため、c-myc は候補遺伝子の一つとして挙げられると考えられた。つまり *in vitro* 培養の前後において、通常は c-myc の mRNA 発現レベルに有意な変化が見られないと考えられるので、発現レベルに大きな差が見られた場合は培養中に何か不都合な変化が起こ

った可能性が示唆される。この様な判断基準の一つとして c-myc が利用できることを期待している。

今後さらに解析を進め、c-myc 以外にもいくつかの候補遺伝子を挙げて、最終年度となる来年度には安全性評価系としての確立を目指していきたい。

2. 組織工学用スキャホールドのエンドトキシン試験法の確立と感染リスク

TLR family は微生物感染に対する宿主の初期免疫応答を制御する生体防御蛋白質であり、肺、胃腸管のような外部環境に接する組織やマクロファージのような免疫応答細胞に優先的に発現している。生体内における LPS の一次標的はマクロファージであり、血中に投与された LPS は TLR4 を介して発熱をはじめとした様々な生理活性を発現する。TLR2 は TLR1 や TLR6 と二量体を形成することにより、グラム陽性細菌の細胞外膜に局在するリポタイコ酸や細胞膜の構成成分であるリポ蛋白質などを認識し、その他、ウイルス由来の二本鎖 RNA、細菌鞭毛、細菌 DNA はそれぞれ TLR3、TLR5 及び TLR9 を介して生物活性を発現することが知られている。TLR7 及び TLR8 のリガンドは同定されていないが、合成抗ウイルス分子に対する親和性を持つことが知られている。また、細菌類の細胞壁成分であるペプチドグリカン は TLR2 リガンドとして作用すると考えられていたが、近年、精製したペプチドグリカン は TLR2 を介さずに活性を発現することが報告され、NOD1 や NOD2 などのその他の蛋白質の関与が示唆されている。

これらの菌体成分が TLR に認識されると、セリンキナーゼ (IL-1-R-associated kinase, IRAK) の活性化や NF- κ -B 転写因子の活性化など一連のシグナルカスケードを経て、最終的に TNF α 、IL-1 β や IL-6 などの炎症性サイ

トカインの産生が誘導される。活性発現の強度はそれぞれ異なるが、TLR family に認識されるこれらの菌体成分はいずれも発熱性物質となる。

HCPT においては、ヒト血液 (末梢血細胞) とライン化細胞を使用することができる。末梢血は発熱性物質と反応する全ての血中成分を通常の生理学的比率で含んでいる利点があるが、その安全性、品質管理、供給面での問題が課題となる。一方、ヒト由来単球様細胞である MM6、THP-1、U937 及び HL-60 ライン化細胞の場合、供給面や安全性に関する障壁はないが、試験に供するまでに数週間の培養期間が必要であると共に、継代による性状変化や発熱性物質に対する反応性などを確認する必要が生じる欠点を持っている。本研究において、MM6-CA8 細胞と THP-1 細胞の TLR リガンドに対する応答性を評価した結果、TLR2、TLR2/1、TLR2/6 リガンドに対する応答性は、黄色ブドウ球菌乾燥菌体と合成リポ蛋白質の認識性を除き、両細胞ともにほぼ同等であるが、MM6-CA8 細胞は TLR4 リガンドである LPS に対して非常に高い応答性を示すことが判明した。しかし、THP-1 細胞は TLR3 リガンドである Poly(I:C) を認識したのに対し、MM6-CA8 細胞は同リガンドに対する応答性を欠如していた。また、MM6-CA8 細胞は TLR7 リガンドである R837 と TLR9 リガンドである大腸菌 DNA を認識しなかったことから、同細胞は TLR3、TLR7、TLR9 を発現していない可能性が示唆された。本実験では IL-6 産生誘導能を指標として評価したため、その他のサイトカイン類の誘導状況は不明である。今後、サイトカイン及びケモカインの一斉分析を行い、各種 TLR リガンドに対する MM6-CA8 細胞の応答性を再評価すると共に、発熱マーカーの検索を行う。また、同細胞における各種 TLR の発現状況については、mRNA 及び蛋白質レベルでも評価する予定である。

材料の微生物汚染が細菌類に由来する場合、TLR5、TLR7、TLR8 及び TLR9 を発現していなくとも、TLR2、TLR2/1、TLR2/6 及び TLR4 を介して微生物の混入を検出することは可能である。ウイルスの場合、核酸を保護するカプシドとそれを取り巻くエンベロープは一般的にそれぞれ蛋白質及びリポ多糖体蛋白質から構成されている。それ故、HCPT において使用する細胞がウイルス由来の 2 本鎖 RNA を認識する TLR3 を欠損している場合、材料のウイルス汚染は TLR2 を介して検出することが可能と思われる。しかし、HCPT においては、各種の微生物成分を包括的に検出することができれば理想的であるため、今後、MM6-CA8 細胞を親株として、欠損が疑われた TLR の遺伝子を導入した亜株の作製を試みる予定である。また、ヒト末梢血細胞の TLR リガンドに対する応答性についても評価する予定である。

MM6-CA8 細胞の継代安定性を評価した結果、細胞形態や老化の指標となる β -ガラクトシダーゼ染色性は 30 代目まで大きな差異が認められなかった。しかし、IL-6 産生誘導能については、8 代目以降、継代数の増加に伴い応答性が低下する傾向が認められた。本実験で使用した MM6-CA8 細胞は 4 代目を保存株としている。通常、試験には 8-10 代目を使用するが、LPS 応答性を見る限り、7 代目までは本試験に使用できないことも明らかとなった。

