

图 2

1 3. 医用材料埋植による炎症リスクアセス
メント手法開発に関する研究

中岡 竜介

医用材料埋植による炎症リスクアセスメント手法開発に関する研究

分担研究者 中岡竜介 国立医薬品食品衛生研究所 療品部 室長

研究要旨

医用材料と炎症系細胞との *in vitro* での相互作用解析を行うことで、その材料が生体内埋植後引き起こす炎症反応の程度を予測可能か検討する。2年目は、昨年に引き続き、自己組織化膜を用いた種々の組成を持つ官能基表面の調製を行い、このモデル表面上での細胞挙動変化を検討した。また、炎症系モデル細胞の探索も引き続き行った。

A. 研究目的

体内埋め込み（埋植）型医療機器での炎症反応による不具合が何例か報告されているが、その原因の1つは機器を構成する材料に起因していると考えられる。特に、生体内の過酷な環境により、機器を構成する材料の分解などに伴う物質や溶出物が炎症を引き起こしている可能性は大きい。一方、埋植型医療機器を埋植した場合には、生体と接触する機器の表面特性、例えば化学構造やその表面荒さ、材質に起因した表面自由エネルギー等に応じて、様々な生体反応が生じることが知られている。理想的には、生体内で生体組織と良くなじみ、半永久的に機能を保ち且つ生体に対して何ら障害を引き起こさないことが望ましい。しかしながら、医療機器として使用するにあたっては、一定期間必要な機能を保ち続けること、埋植可能な大きさに整形することなどの制限があるため、生体に対する影響のみを考

慮しての設計及び作製は困難である。よって、医療機器として使用する利益とその材質や形状から来る不利益とのバランスを考慮しなければならない。その不利益を評価するためには、動物を用いた埋植試験が有効であるが、近年、動物愛護運動の高まりから、社会的にそのような埋植試験の減少が求められていること、また、費用などの観点からも、*in vivo* 試験代替法の開発が急務となっている。

医療機器によって生じる埋植後の生体反応は、材料及びその溶出物による毒性以外に、その表面と周囲に存在する各種細胞との相互作用が大きな要因となる。まず、埋植直後にはその周囲組織に炎症反応が生じる。炎症反応は、材料に毒性が認められない場合でも、材料の生体適合性に応じて誘導される異物反応で生じる。この炎症は埋植後に生じる不具合の要因となりうるため、材料によって引き起こされる炎症度合を *in*

in vitro で評価・予測できる方法の開発が必要と考えられている。材料の毒性を in vitro で評価した材料毒性と埋植初期の炎症との関連性を検討する研究は既に進んでいるが、材料・細胞相互作用によって生じる炎症系細胞への影響を in vitro で評価し、実際に動物に埋植した後に誘導される炎症反応とを詳細に比較検討する試みは比較的少ない。そこで、汎用性の高い種々の医用材料や、特性を様々に変化させたモデル表面上での炎症系細胞の挙動変化を検討して、埋植後の炎症反応とその医療機器表面との関連性を明らかにすることを目的として本研究を行っている。このような研究で、より信頼性の高い in vitro での医用材料の炎症リスク評価が可能となることが期待される。本研究では、種々の表面特性をもつモデル表面の作製を試みるとともに、in vitro で炎症系細胞との相互作用解析を行い、その材料が実際に生体内に埋植された後に引き起こす生体反応、特に炎症反応程度を予測可能な手法の開発を試みる。また、これらの検討を通じて、炎症などの生体反応と材料特性との関連性の有無や、材料により引き起こされる炎症の機構を明らかにする。

B. 研究方法

本年度は、昨年度採用した金表面への自己組織化膜形成を利用した官能基表面を利用したモデル表面の作製を重点的に行った。

基材としては、マツナミ社製の円形カバーガラス（15mm 径、厚さ 0.2mm）の片面に 3nm のチタン層をコートした後に 25nm の金層をコートしたものをを用いた（村中医療器製）。

この基材を、Pirahna 溶液（濃硫酸と過酸

化水素水を 3 対 1 で混合した溶液）及び純水で洗浄、乾燥後、エタノール中で片末端にチオール基、もう片末端に種々の官能基を持つ市販の decanethiol 類と反応させることでモデル表面を調製した。今年度は市販品として入手できる試薬のみを使用した。今回、調製可能であった官能基表面は以下の 5 種類である。

1) メチル基、2) カルボキシル基、3) アミノ基、4) 水酸基、5) リン酸基

過去に、細胞の接着や接着直後の遺伝子発現変化が、材料表面の水に対する接触角に影響されることが報告されている。昨年度の研究では、単一の官能基をもつ表面上での細胞挙動変化を検討したが、それらの表面では、表面に露出している官能基の種類が異なるだけでなく、その種類の違いに応じて接触角が異なることも明らかとなっている。よって、観察された挙動変化は、これらの 2 つの要因のいずれにより大きな影響を受けているのかが明確でない。すなわち、細胞挙動変化の機構を明らかにするためには、官能基・細胞間相互作用と接触角（表面自由エネルギー）・細胞間相互作用のいずれが、あるいは両者がどの程度の割合でその変化を支配しているのか、を明らかにしなければならない。そこで、今年度は、官能基以外の表面特性指標である水に対する接触角の影響を検討する目的で、単一表面に加え 2 種類の官能基をもつ表面を調製した。できるだけ、幅広い接触角をもつ表面を調製する目的で、メチル基用試薬に対して他の試薬を種々の濃度で混合したエタノール溶液を用いて、種々のモデル表面を作製した。

具体的には、1mM の undecanethiol 溶液に

他の試薬 1mM 溶液を種々の比率で混合した溶液を用意し、そこに基材を 24 時間浸漬後、洗浄、乾燥を行い、デシケータ内に保存した。モデル表面の接触角を Sessile drop 法で、表面に存在する元素を ESCA で測定することで、調製したモデル表面の状態を確認した。