エンドトキシン試験において、コラーゲン製品からの LPS 回収率は、我々が過去に開発した精製コラーゲン/塩酸法を前処理として適用することにより飛躍的に改善される。しかし、HA、特に未焼成 HA との複合材料の場合、同法を適用しても LPS 回収が困難であることを昨年度に見出した。生体内適用材料の場合、いかなる材料でも微生物学的安全性を評価する必要があるため、LPS 吸着能

の高いコラーゲン/HA 骨充填剤のエンドトキシン試験法に関して検討した結果、同材料からの LPS 回収率は 1M 塩酸を使用して氷冷下、短時間の超音波抽出を行うことにより大きく改善されることが判明した。

エンドトキシン試験では、原理上、試験液を調製するために材料からの抽出操作が必須となるが、昨年度、少なくともコラーゲン製品の微生物学的安全性については、煩雑な抽出操作を行うことなく、固形材料を用いた direct HCPT により評価できることを明らかにした。そこで、上記のコラーゲン/HA 骨充填剤に direct HCPT を適用した結果、エンドトキシン試験とほぼ同等の LPS 回収率が得られた。

エンドトキシン試験に用いるリムルス反応における LPS の構造要求性は比較的強く、同反応においては広範な種類の LPS が活性を示すことが知られている。また、LPS には種特異性があり、動物の種類によって発現される活性強度が異なる。市販創傷被覆剤の微生物学的安全性を direct HCPT により評価し、過去に実施したサーベイ試験と比較検討した結果、多くの試料はエンドトキシン試験、ウサギ発熱試験、direct HCPT の間に相関性が認められたことから、天然由来医用材料の微生物学的安全性は固形試料を用いた direct HCPT により評価できることが明らかとなった。また、アビテン、ヘリテン及びカルトスタットのように、エンドトキシン試験では陽性を示すが、direct HCPT では陰性となる試料のほか、アロアスクやアルゴダームのように、エンドトキシン試験の結果と対比した場合、direct HCPT において比較的高い活性が認められる試料が存在したことから、HCPT はヒトに対する現実的な安全性を評価する上で非常に有用であることも判明した。

HCPT においてライン化細胞を使用する場合、試験に要する細胞数を得るまでに分化刺

激の時間も含めて通常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、HCPTは、検出感度もエンドトキシン試験と大きな差異がなく、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。HCPT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。

今後、前述のとおり、MM6-CA8細胞から誘導されるIL-6以外のサイトカイン及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、各種のTLRリガンドに対する応答性の再評価と発熱マーカーの最適化を行う。また、TLRリガンドに対するヒト末梢血細胞の反応性を評価すると共に、貧食作用によるMM6-CA8細胞の活性化能を検討するほか、TLR遺伝子を導入した亜株の作製を試みるなど、HCPTの有用性を総合的に評価する予定である。

3. 間葉系幹細胞の均質性/同一性、および品質検査法の開発

移植用細胞に目的以外の細胞が混入してもある程度有効もしれないが、他細胞が混入していない細胞集団を移植することにより、治療方法自体および治療の有効性の評価をより明確に出来る。

4. 幹細胞の安全製に関する研究

昨年度の臨床例のなかには、エンドトキシ

ン高値の患者1例、培養した骨髄細胞患者由来と考えられるパルボB19ウイルスが検出された1例を確認した。両例の移植ともに、感染した細胞は用いなかったため、今回の移植後の経過観察からも、移植した細胞の安全性は評価できた。

電子システムソフトは、取り扱い、管理の規定策定が必要とされるが、今後患者への情報開示にも役立つと考えられる。

5. 再生医療に用いる安全な細胞・培養技術の確立とその評価

浮遊細胞の細菌除去、HIV除去に関しては、本法が汎用できる。さらにヒト精子においては、前年の報告書に記載したオプチデント沈降平衡法、上述したPercoll沈降速度差遠心法、swim up法を組み合わせることにより、細菌除去、HIV除去ともにDNA損傷精子比率が低い、運動精子分画を得ることができた。

再生医療において移植を目的とした初代細胞の臨床培養は分化誘導を伴うことも多く、従来の株化細胞の継代培養に比してより厳密な細胞群、組織の品質管理、それを構成する個々の細胞の品質管理が必要となる。さらに感染防御を始めとする新しい観点が不可欠である。われわれは個々の細胞におけるDNA構造正常性の評価法を確立し、これらを指標として培養過程(in vitro)におけるDNA損傷を最小限とする培養条件を確立する必要があると考えている。その施策として、培養環境の低酸素化、活性酸素制御を目的とした培養装置、培養液の最適化を検討している。

6. 細胞移植・組織移植におけるアロ応答に関するモニタリングと制御に関する研究

心筋梗塞急性期に対するMSC移植による治療効果のメカニズムとして、長期の細胞生着は必要なく、早期の移植部位における移植細胞によるVEGF分泌、および亜急性期のVEGF

パラクライン作用を介した全身性の VEGF 濃度の上昇、血管新生効果の惹起および血行再建が一因であることが示唆された。

アロ MSC 移植による免疫応答について、アロ MSC は免疫原性が低く T 細胞を介した拒絶反応を惹起せず、脱落してゆく移植細胞に対するマクロファージによる一過性のものに過ぎないこと、この炎症は心機能増悪因子にはならないことが示唆された。

以上より将来的に他家細胞移植は自家細胞に代替しうるアプリケーションとなりうるということが示唆された。

7. 血間葉系細胞の骨、軟骨細胞への分化誘導とその評価に関する研究

臍帯血由来間葉系幹細胞の最適な採取に関わる要因、時間、容量条件が得られた。また骨、軟骨細胞へ分化しうる細胞が存在していること、特に軟骨細胞への分化能が高いことが明らかになった。アロ移植ではドナーとレシピエント間で組織不適合により GVHD などの拒絶反応が起きる。この拒絶反応を軽減させる方法として免疫寛容を誘導する必要がある、間葉系幹細胞が免疫寛容を誘導することが報告されている。我々は、骨・軟骨再生のアロ移植のための細胞ソースとして考えられる臍帯血由来間葉系幹細胞が免疫寛容を誘導できるかについて、mitogen (PHA または ConA) により刺激したリンパ球と臍帯血由来間葉系幹細胞との共培養系によるリンパ球の増殖能を評価したところ、活性化リンパ球の増殖能は著しく低下した。このことから、臍帯血由来間葉系幹細胞は免疫寛容を誘導することが可能であり、臍帯血由来間葉系幹細胞から分泌される何らかの活性化リンパ球の増殖抑制因子によることが示唆された。

今後、in vivo での詳細な実験を追加するとともに、臍帯血間葉系幹細胞をコンスタン

トに得て凍結保存するシステムを開発し、臍帯血バンクシステムを利用し臍帯血中の間葉系幹細胞が再生医療にも有効にもなりうるべく検討をすすめていく予定である。

8. 間葉系幹細胞の免疫制御（寛容）システムに関する研究

複数の hMSC (ヒト由来) でマウスの MLR および Mitogen 刺激による活性化 T 細胞の細胞増殖を抑制できたことから MSC による抑制の普遍的なメカニズムは種のバリアを超えているかもしれないことが示唆される。一方、サイトカインの産生に関しては Mitogen 刺激による活性化 T 細胞からの IL-2 および IFN- γ の産生量は mMSC であろうと hMSC であろうと減少させていたが、MLR による IFN- γ の産生量は mMSC と hMSC では傾向が異なっていた。この違いは、マウスの系にヒトの MSC を共培養させたゼノの系であったためなのか、それともマウスの MSC とヒトの MSC の本来の性質の違いであるのか今回の結果からは判断できない。ただし、今回のマウスの活性化 T 細胞に対する抑制効果はマウスの MSC の方がヒトの MSC よりも強かった。マウスの MSC でも、測定条件によって、IFN- γ の産生量への影響が異なるを可能性もある。これは今後検討する予定である。

抑制に関わる因子の探索の結果、ある分面に活性化 T 細胞の増殖およびサイトカインの産生を抑制する効果があることが分かったが、この効果には PG が、どのように関与しているのか、検討中である。MSC の抑制効果も更に検討する必要がある。

9. 動物組織由来製品の安全性に関する研究

これまでの我が国の医療機器の安全性確保は我が国の国民の健康を守る意味で極めて有効に働いてきたと考えられる。医療機器に関してはその主要な品目の多くは輸入品

であり、問題の解決には国際的な枠組みに沿った医療機器の安全性行政が必須である。幸い医療器に関してはこれまでにすでに多くの国際標準化文書が作成されていて、我が国の医療機器行政が円滑に進んできた側面を見逃すことは出来ない。

近年我が国でも新しい医学研究結果にもとづく斬新な医療機器の開発がすすんできたが、これらの機器の発展には国際的な枠組みの準用がてきとうである。

こうした観点から本研究では医療機器の安全性試験の国際的枠組みに関する情報収集を行った。

その結果今後の医療機器の安全性に関する情報が十分に収集されたと考えられた。

今後は本年準備した培養細胞による安全性試験の可能性について検討を重ねたい。

E. 結論

1. 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) MSC を通常の培養条件 (20%O₂) 下と体内環境に近い培養条件 (5%O₂) 下とでそれぞれ培養し、増殖や老化及び細胞周期制御に関わる遺伝子の発現レベルなどを比較した。その結果、hMSC の増殖や老化には培養中の酸素濃度による有意な違いは認められなかった。このことから、hMSC の培養において、通常の培養条件である 20%O₂ 濃度では 5%O₂ 濃度に比べて明らかな酸化ストレスは認められないことがわかった。

2) MSC の *in vitro* 培養期間による遺伝子発現の変化について、複数のドナー由来の幹細胞を用いて比較することにより、その共通性について検討した。培養期間としては、実際に細胞組織利用医療機器の材料として間葉系幹細胞を用いる場合を想定し、妥当な期間内 (~50 日) で検討した。4 ドナー全てにおいて、*in vitro* での培養期間中にその mRNA

発現に変化のなかった遺伝子を抽出したところ、1,898 遺伝子あり、そのうち機能や疾病に関わる遺伝子は 528 遺伝子であった。そのうち、cancer と cell cycle における多くのカテゴリーに含まれる c-myc に着目し、定量的リアルタイム PCR にて c-myc の mRNA 発現レベルを測定したところ、各ドナーとも培養期間における発現レベルに変化は見られなかったため、c-myc は hMSC の *in vitro* 培養期間中の安全性評価系に用いられる遺伝子の候補の一つとして挙げられると考えられた。

2. 組織工学用スキャホールドのエンドトキシン試験法の確立と感染リスク

TLR4 リガンドである LPS に対する応答性を評価した結果、MM6-CA8 細胞は THP-1 細胞と比較して遙かに高い反応性を示すことが確認された。また、MM6-CA8 細胞は TLR4 リガンドのほか、TLR2 (TLR2/1 及び TLR2/6) リガンドを高感度で認識するが、TLR3、TLR7、TLR9 を発現していない可能性が示唆された。

MM6-CA8 細胞の継代安定性を評価した結果、細胞形態や老化の指標となる β -ガラクトシダーゼ染色性は 30 代目まで大きな差異が認められなかった。しかし、IL-6 産生誘導能については、継代数の増加に伴い応答性が低下する傾向が認められた。