種々の官能基表面が細胞挙動に与える影響を検討するため、調製した各種モデル表面上に市販のヒト正常骨芽細胞 (NH0st) を培養し、その増殖と分化程度を評価した。10% FCS を含む α -MEM (α -MEM-10FCS) で継代培養した NH0st を所定数各種モデル表面上に播種した後、骨分化誘導因子 (β -glycerophosphate、dexamethasone、ascorbic acid) を添加した、あるいは無添加の α -MEM-10FCS で 1 週間培養を行い、所定期間毎に細胞数と ALP 活性をそれぞれ測定した。細胞数の指標としては、培地中に Tetracolor One 試薬を一定濃度になるように添加して 3 時間後に測定された吸光度を用いた。また、ALP 活性は既報に従って測定用試薬中で所定時間培養した試薬の吸光度から、既知濃度の ALP 試薬で得られた吸光度を基にその値を算出した。それらの結果を比較検討し、官能基及び接触角が細胞挙動に与える影響について考察を行った。

C. 研究結果

メチル基用試薬に対して他の官能基用試薬をモル比で 0、20、40、50、60、80、100% となるように混合したエタノール溶液を調製し、その溶液中に基材を 24 時間浸漬させることで種々の組成で 2 種類の官能基をもつ表面を得た。これらの表面上の適当な 5 点から接触角を測定した結果を図 1 に示す。

図から明らかなように、水酸基用、あるいはカルボキシル基用試薬を用いた場合には、それらの混合比率が高くなるに従って、接触角が低下していくことが認められた。ただし、水酸基用試薬を用いた場合には逆シグモイド曲線様に接触角が低下していくのに対し、カルボキシル基用試薬の場合には、角度が直線的に低下した後にカルボキシル基が 80%程度で一定値になることが認められた。また、アミノ基用、あるいはリン酸基用試薬を用いた場合には、その接触角は混合比率 20%、40%に増加するまでは直線的に低下し、その後は混合比率の増加に関わらず一定値を示すことが認められた。なお、未反応の基材表面の接触角は 81.9°であった。また、水酸基、あるいはカルボキシル基を導入した表面に関して、ESCA による表面分析を行ったところ、浸漬した溶液中の各試薬濃度が高くなるに従って酸素に起因したシグナルが強くなっていくことが認められた (図 2)。

これらのモデル表面のうち、まず、接触角の変化が細胞挙動に与える影響を検討する目的で、最も接触角変化に幅のあったメチル基と水酸基とから構成される表面上に NH0st を培養して、その増殖と分化指標となる ALP 活性変化を測定した。図 3 にその結果を示す。培養 1 日目の細胞数に着目すると、骨分化誘導因子を含まない培地を用いた場合には、表面上の水酸基量に関わらず水酸基を含む表面上の細胞数はほぼ一定であった。それに対して、骨分化誘導因子を添加した培地を用いた場合には、水酸基量が 60%程度で細胞数は極大を示した。培養時間が長くなるに従って、表面上の細胞数は水酸基量に関わらず、また骨分化誘導

因子の有無に関わらず、飽和することが認められた。ただし、メチル基単独表面上の細胞数は培養時間に関わらず少ないことが示された。また、その吸光度変化から、細胞増殖が阻害されている可能性があることが示唆された。

これら表面上で培養した NHOst の ALP 活性は、培養時間に関わらず、また水酸基量に関わらず有意な差は認められなかった。当然のことながら、骨分化誘導因子を添加した培地中の NHOst は、未添加のものと比較して常に高い ALP 活性を示したが、培養が長くなるにつれてその差は大きくなることが認められた。なお、メチル基単独表面上で 1 週間培養後の ALP 活性のみ、他の表面と比較して明らかに抑制されていることが認められた。

これらモデル表面上での検討とは別に、炎症系モデル細胞の探索を行ったが、現時点では適切な細胞、培養条件、及び評価のための指標は判明しなかった。

D. 考察

通常、*in vitro* で材料表面上に接触するのみの刺激では炎症系細胞の活性化は弱く、細胞が測定可能な量の炎症関連物質を産生しない可能性がある。そこで、実際の実験系では、細胞を材料上で培養した後に、さらに PMA や LPS などの刺激剤を添加して活性酸素や炎症関連サイトカインを測定する。よって、本実験を始める前に、添加する適切な刺激剤の量を決定する必要がある。昨年度は、種々の濃度の刺激剤を添加した THP-1 からの活性酸素産生量を測定してみたが、今回の条件では全くその産生は確認されなかった。まず、今年度は、同じ細胞

を用いて別の適切な炎症関連メディエータの探索を行ったが、現時点では適切と考えられるものが見つかっていない。そこで、別の種類の細胞を用いるための文献調査を行った。現時点までの調査では、ヒト血球系細胞が感度の点で適当と思われるので、来年度は倫理審査にその使用の可否の検討を申請し、引き続き今年度までと同様の検討を行い、本研究の目的に適した実験系の構築を行う予定である。

自己組織化膜を利用した単一官能基表面の構築は、この 10 年強の間に飛躍的に発展してきている。にも関わらず、その技術を利用して表面特性とリスクの関係を解明するためのレギュラトリーサイエンス研究は行われていない。前述したように、医療機器によって生じる埋植後の生体反応は、その表面と周囲に存在する各種細胞との相互作用、すなわち生体と材料との界面における現象を捉え、その機構を明らかにすることが非常に重要である。材料表面の特性を決定する要因の一つとして表面の化学構成、すなわち表面官能基が考えられる。様々な官能基に対する生体反応を詳細に検討してその基礎的データを蓄積していくことは、様々な材料、特に高分子材料などの有機材料などから構成される医療機器のリスク評価を行うにあたって欠かすことができないと考えられる。そこで、本研究では、汎用性の高い医用材料ではなく、自己組織化膜を用いて調製した種々の表面官能基をもつモデル表面を使用して、官能基によって生じる細胞挙動変化の検討を行っている。昨年度は、まず、6 種類の官能基からなる表面の調製を行い、その上で培養した市販のヒト正常骨芽細胞の増殖及び分化変化を検

討した。今年度は、その挙動変化が官能基を介した相互作用の結果として生じるものかどうかを確認する目的で、表面特性の指標として用いられる水に対する接触角が骨芽細胞挙動に与える影響を評価した。