LPS 吸着性材料であるコラーゲン/HA 骨充填剤からの LPS 回収率は、氷冷下、1M 塩酸中で短時間超音波抽出することにより大きく改善された。同材料に direct HCPT を適用した結果、エンドトキシン試験と同等の LPS 回収率が得られた。また、direct HCPT を市販創傷被覆剤に適用し、過去に実施したサーベイ試験結果と比較した結果、ウサギ発熱試験及びエンドトキシン試験との相関性が確認されたと共に、混入する LPS の種特異性に関する情報も得られた。これらの結果から、天

然医用材料の微生物学的安全性は煩雑な抽出操作を行わなくとも、固形試料を用いる direct HCPT により評価できることが明らかとなった。

3. 間葉系幹細胞の均質性／同一性、および品質検査法の開発

間葉系幹細胞のマーカーが移植用細胞を検査するために有用であることが判明した。

4. 幹細胞の安全製に関する研究

自家間葉系幹細胞の臨床例で安全性を評価できた。電子システムソフトを用いてデータ管理を安全にかつ簡便にできるようになった。

5. 再生医療に用いる安全な細胞・培養技術の確立とその評価

平成 17、18 年度における研究は、移植を目的とした培養細胞の品質管理に関する検討を行った。ヒト精子を用いて、感染性因子の除去ならびに DNA 損傷精子の排除、さらに in vitro における細胞の取扱、培養において DNA 保護を指向した低酸素培養システムの構築を試みた。臨床的には感染症患者由来の組織、細胞を培養する機会も考えられ、感染因子の除去ならびに使い捨て培養システムの開発が望まれる。

6. 細胞移植・組織移植におけるアロ応答に関するモニタリングと制御に関する研究

心筋梗塞急性期における骨髄由来間葉系幹細胞移植において同種他家細胞の有用性が示唆された。

7. 臍帯血間葉系細胞の骨、軟骨細胞への分化誘導とその評価に関する研究

臍帯血には間葉系幹細胞が存在するが、その分離には臍帯血の採取量や採取から細胞

分離までの時間が重要であることを示した。臍帯血由来間葉系幹細胞は、骨、軟骨細胞に分化能を有しているおり、免疫寛容を誘導する可能性も示唆され、骨・軟骨再生の細胞ソースの一つとして期待される。

8. 間葉系幹細胞の免疫制御（寛容）システムに関する研究

アロ抗原および Mitogen 刺激により活性化されたマウス Splenocyte (主に T 細胞) の細胞増殖は同種である mMSC だけでなく異種の hMSC でも抑制されることが確認された。mMSC による活性化 T 細胞からのサイトカイン産生は、2 種の刺激においても、抑制された。一方、ある種の MSC は Mitogen 刺激による活性化 T 細胞からの IL-2 および INF- γ の産生は抑制していたが、アロ抗原による刺激の際は IL-2 は抑制していたが INF- γ は産生量の増加がみられた。この MSC の違いによる効果の原因について検討する必要がある。

Mitogen 刺激したマウス Splenocyte と mMSC の共培養の粗分画の実験からある分画に MSC が活性化 T 細胞の抑制に関与する液性分子が存在することが示唆された。その候補の一つとして PGE₂ を考え、現在、検討しているが、他の因子の可能性についても解析する。今後、その両者間の比較解析を詳細に行うことで、MSC の免疫制御（寛容）システムに関する分子メカニズムを解明する予定である。細胞を利用した治療に MSC を利用していく上で MSC の機能とそのメカニズムを明らかにすることはその有効性、安全性の面からも必須であると思われる。

9. 動物組織由来製品の安全性に関する研究

医療機器の安全性試験とりわけ動物由来製品の安全性試験に関する情報を収集し、解析の結果国内の専門家に適切な情報を提供することができた。さらに情報を提供した国

内の専門家からの情報を勘案し、国際標準化機構の国際標準文書の作成に貢献することができた。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1) 論文発表

1. 土屋利江、再生医療製品のギャップ結合細胞間連絡機能評価の重要性について、岡野光夫編、CMC 出版 印刷中
2. 土屋利江、ティッシュエンジニアリングとガイドライン、ティッシュエンジニアリング 2007、岡野光夫、田畑泰彦編、印刷中
3. Nasreen Banu, Toshie Tsuchiya, Markedly different effects of hyaluronic acid and chondroitin sulfate-A on the differentiation of human articular chondrocytes in micromass and 3-D honeycomb rotation culture. J. Biomed. Mater. Res. 2007, 80, 257-267.
4. 土屋利江 編集、再生医療品における幹細胞とバイオマテリアル、培風館、2007 印刷中
5. 土屋利江、細胞組織医療機器開発総論、薬学雑誌、印刷中
6. 澤田留美、伊藤友実、土屋利江、細胞組織利用医療機器に用いられる幹細胞の品質及び安全性評価について、薬学雑誌、印刷中
7. 土屋利江、俵木登美子、特別対談、医療機器開発の推進を目指した日本の動向、バイオテクノロジージャーナル、羊土社、2007
8. D.Y. Jung, Y.B. Kang, T. Tsuchiya, S. Tsutsumi, A novel non-destructive method for measuring elastic moduli of cultivated cartilage tissues Key Engineering 2007, 342-343, 853-856.
9. Tsutomu Nagira, Misao

Nagahata-Ishiguro and Toshie Tsuchiya, Effects of sulfated hyaluronan on keratinocyte differentiation and Wnt and Notch gene expression. Biomaterials 2007, 28, 844-850.

10. 山越葉子、中澤憲一、土屋利江、原子間力顕微鏡、特集号 分子イメージングー現状と展望、日本臨床、2007、2号、270-277.
11. Masato Tamai, Kazuo Isama, Ryusuke Nakaoka and Toshie Tsuchiya, Synthesis of novel β -tricalcium phosphate/hydroxyapatite biphasic calcium phosphate containing niobium ions and evaluation of osteogenic properties. J. Artificial Organs in press..
12. Rumi Sawada, Tomomi Ito and Toshie Tsuchiya, Changes in expression of genes related to cell population in human mesenchymal stem cells during in vitro culture in comparison with cancer cells. J. Artificial Organs, 2006, Vol.9, 179-184.
13. Saiffudin Ahmed, Toshie Tsuchiya, A mouse strain difference in tumorigenesis induced by biodegradable polymers, J. Biomed. Mater. Res. 2006, 79A, 409-417.
14. Masato Tamai, Ryusuke Nakaoka, Toshie Tsuchiya, Cytotoxicity of Various Calcium Phosphate Ceramics, Bioceramics, Key Material Eng. 2006, Vol.309-311, 263-266.
15. 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, Key Material Eng. 2006. Vol. 309-311, 97-100..
16. Ryusuke Nakaoka, Toshie Tsuchiya, Enhancement of differentiation and

- homeostasis of human osteoblasts by interaction with hydroxyapatite in microsphere form, *Bioceramics, Key Material Eng.* 2006, Vol. 309-311, 1293-1296.
17. 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.
 18. Ahmed, S., Tsuchiya, T., Kariya, Y*1.: 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*, 14, 81-85 (2006)
 19. Banu, N., Tsuchiya, T., Ahmed, S., Sawada, R.: 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*, 14, 87-92 (2006)
 20. Li, Y.P., Nagira, T., Tsuchiya, T.: Increase in the insulin secretion of HIT-T15 cells: Gap Junctional Intercellular Communications Enhanced by Hyaluronic. Acid *Animal Cell Technology*, 14, 263-269 (2006)
 21. Sawada, R., Ito, T., Matsuda, Y., Tsuchiya, T.: Safety evaluation of tissue engineered medical devices using normal human mesenchymal stem cells *Animal Cell Technology*, 14, 325-329 (2006)
 22. Nakamura, N., Tsuchiya, T.: Effect of biodegradable polymer poly(L-LACTIC ACID) on the cellular function of human astrocytes *Animal Cell Technology*, 14, 331-337(2006)
 23. 盛英三、望月直樹、武田壮一、井上裕美、中村俊、土屋利江、ナノレベルイメージングによる分子構造と機能解析、*日本臨床*、2006, 64 巻、358-364.
 24. 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*, 2006, 77A, 84-89.
 25. 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.
 26. 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.
 27. 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.
 28. 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.
29. 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), 181-6.
30. 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), 5138-44.
31. Ken Nakazawa, Yoko, Yamakoshi, Toshie Tsuchiya, Yasuo Ohno, Purification and aqueous phase atomic force microscopic observation of recombinant P2X2 receptor. Eur. J. Pharmacol. 2005, 518, 107-110.
32. Kazuo Isama, Toshie Tsuchiya, Osteoblast Differentiation and Apatite Formation on Gamma-Irradiated PLLA Sheets, Key Engineering Materials, 2005 288-289, 409-412
33. 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
34. 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
35. Ryusuke Nakaoka and Toshie Tsuchiya. Enhancement of differentiation and homeostasis of human osteoblasts by interaction with hydroxyapatite in microsphere form. Key Engineering Mater., 309-311, 1293-1296 (2006).
36. Ryusuke Nakaoka, Susan Hsiong and David Mooney. Regulation of chondrocyte differentiation level via co-culture with osteoblasts. Tissue Engineering, 2006, 12(9), 2425-2433.
37. 土屋利江編：再生医療における幹細胞とバイオマテリアル、松岡厚子 3章 ヒト間葉系幹細胞の一節を分担執筆、培風館（平成19年4月発刊予定）
38. 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. 77A, 84-89 (2006).
39. Fujimoto,K., Hamaguchi,H., Hashiba,T., Nakamura,T., Kawamoto,T., Sato,F., Noshiro,M., Uk,B.,Suardita, K., and Kato,Y. Transcriptional repression by the basic helix-loop-helix protein Dec2:multiple mechanism through E-box elements. International Journal of Molecular Medicine, in press.
40. Ozaki,Y., Nishimura,M., Sekiya,K., Suehiro,F., Kanawa,M., Nikawa,H., Hamada,T., Kato,Y. Comprehensive analysis of chemotactic factors for bone marrow mesenchymal stem cells. Stem Cells and Development, in press.
41. Kawamoto,T., Noshiro,M., Furukawa,M., Honda,K.K., Nakashima,A., Ueshima,T., Usui,E., Katsura,Y.,Fujimoto,K., Honma,S., Honma,K., Hamada,T., Kato,Y. Effects of fasting and re-feeding on the expression of Dec1, Per1, and other