今回、メチル基用試薬に対して他の官能基用試薬を混合した溶液を用いて、2種類の官能基を種々の比率でもつ表面の作製を行った。ここで問題となるのは、これら試薬の金表面への反応速度の違いである。各々の試薬間で異なるのは片末端の官能基のみであるので、その構造を考慮するとチオール基と金表面への反応はさほど差がないようにも考えられる。しかしながら、既にこれら試薬の反応性に関しては研究されており、片末端に極性基をもつものより非極性基をもつものが優先的に金表面に吸着すること、メチレン鎖が長いものの方が吸着しやすいことが報告されている。よって、単に2種類の試薬を混合して反応に用いたとしても、そのモデル表面上の官能基組成が試薬混合比と同一になることは考えられない。加えて、2種類の官能基同士、同一の官能基同士での相互作用は異なることが容易に予想されるため、各々の表面特性は予め確認しておく必要がある。事実、調製した4種類の混合官能基表面では、その混合比に応じた接触角の変化挙動が全くことなることが示されている。興味深いのは、アミノ基、あるいはリン酸基を用いた場合には、その接触角が比較的低い混合比の段階で平衡に達していることである。既報を考慮すれば、極性基試薬の反応性はメチル基試薬の反応性より劣っているはずなので、接触角変化が平衡に達したとしてもその際の混合比は極性基試薬量がかかなり多いこと

が予想される。しかしながら、今回の検討では、極性基をもつ試薬の混合比が50%にも満たないところで接触角変化が平衡に達していた。このことは、複数の官能基が存在する場合には、極性基がより表面特性に影響を与えることを示唆している。また、官能基の表面における分布状態も表面特性に影響を与えうると考えられるが、接触角測定での平均値に対する分散が小さかったことから、表面上における特定官能基の大きな局在はないことが考えられる。すなわち、溶液中での特定試薬の分散状態が偏っていることや、反応時におけるメチレン基間の疎水性相互作用を阻害するような極性官能基とメチル基との間の相互作用がないことが予想される。もちろん、2種類の官能基が混合比に応じた分散状態で表面に存在しているかは不明であり、ミクロレベル、ナノレベルでの官能基局在化が生じていることは考えられる。それら官能基の局在化で生じる相互作用の差も、観察された接触角変化に大きな影響を与えている可能性は十分考えられる。今後得られるデータを正確に解析するためには、ナノイメージング手法を用いて官能基の分散状態を明らかにする必要がある。

最も幅広い接触角変化が観察されたメチル基・水酸基表面を用いて、その上でNH₄Ostを培養してその増殖と分化変化を検討した結果、初期接着以外にその接触角に依存した挙動変化は認められず、むしろ水酸基の有無が細胞挙動に影響を与えることが示唆された。興味深いことに、骨芽細胞初期接着の接触角依存傾向は、骨分化誘導因子を培地中に添加した場合のみに認められた。つまり、骨芽細胞は分化状態に応じて材料

への接着機構が異なる可能性が示唆されたことになる。これらの結果から、材料表面の自由エネルギーよりも表面に存在する官能基のほうが細胞分化により影響を与えることが考えられる。そこで、接触角の影響を排除する目的で、同程度の接触角をもつ4種類（メチル基と水酸基、カルボキシル基、リン酸基、あるいはアミノ基）の2官能基混合モデル表面上で骨芽細胞の分化挙動変化を予備的に検討したが、4週間培養中のALP活性変化に目立った差は認められず、4週間後のカルシウム沈着量にも有意な差は認められなかった。昨年度、単独官能基表面上においてはその官能基の種類に応じて分化挙動が異なっていたことを踏まえ、来年度はより詳細な検討を行うとともに、その表面上の官能基分布を何らかの方法で検討し、その両者から官能基と細胞との相互作用機構とその影響を明らかにしていく。

また、昨年度、興味深い分化挙動を示した硫酸基表面に関しては、最近、専用の試薬が市販されたことから、来年度、硫酸基も使用した同様の研究を行い、その効果を検討する予定である。

E. 結論

市販の試薬を用いて、メチル基とその他の官能基からなる2官能基モデル表面の調製が可能であった。このモデル表面は、その官能基の存在比率に応じて表面特性が変化することが示された。これらの表面を用いて、接触角及び官能基が細胞挙動に与える影響を検討したところ、接触角よりも官能基がその挙動に比較的強い影響を与えることが示唆された。来年度は、硫酸基試薬

も使用して同様の実験を行い、官能基が細胞挙動に与える影響を検討する。

昨年度に引き続き、モデル炎症系細胞の選択と実験系の構築を試みたが、適切な細胞及び実験系は判明しなかった。来年度は、他のヒト単球由来の細胞、あるいは新鮮血を用いて実験系の構築を試みる。

参考文献

C. D. Bain, J. Evall and G. M. Whitesides, Formation of monolayers by the coadsorption of thiols on gold: Variation in the head group, tail group and solvent, *J. Am. Chem. Soc.*, 1989, 111, 7155-7164.

C. D. Bain and G. M. Whitesides, Formation of monolayers by the coadsorption of thiols on gold: Variation in the length of the alkyl chain, *J. Am. Chem. Soc.*, 1989, 111, 7164-7175.

F. 研究発表

1. 論文発表

(研究業績「欧文」)

- 1) Takashi Yamada, Duk-Young Jung, Rumi Sawada, Atsuko Matsuoka, Ryusuke Nakaoka and Toshie Tsuchiya. Effects intracerebral microinjection and intraperitoneal injection of [60] fullerene on brain function differ in rats. *J. Nanoscience Nanotechnol.* 2008, 8, 1-9.
- 2) Bayar Hexig, Ryusuke Nakaoka, Toshie Tsuchiya. Safety evaluation of surgical materials by cytotoxicity test. *J. Artif. Organs*, 2008, 11, 204-211.

(研究業績「和文」)

迫田秀行、中岡竜介、松岡厚子、土屋

利江、三次元スキャフォールドを用いた細胞培養系の評価方法の検討、国立医薬品食品衛生研究所報告、2008, 126, 76-81.