- clock-related genes. *Journal of Biochemistry*, 140(3), in press.
42. Hasegawa N, Kawaguchi H, Hirachi A, Takeda K, Mizuno N, Nishimura M, Koike C, Tsuji K, Iba H, Kato Y, Kurihara H. Behavior of transplanted bone marrow-derived mesenchymal stem cells in periodontal defects. *J Periodontol.* 77(6):1003-7, 2006.
 43. Iwata, T., Kawamoto, T., Sasabe, E., Miyazaki, K., Fujimoto, K., Noshiro, M., Kurihara, H., Kato, Y. Effects of overexpression of basic helix-loop-helix transcription factor Dec1 on osteogenic and adipogenic differentiation of mesenchymal stem cells. *European Journal of Cell Biology*, 85, 423-431, 2006.
 44. Umemura, T., Nishioka, K., Igarashi, A., Kato, Y., Ochi, M., Chayama, K., Yoshizumi, M., Higashi, Y. Autologous bone marrow mononuclear cell implantation induces angiogenesis and bone regeneration in a patient with compartment syndrome. *Circulation Journal* 70, 1362-1364, 2006.
 45. Kayakabe, M., Tsutsumi, S., Watanabe, H., Kato, Y., Takagishi, K. Transplantation of autologous rabbit bone marrow-derived mesenchymal stem cells expanded in Vitro with FGF into joint defect with hyaluronic acid sponge. *Cytotherapy*, 8(4), 343-53, 2006.
 46. 加藤幸夫、五十嵐晃、金輪真佐美 ヒト細胞材料最新活用法 ヒト間葉系幹細胞(MSC) バイオテクノロジージャーナル, 6(6), 693-696, 2006
 47. 加藤幸夫、加家壁正知、Pan Haiou、五十嵐晃、堤真一、松原全宏、河本健、辻絃一郎、中村耕三、高岸憲二 軟骨修復に用いられる間葉系幹細胞の基本的性質 関節外科 25 卷 4 月増刊号 63-69, 2006.
 48. 加藤幸夫、辻絃一郎 再生医療の潮流と歯科への応用 *DENTAL DIAMOND* 31(443), 70-73, 2006.
 49. 加藤幸夫、久保裕嗣、清水正和、五十嵐晃、辻絃一郎、河本健、中島歩 間葉系幹細胞の基礎 (2) 間葉系幹細胞の性質腎と骨代謝, 19(4), 307-312, 2006.
 50. Hasegawa N, Kawaguchi H, Hirachi A, Takeda K, Mizuno N, Nishimura M, Koike C, Tsuji K, Iba H, Kato Y, Kurihara H. Behavior of transplanted bone marrow-derived mesenchymal stem cells in periodontal defects. *J Periodontol.* 77(6):1003-7, 2006.
 51. Xu WP, Mizuno N, Shiba H, Takeda K, Hasegawa N, Yoshimatsu S, Inui T, Ozeki Y, Niitani M, Kawaguchi H, Tsuji K, Kato Y, Kurihara H. Promotion of functioning of human periodontal ligament cells and human endothelial cells by nerve growth factor. *J Periodontol.* 77(5): 800-7, 2006.
 52. 加藤幸夫、加家壁正知、Pan Haiou、五十嵐晃、堤真一、松原全宏、河本健、辻絃一郎、中村耕三、高岸憲二 軟骨修復に用いられる間葉系幹細胞の基本的性質 関節外科 25 卷 4 月増刊号 63-69, 2006.
 53. 加藤幸夫、辻絃一郎 再生医療の潮流と歯科への応用 *DENTAL DIAMOND* 31(443), 70-73, 2006.
 54. 加藤幸夫、久保裕嗣、清水正和、五十嵐晃、辻絃一郎、河本健、中島歩 間葉系幹細胞の基礎 (2) 間葉系幹細胞の性質腎と骨代謝, 19(4), 307-312, 2006.
 55. Kato S, Hanabusa H, Kaneko S, Takakuwa K, Suzuki M, Kuji N, Jinno M, Tanaka R, Kojima K, Iwashita M, Yoshimura Y, Tanaka K., Complete

removal of HIV-1 RNA and proviral DNA from semen by the swim-up method: assisted reproduction technique using spermatozoa free from HIV-1. AIDS, 20:967-973, 2006

56. 高橋恒夫、張曉紅、伊倉宏一. 臍帯血と胎盤組織由来細胞を用いた再生医療の可能性。ティッシュエンジニアリング 2006. 田原泰彦、岡野光夫 (編)。日本組織工学会監修。日本医学館 (東京)、pp175-186, 2006.
57. Zhang X, Mitsuru A, Igura K, Takahashi K, Ichinose S, Yamaguchi S, Takahashi TA. Mesenchymal progenitor cells from chorionic villi of human placenta for cartilage tissue engineering. Biochem Biophys Res Commun. 340, 944-952, 2006.
58. Zhang X, Soda Y, Takahashi K, Mitsuru A, Bai Y, Ogi K, Satoh H, Yamaguchi S, Tani K, Tojo A, Takahashi TA. Successful immortalization of mesenchymal progenitor cells derived from human placenta and the differentiation abilities of immortalized cells. Biochem Biophys Res Commun. 351, 853-859, 2006.

2) 学会発表

1. 土屋利江、再生医療ガイドライン化、第6回日本再生医療学会 (2007, 3)
2. 土屋利江、細胞組織医療機器開発総論、第126回日本薬学会 (2006. 3)
3. 土屋利江、再生医療ガイドラインの現状、日本組織工学会 (2006. 9)
4. 土屋利江、バイオマテリアル微粒子の細胞機能への影響、第3回ナノトキシンコロジーアセスメントと微粒子・ナノチューブのバイオ応用研究会 (2006. 12)

5. T. Ito, R. Sawada, Y. Fujiwara, T. Tsuchiya 「TGF- β gene expression analysis in the human mesenchymal stem cells (hMSCs) —Relation between TGF- β and hMSCs multidifferentiation—」 The 19th annual and international meeting of the Japanese Association for Animal Cell Technology (2006. 9)
6. 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を目指したSNP解析」 第44回日本人工臓器学会 (2006. 11)
7. 澤田留美、伊藤友実、土屋利江 「幹細胞を用いた細胞組織利用医薬品・医療機器の安全性評価に関する研究」 第6回日本再生医療学会 (2007. 3)
8. 伊藤友実、澤田留美、藤原葉子、土屋利江 「ヒト間葉系幹細胞の増殖機構に及ぼす低酸素培養の影響について」 第6回日本再生医療学会 (2007. 3)
9. 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
10. 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
11. Banu Nasreen, Toshie Tsuchiya: Novel role of different tin products on chondrogenesis of human articular chondrocytes. JSAO 2005, 2005.12, Tokyo
12. Ahmed Saifuddin, Toshie Tsuchiya: Effect of stannous 2-ethylhexanoate in human normal astrocytes.