2. 学会発表

国内学会

- 1) 松岡厚子、松田良枝、中岡竜介、伊佐間和郎、配島由二、土屋利江「ポリスチレンサイズ標準粒子の細胞毒性および遺伝毒性」、日本バイオマテリアル学会シンポジウム 2008、東京、2008年11月16、17日
- 2) 中岡竜介、配島由二、土屋利江「種々の官能基表面調製とその細胞挙動への影響について」、日本バイオマテリアル学会シンポジウム 2008、東京、2008年11月16、17日

国際学会

Atsuko Matsuoka, Yoshie Matsuda, Ryusuke Nakaoka, Yuji Haishima, Masako Yudasaka, Sumio Iijima, Toshie Tsuchiya. How small aggregates must be prepared in an in vitro safety evaluation system for nanomaterials? International Symposium on "Nanotoxicology Assessment and Biomedical, Environmental Application of Fine Particles and Nanotubes" (ISNT2008), Sapporo. 2008.6.16, 17.

G. 知的財産権の出願・登録状況

なし

図1. 調製した2官能基自己組織化膜の官能基混合比率とその接触角変化

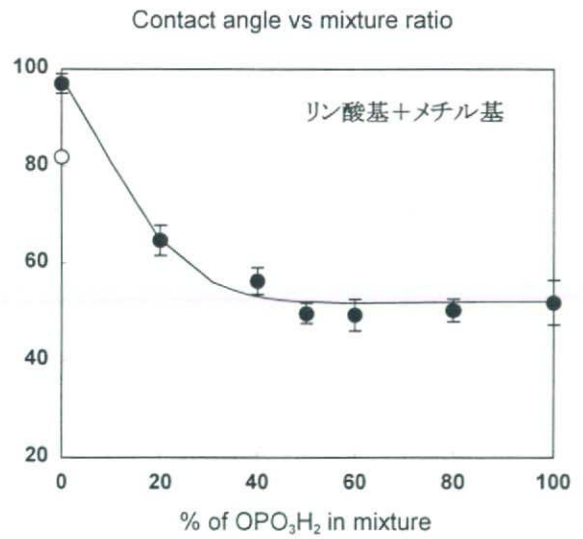
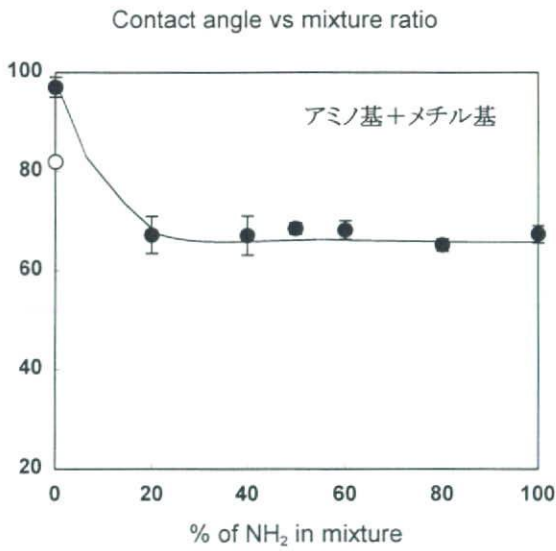
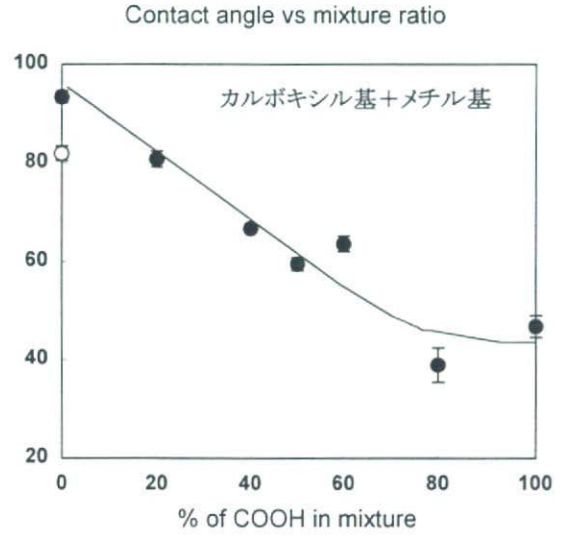
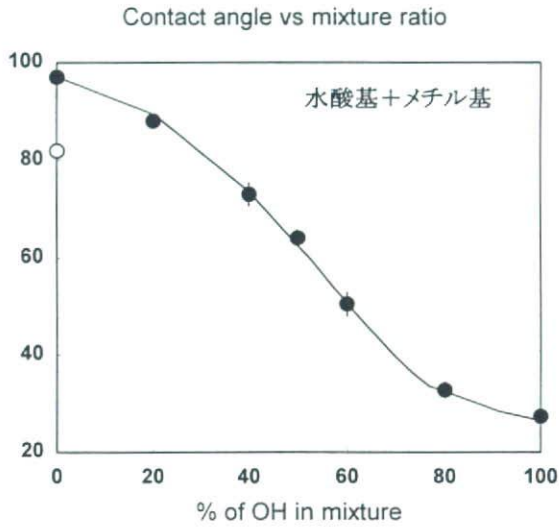
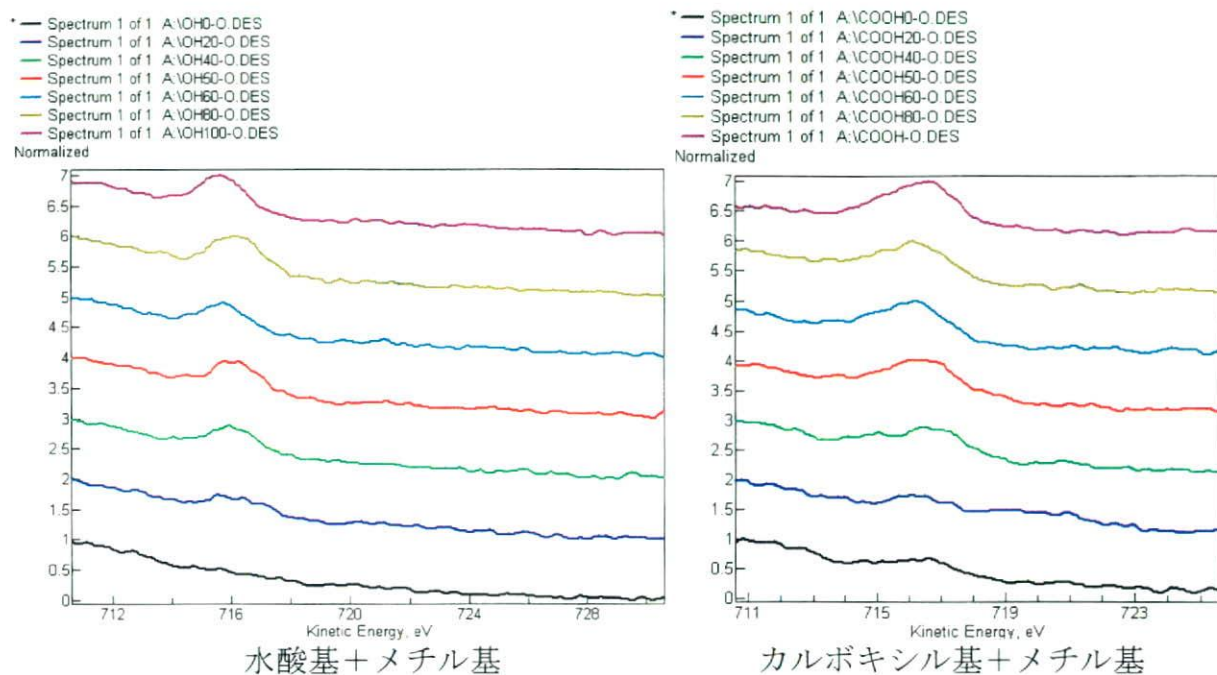


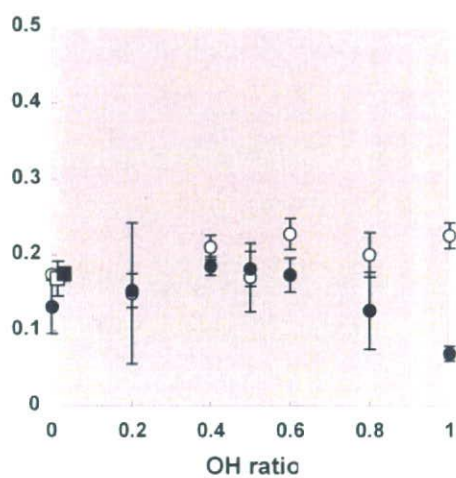
図2. 水酸基、あるいはカルボキシル基を含む2官能基自己組織化膜のESCAによる酸素元素解析



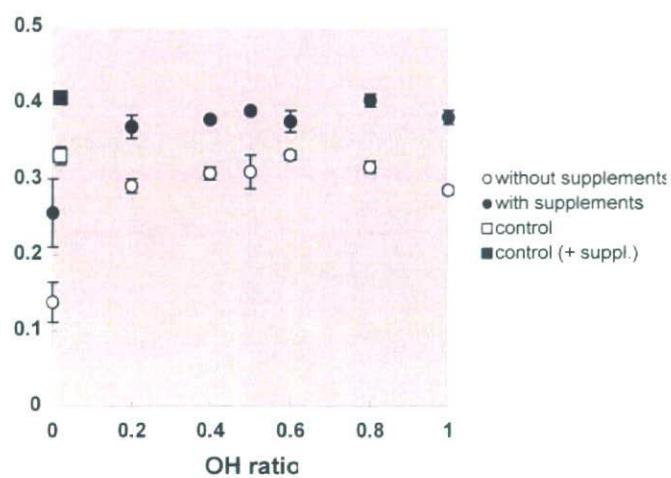
(下から水酸基 (or カルボキシル基) 0、20、40、50、60、80、100%混合溶液で反応した2官能基自己組織化膜を測定した結果)

図3. 水酸基・メチル基混合表面上で培養した NHOst の
培養1日、7日後の細胞数と ALP 活性

<細胞数>

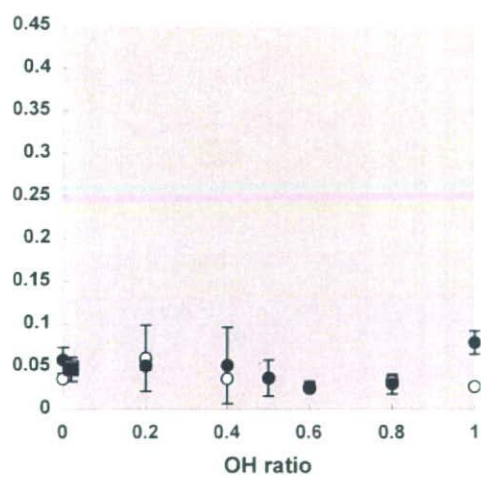


培養1日後

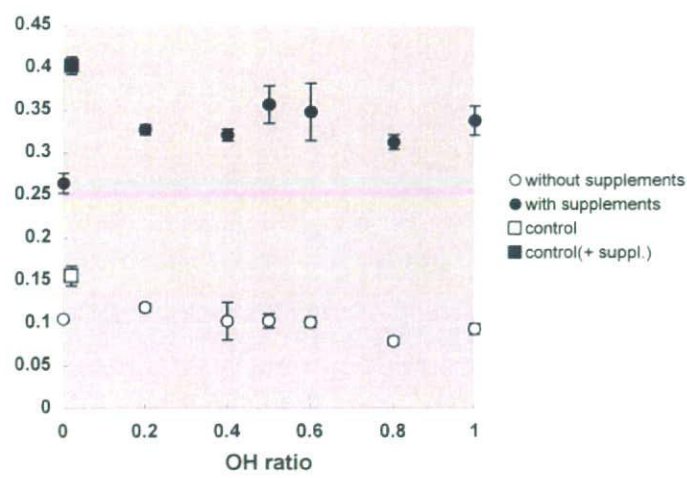


培養7日後

<ALP 活性>



培養1日後



培養7日後

研究成果の刊行に関する一覧表

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Takashi Yamada, Duk-Young Jung, Rumi Sawada, Atsuko Matsuoka, Ryusuke Nakaoka and Toshie Tsuchiya	Effects intracerebral microinjection and intraperitoneal injection of [60] fullerene on brain function differ in rats	J. Nanoscience Nanotechnol.	8	1-9	2008
Bayar Hexig, Ryusuke Nakaoka, Toshie Tsuchiya	Safety evaluation of surgical materials by cytotoxicity test	J. Artif. Organs	11	204-211	2008
迫田秀行、中岡竜 介、松岡厚子、土 屋利江	三次元スキャフオール ドを用いた細胞培養系 の評価方法の検討	国立医薬品食 品衛生研究所 報告	126	76-81	2008