- JSAO 2005, 2005.12, Tokyo
13. Masato Tamai, Ryusuke Nakaoka, Toshie Tsuchiya: Cytotoxicity of Various calcium Phosphate Ceramics. *Bioceramics*18, 2005 12, Kyoto
 14. 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
 15. 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
 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. Ahmed Saifuddin, Toshie Tsuchiya: Novel role of modified hyaluronic acid on normal human astrocytes. 27th Annual Meeting of the Japanese Society for Biomaterials, 2005.11, Kyoto
 18. Banu Nasreen, Toshie Tsuchiya: Effects of various kinds of tin catalysts on chondrogenesis of human articular. 27th Annual Meeting of the Japanese Society for Biomaterials, 2005.11, Kyoto
 19. 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. 5th Asian Bio Ceramics Symposium (ABC2005), 2005 10, Sapporo
 20. 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 7th International Conference on Cellular Engineering, 2005.9, Korea
 21. 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
 22. 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
 23. 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
 24. 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
 25. 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
 26. 藪島由二、小園 知、長谷川千恵、岡野理紗、村松知明、佐々木和夫、土屋利江. 医療機器・医用材料の適用例に応じてエンドトキシン規格値の設定. 第28回日本バイオマテリアル学会大会（2006年11月・東京）.
 27. 藪島由二、長谷川千恵、岡野理紗、村

- 松知明, 村井敏美, 中川ゆかり, 土屋利江. ヒト細胞を使用したin vitro発熱性物質試験法の有用性評価. 第28回日本バイオマテリアル学会大会 (2006年11月・東京) .
28. 清水正和、河本健、阪恵美、五十嵐晃、金輪真佐美、山中克之、西村正宏、辻絃一郎、加藤幸夫 間葉系幹細胞システムにおける基本的デザインの追求 第19回日本軟骨代謝学会 2006年3月3日-4日 横浜市
29. 坂井裕大、瀬越和美、坂井将典、山中克之、関谷健裕、西村正宏、加藤幸夫、辻絃一郎 顎骨から穿刺法を用いて確実に間葉系幹細胞を採取する方法の検討、第5回日本再生医療学会総会 2006年3月8日-9日 岡山市
30. 五十嵐晃、河本健、邵金昌、金輪真佐美、吉橋久男、清水正和、原真依子、栗原英見、東幸仁、杉山勝、河野博隆、中村耕三、辻絃一郎、加藤幸夫 各種の骨髄より分離した間葉系幹細胞の共通マーカー遺伝子；線維芽細胞との比較 第5回日本再生医療学会総会 2006年3月8日-9日 岡山市
31. 坂井裕大、瀬越和美、金輪真佐美、久保裕嗣、清水正和、五十嵐晃、河本健、辻絃一郎、加藤幸夫 間葉系幹細胞 (MSC) と線維芽細胞 (FB) のマトリックス分解系 (MMP/TIMP) : 炎症刺激応答の検討 第16回中国・四国骨代謝研究会 平成18年7月1日 岡山市
32. 瀬越和美、五十嵐晃、清水正和、原真依子、東幸仁、栗原英見、金輪真佐美、河本健、辻絃一郎、加藤幸夫 間葉系幹細胞の蛋白マーカー ~サイトカイン定量によるアプローチ~ 第16回中国・四国骨代謝研究会 平成18年7月1日 岡山市
33. 清水正和、河本健、五十嵐晃、金輪真佐美、西村正宏、辻絃一郎、加藤幸夫 間葉系幹細胞システムにおける基本的デザインの追求 第24回日本骨代謝学会 平成18年7月6-8日 東京都
34. 金輪真佐美、五十嵐晃、瀬越和美、辻絃一郎、加藤幸夫 ヒト骨髄間葉系幹細胞の軟骨分化能は年齢とともに低下する 第24回日本骨代謝学会 平成18年7月6-8日 東京都
35. 加藤幸夫 間葉系幹細胞による再生医療：幹細胞としての特異的遺伝子発現と臨床応用 第7回鹿児島骨代謝研究会 2006年2月2日 鹿児島市
36. 加藤幸夫 ヒト骨髄間葉系幹細胞のシステムデザインと臨床応用 関西広域クラスター再生医療シンポジウム「骨軟骨を標的とした再生医療開発の現状：基礎と臨床」2006年6月16日 神戸市
37. 加藤幸夫、辻絃一郎 歯周組織と骨／軟骨の細胞治療に用いる間葉系幹細胞の培養法と性質 日本歯科技工学会 2006年9月17-18日 広島市
38. 清水正和、河本健、阪恵美、五十嵐晃、金輪真佐美、山中克之、西村正宏、辻絃一郎、加藤幸夫 間葉系幹細胞システムにおける基本的デザインの追求 第19回日本軟骨代謝学会 2006年3月3日-4日 横浜市
39. 坂井裕大、瀬越和美、坂井将典、山中克之、関谷健裕、西村正宏、加藤幸夫、辻絃一郎 顎骨から穿刺法を用いて確実に間葉系幹細胞を採取する方法の検討、第5回日本再生医療学会総会 2006年3月8日-9日 岡山市
40. 五十嵐晃、河本健、邵金昌、金輪真佐美、吉橋久男、清水正和、原真依子、