III 研究成果の刊行に関する一覧表

書籍

著者氏名	論文タイトル名	書籍名	出版社名	ページ	出版年
Kazuo Isama, Toshie Tsuchiya	Gamma-ray Irradiated Poly(L-lactide) for Bone Repair	Biomaterials in Asia	World Scientific Publishing Company	254-265	2008 出版地 シンガポール
澤田留美、土屋利江	細胞組織医療機器の品質・安全性: ヒト間葉系幹細胞の遺伝子発現を指標とした特性解析	幹細胞の分化誘導と応用	エヌ・ティー・エス	496-508	2009 出版地 東京

雑誌

発表者名	論文タイトル	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Atsuko Matsuoka, Yoshie Matsuda, Ryusuke Nakaoka, Yuji Haishima, Masako Yudasaka, Sumio Iijima, Toshie Tsuchiya	Development of an in vitro screening method for safety evaluation of nanomaterials	J. Biomed. Mater. Eng.	in press		2009
Keiko Nakagawa, Kosuke Nakamura, Yuji Haishima, Makiko Yamagami, Hiromi Sakagami, Haruko Ogawa	The utility of pseudoproteoglycan (pseudoPG) probes that simulate PG macromolecular structure for screening and isolation of proteoglycan-binding proteins.	Glycocon. J.	in press		2009
Takashi Hasegawa, Kazunaga Takahashi, Masaaki Saijo, Toshiyasu Ishii, Tomoko Nagata, Masaaki Kurihara, Yuji Haishima, Yukihiko Goda, Nobuo Kawahara	Isolation and structural elucidation of cyclopentynafil and N-octylnortadafafil found in a dietary supplement.	Chem. Pharm. Bull.	57	185-189	2009
Hiroshi Asakura, Keiko Kawamoto, Yuji Haishima, Shizunobu Igimi, Shigeki Yamamoto, Sou-ichi Makinob	Differential expression of the outer membrane protein W (OmpW) stress response in enterohemorrhagic Escherichia coli O157:H7 corresponds to the viable but non-culturable stat.	Res. Microbiol.	159	709-717	2008
橋井則貴, 川崎ナナ, 高倉大輔, 伊藤さつき, 川原信夫, 正田卓司, 杉本直樹, 龍島由二, 品川麻衣, 葉信久, 宮田一義, 岡村隆志, 塚本秀樹, 千秋和久, 長谷川泰介, 河合健蔵, 余田 光, 掛樋一晃, 合田幸広, 奥田晴宏, 棚元憲一, 山口照英	ヘパリンナトリウム純度試験に関する研究(第1報) 1H-NMRによるヘパリンナトリウム不純物の分析.	医薬品研究	39	651-659	2008
Nahoko Uchiyama, Kazuhiro Saisho, Ruri Kikura-Hanajiri, Yuji Haishima, Yukihiko Goda	Determination of a new type of phosphodiesterase-5 inhibitor, thioquinapiperifil, in a dietary supplement promoted for sexual enhancement.	Chem. Pharm. Bull.	56	1331-1334	2008
Takashi Hasegawa, Masaaki Saijo, Toshiyasu Ishii, Tomoko Nagata, Yuji Haishima, Nobuo Kawahara, Yukihiko Goda	Structural Elucidation of a Tadalafil Analogue Found in a Dietary Supplement.	Shokuhin Eiseigaku Zasshi	49	311-315	2008
Hidefumi Kumada, Yuji Haishima, Kyoko Watanabe, Chie Hasegawa, Toshie Tsuchiya, Ken-ichi Tanamoto, Toshio	Biological properties the native and synthetic lipid A of Porphyromonas gingivalis lipopolysaccharide.	Oral Micobiol. Immunol.	23	60-69	2008
Atsuko Matsuoka, Yuji Haishima, Chie Hasegawa, Yoshie Matsuda, Toshie Tsuchiya	Organic-solvent extraction of model biomaterials for use in the in vitro chromosome aberration test.	J. Biomed. Mater. Res. A	86	13-22	2008
伊佐間和郎, 鹿庭正昭, 土屋利江	アクセサリー類を除く金属製品に含有する鉛及びカドミウムの分析調査	中毒研究	21	393-395	2008
中島晴信, 沢辺善之, 伊佐間和郎, 土屋利江	高分子材料中のオクテリ酸スズ(2-エチルヘキサノ酸スズ)の分析	大阪府立公衆衛生研究所研究報告	46	97-102	2008
伊佐間和郎, 鹿庭正昭, 土屋利江	キャピラリー電気泳動法によるアルカリ性洗剤中のナトリウムイオン, カリウムイオン及びモノエタノールアミンの分析	国立医薬品食品衛生研究所報告	126	71-75	2008
Machida K., Suemizu H., Kawai K., Ishikawa T., Sawada R., Ohnishi Y., Tsuchiya T.	Higher susceptibility of NOG mice to xenotransplanted tumors.	J. Toxicol. Sci	34(1)	123-127	2009

澤田留美、松岡厚子、松田良枝、土屋利江	ヒト間葉系幹細胞の <i>in vitro</i> 培養期間中の変化について—c-myc をターゲットとした遺伝子発現解析と染色体異常解析—	薬学雑誌	128(12)	1851-1856	2008
Tam P. S. Y., Sawada R., Cui Y., Matsumoto A., Fujiwara Y.	The metabolism and distribution of docosapentaenoic acid (n-6) in the liver and testis of growing rats.	Biosci. Biotechnol. Biochem.	72(10)	2548-2554	2008
Yamada T., Sawada R., Tsuchiya T.	The effect of sulfated hyaluronan on the morphological transformation and activity of cultured human astrocytes.	Biomaterials	29	3503-3513	2008
Yamada T., Jung DY, Sawada R., Matsuoka A., Nakaoka R., Tsuchiya T.	Effects intracerebral microinjection and intraperitoneal injection of [60]fullerene on braion functions differ in rats.	J. Nanosci. Nanotechnol.	8(8)	1-9	2008
Yamada T., Jung DY, Sawada R., Tsuchiya T.	Intracerebral microinjection of stannous 2-ethylhexanoate affects dopamine turnover in cerebral cortex and locomotor activity in rats.	J Biomed Mater Res B : Appl Biomater.	87B(2)	381-386	2008
Ito T., Sawada R., Fujiwara Y., Tsuchiya T.	FGF-2 increases osteogenic and chondrogenic differentiation potentials of human mesenchymal stem cells by inactivation of TGF- β signaling.	Cytotechnology	56	1-7	2008
迫田秀行	人工関節の不具合要因分析.	日本臨床バイオメカニクス学会誌	29	361	2008
迫田秀行	微小試験片を用いた人工関節用UHMWPEの疲労特性評価.	日本臨床バイオメカニクス学会誌	29	367	2008
石川 格, 澤田 留美, 加藤 幸夫, 辻 紘一郎, 邵 金昌, 山田 貴史, 加藤 玲子, 土屋 利江	新無血清培地STK2のヒト間葉系幹細胞増殖における有用性について	YAKUGAKU ZASSHI	129(3)	未定	2009
Tsunoda, M., Yoshida, T., Tsuji, M., Zhang, Y., Sugaya, Y., Inoue, Y., Miki, T. Satoh, T. and Aizawa, Y.	The effects of dibutyltin (DBT) dichloride on the viability and the productions of tumor necrosis factor α and interleukin-12 in murine macrophage cell line.	Biomedical Research on Trace Elements	19(1)	67-71	
Mitsugu Todo, Yuji Takahashi Ryuji Nagamine	Stress analysis of artificial knee joints under flexion and rotation	Tribology Online	3	211-215	2008
東藤 貢, 長嶺 隆二, 高橋 祐二	PS型人工膝関節における繰り返し屈曲動作ト脛骨インサートの塑性変形の関係について	日本臨床バイオメカニクス学会誌	29	381-387	2008

IV 研究成果の刊行物・別刷

Letter

Higher susceptibility of NOG mice to xenotransplanted tumors

Kazuhiko Machida¹, Hiroshi Suemizu², Kenji Kawai³, Tsuyoshi Ishikawa⁴, Rumi Sawada⁴,
Yasuyuki Ohnishi² and Toshie Tsuchiya⁴

¹Testing Services Department, ²Biomedical Research Department, ³Pathology Research Department, Central Institute for Experimental Animals, 1430 Nogawa, Miyamae, Kawasaki, Kanagawa 216-0001, Japan

⁴Division of Medical Devices, National Institute of Health Sciences, 1-18-1 Kimiyoga, Setagaya, Tokyo 158-8501, Japan

(Received October 17, 2008; Accepted November 14, 2008)

ABSTRACT — The purpose of tumorigenicity testing, as applied not only to cell substrates used for viral vaccine manufacture but also stem cells used for cell-based therapy, is to discriminate between cells that have the capacity to form tumors and cells that do not. Therefore, tumorigenicity testing is essential in assessing the safety of these biological materials. Recently developed NOD/Shi-*scid* IL2Rg^{null} (NOG) mice have been shown to be superior to NOD/Shi-*scid* (SCID) mice for xenotransplantation of both normal and cancerous cells. To select a suitable mouse strain as a xenogenic host for tumorigenicity testing, we compared the susceptibility of NOG (T, B, and NK cell-defective), SCID (T and B cell-defective), and the traditionally used nude (T cell-defective) mice to tumor formation from xenotransplanted HeLa S3 cells. When 10⁴ HeLa S3 cells were subcutaneously inoculated into the flanks of these mice, the tumor incidence on day 22 was 10/10 (100%) in NOG, 2/10 (20%) in SCID, and 0/10 (0%) in nude mice. The subcutaneous tumors formed reproducibly and semiquantitatively in a dose-dependent manner. Unexpectedly, half of the NOG mice (5/10) that had been inoculated with a mere 10¹ HeLa S3 cells formed progressively growing subcutaneous tumors on day 78. We confirmed that the engrafted tumors originated from inoculated HeLa S3 cells by immunohistochemical staining with anti-HLA antibodies. These data suggest that NOG mice may be the best choice as a suitable strain for testing tumorigenicity.

Key words: HeLa S3, NOD/Shi-*scid* IL2Rg^{null} (NOG), Tumorigenicity testing, Xenograft

INTRODUCTION

One of the greatest contributions of the cultured cell to health care is the production of biologicals involving viral vaccines (Balducci *et al.*, 1962; Robinson *et al.*, 1966) and humoral factors (Delzer *et al.*, 1985; Sambrook *et al.*, 1986). Recently developed cell culture technology provides us with a new application known as “stem cell therapy” in the field of regenerative medicine (Badayan and Cudkovic, 2008; Dalbello-Haas *et al.*, 2008). Stem cell-based therapy has received attention as a possible alternative to organ transplantation, owing to the ability of stem cells to repopulate and differentiate at the engrafted site. In particular, induced pluripotent stem (iPS) cells (Okita *et al.*, 2007; Takahashi *et al.*, 2007) would be the best source of patient-specific cell therapy, and thus enable us to autologously transplant without an immune rejection

because of immunological incompatibility between patient and donor. In contrast to cell substrates for producing biologicals, in cell-based therapies, the therapeutic cells must be transplanted into the patient directly. The anticipated benefit of patient-specific cell therapies has always been tempered by inherent worries concerning the undesirable growth of contaminated undifferentiated stem cells in the recipient. Although many factors (e.g., cell migration, differentiation, phenotype expression, tumorigenicity) have been involved, the transplantable therapeutic cell has always been considered a safety risk. The purpose of tumorigenicity testing, as applied not only to cell substrates used for viral vaccine manufacture but also differentiated stem cells (e.g., derived from embryonic, mesenchymal, hematopoietic stem, and iPS) used for cell-based therapy, is to discriminate between cells that have the capacity to form tumors and cells that do not.