- 栗原英見、東幸仁、杉山勝、河野博隆、中村耕三、辻紘一郎、加藤幸夫 各種の骨髄より分離した間葉系幹細胞の共通マーカー遺伝子；線維芽細胞との比較 第5回日本再生医療学会総会 2006年3月8日-9日 岡山市
41. 坂井裕大、瀬越和美、金輪真佐美、久保裕嗣、清水正和、五十嵐晃、河本健、辻紘一郎、加藤幸夫 間葉系幹細胞 (MSC) と線維芽細胞 (FB) のマトリックス分解系 (MMP/TIMP) : 炎症刺激応答の検討 第16回中国・四国骨代謝研究会 平成18年7月1日 岡山市
42. 瀬越和美、五十嵐晃、清水正和、原真依子、東幸仁、栗原英見、金輪真佐美、河本健、辻紘一郎、加藤幸夫 間葉系幹細胞の蛋白マーカー ~サイトカイン定量によるアプローチ~ 第16回中国・四国骨代謝研究会 平成18年7月1日 岡山市
43. 清水正和、河本健、五十嵐晃、金輪真佐美、西村正宏、辻紘一郎、加藤幸夫 間葉系幹細胞システムにおける基本的デザインの追究 第24回日本骨代謝学会 平成18年7月6-8日 東京都
44. 金輪真佐美、五十嵐晃、瀬越和美、辻紘一郎、加藤幸夫 ヒト骨髄間葉系幹細胞の軟骨分化能は年齢とともに低下する 第24回日本骨代謝学会 平成18年7月6-8日 東京都
45. 黒田優佳子1、兼子智2、石川博通2、丸茂健2、高松潔2、運動精子の回収率向上を目的としたswim side allayの開発、1. 黒田インターナショナルメディカルリプロダクション、2. 東京歯科大学 市川総合病院 リプロダクションセンター、日本生殖医学会雑誌 51: 298, 2006
46. 郡山純子1、兼子智2、中川博之2、宮地系典2、谷垣伸治2、岡崎雅子2、吉田丈児2、郡山 智1、石川博通2、丸茂健2、高松潔2、ヒト精子核に見いだされるDNA断片のパターン解析、1. 医療法人石塚産婦人科、2. 東京歯科大学 市川総合病院 リプロダクションセンター、日本生殖医学会雑誌 51: 299, 2006
47. 兼子智1、中川博之1、宮地系典1、谷垣伸治1、岡崎雅子1、石川博通1、吉田丈児1、丸茂健1、高松潔1、斉藤 優2、配偶子のquality control - ICSIにおける穿刺精子の選択、1. 東京歯科大学市川総合病院リプロダクションセンター、2. 平塚市民病院産婦人科、日本生殖医学会雑誌 51: 298, 2006
48. 鈴木美奈1、竹山智1、加島克則1、田中憲一1、花房秀次1、兼子智2、加藤真吾3、HIV感染男性—非感染女性におけるswim up変法を用いた体外受精臨床成績について、1. 新潟大学医学部産婦人科、2. 荻窪病院血液科、3. 東京歯科大学市川総合病院産婦人科、4. 慶応義塾大学医学部微生物、第24回日本受精着床学会総会・学術講演会抄録集、p26
49. 兼子智1、郡山純子2、中川博之1、富永英一郎1、岸郁子1、北岡芳久1、谷垣伸治1、斉藤優3、高松潔1、ヒト精子核DNA中のgiga、mega、kilo-base level断片の分別観察、1. 東京歯科大学市川総合病院リプロダクションセンター、2. 石塚産婦人科、3. 平塚市民病院産婦人科、日本産科婦人科学会雑誌、58、214、2006
50. 重症心不全における細胞移植療法における同種アロ細胞の有用性の検討 第6回日本再生医療学会総会2007

年3月13－14日

51. 加藤玲子、土屋利江「間葉系幹細胞 (mesenchymal stem cells: MSCs) の免疫制御システムに関する研究」第6回日本再生医療学会 (2006. 3)

52. ISO/TC194医療機器の生物学的安全性試験国内委員会において収集した情報を審議し、我が国の専門家と意見を調整のうえ、我が国の主張をISO/TC194に提案した。

2. 実用新案登録

3. その他

H. 知的財産権の出願・登録状況

1) 特許出願

1. 加藤幸夫、邵金昌、桂由紀、辻紘一郎：動物細胞を無血清培養するための培地用添加剤、キット及びこれらの利用
(出願番号：特願 2006-006706 号、2006)
(出願人：独立行政法人科学技術振興機構、(株) ツーセル)

出願日：平成 18 年 1 月 13 日

2. 加藤幸夫、金輪 真佐美、辻 紘一郎、五十嵐 晃、久保 裕嗣、坂井 裕大：病変間葉系幹細胞の検出マーカーの利用
(出願番号：特願 2006-281733 号、2006)
(出願人：広島大学 (株)、ツーセル)

出願日：平成 18 年 10 月 16 日

3. 二川 浩樹、西村正宏、辻 紘一郎、廣本 延枝、川端 涼子：新規抗菌性ペプチド及び該抗菌性ペプチドを有効成分とする無血清培地
(出願番号：特願 2006-142505 号)
(P043P02)、2006)

(出願人：独立行政法人科学技術振興機構、
広島大学、
(株) ツーセル)

出願日：平成 18 年 5 月 23 日