Correspondence: Hiroshi Suemizu (E-mail: suemizu@cica.or.jp)

Recently, we developed NOD/Shi-*scid* IL2Rg^{null} (NOG) mice by crossing IL-2 receptor gamma chain-deficient (IL2Rg^{null}) mice (Ohbo *et al.*, 1996) with NOD/Shi-*scid* mice (SCID) (Koyanagi *et al.*, 1997). NOG mice lack T and B lymphocytes and natural killer (NK) cells, and demonstrate impaired dendritic cell function (Ito *et al.*, 2002, 2008; Yahata *et al.*, 2002). Because of their severe immunodeficient state, NOG mice have been used as an *in vivo* model to study human cells and tissues (Ito *et al.*, 2002; Yahata *et al.*, 2002; Matsuura-Sawada *et al.*, 2005; Masuda *et al.*, 2007; Suemizu *et al.*, 2008). NOG mice also showed superiority in cancer xenotransplantation systems compared to SCID (Nakamura and Suemizu, 2008). To select a suitable mouse strain as a xenogenic host for testing tumorigenicity, we compared the susceptibility of NOG (T, B, and NK cell-defective), SCID (T and B cell-defective), and the traditionally used nude (T cell-defective) mice for tumor formation from xenotransplanted HeLa S3 cells.

MATERIALS AND METHODS

The protocol of the present study was reviewed beforehand and approved by the Animal Ethics Committee of the Central Institute for Experimental Animals (CIEA, Kanagawa, Japan), and all animal experiments were performed according to the Ethical Guidelines for Animal Experimentation from the CIEA.

Cells

HeLa S3 (human cervical cancer cell line) cells were obtained from the Health Science Research Resources Bank (HSRRB, Osaka, Japan). The cells were maintained in F-12 (HAM) (Gibco, Carlsbad, CA, USA) supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS) (HyClone, Logan, UT, USA), incubated in a humidified (37°C, 5% CO₂) incubator, and passaged on reaching 80% confluence.

Detection of the tumorigenic cells *in vivo*

We used BALB/*cA nu/nu* (nude; Clea Japan Inc., Tokyo, Japan) and SCID (Clea Japan Inc.), and NOG mice aged 6–8 weeks. For direct comparison of susceptibility to cancer cell engraftment, various concentrations (10¹ to 10⁶ cells/head) of HeLa S3 cells suspended in 0.1 ml of serum-free medium were subcutaneously inoculated into ten mice (5 males and 5 females) of each strain. The mice were surveyed daily and tumors were measured with calipers. The tumor volume (TV) was calculated using the formula $TV = 1/2 \times A \times B^2$ (A: length (mm); B: width (mm)). The criteria for successive engraftment were as follows: progressive nodule growth at the site of

injection and TV values exceeding 10 mm³.

Histology and immunohistochemistry

The engrafted tumors were fixed with 4% (v/v) phosphate-buffered formalin, and paraffin-embedded sections were stained using hematoxylin and eosin (H&E). Some sections were autoclaved for 10 min in target retrieval solution (0.1 M citrate buffer, pH 6.0; 1 mM EDTA, pH 9.0) and then placed at room temperature for 20 min. Monoclonal mouse anti-HLA class I-A, B, C (clone EMR8-5; Hokudo, Sapporo, Japan), mouse antihuman CK8/18 (clone 5D3; Novocastra Laboratories, Newcastle, UK), and mouse monoclonal antihuman Ki67 antigen (clone MIB-1; Dako A/S, Glostrup, Denmark) were the primary antibodies used. The antibodies for mouse Ig were visualized using amino acid polymer/peroxidase complex-labeled antibodies (Histofine Simple Stain Mouse MAX PO (M); Nichirei Bioscience, Tokyo, Japan) and diaminobenzidine (DAB) (Dojindo Laboratories, Kumamoto, Japan) substrate (0.2 mg/ml 3,3'-diaminobenzidine tetrahydrochloride, 0.05 M Tris-HCl (pH 7.6), and 0.005% H₂O₂). Sections were counterstained with hematoxylin.

Statistical analyses

The differences in incidence of each engraftment were tested by Fisher's direct probability method with $p < 0.05$ as the cutoff for significance. All statistical analyses were performed using Prism 5 software (GraphPad Software, La Jolla, CA, USA).

RESULTS AND DISCUSSION

In previous reports, we demonstrated a high rate of liver metastasis in NOG mice inoculated with small numbers of pancreatic cancer cells (as few as 100 cells) and higher levels of liver metastasis in NOG mice than in SCID mice (Suemizu *et al.*, 2007). Therefore, NOG mice are expected to be better subjects for testing tumorigenicity in assessing the safety of cell substrates and therapeutic cells. The purpose of this study was to quantify the advantage of NOG mice over SCID and nude mice in terms of transplantability of human tumor cells. HeLa S3 was examined for its ability to engraft in the subcutaneous spaces of these mice (Table 1). No statistically significant differences were found in the tumorigenic incidence between male and female mice in all strains. Therefore, tumorigenic incidence was directly compared between each strain. The athymic nude mice, traditional standards for tumorigenicity testing, showed no tumor formation when HeLa S3 cells were seeded at a density

Higher susceptibility of NOG mice to xenotransplanted tumors

Table 1. Comparative growth of HeLa S3 cells among BALB/cA *nu/nu*, SCID, and NOG mice

Cell dose (cells/head)	Sex	Number of mice with tumors (% engraftment) ^a		
		BALB/cA <i>nu/nu</i>	SCID	NOG
1x10 ²	Male	NT	0/5 (0%)	3/5 (60%)
	Female	NT	0/5 (0%)	3/5 (60%)
	Total	NT	0/10 (0%)	6/10 (60%) *
1x10 ³	Male	0/5 (0%)	0/5 (0%)	3/5 (60%)
	Female	0/5 (0%)	0/5 (0%)	3/5 (60%)
	Total	0/10 (0%)	0/10 (0%)	6/10 (60%) *
1x10 ⁴	Male	0/5 (0%)	2/5 (40%)	5/5 (100%) **
	Female	0/5 (0%)	0/5 (0%)	5/5 (100%) **
	Total	0/10 (0%)	2/10 (20%)	10/10 (100%) **
1x10 ⁵	Male	5/5 (100%)	5/5 (100%)	NT
	Female	3/5 (60%)	4/5 (80%)	NT
	Total	8/10 (80%)	9/10 (90%)	NT

^a Engraftment was evaluated 22 days after inoculation by 1 x 10³, 10⁴, and 10⁵ cancer cells, and 43 days after inoculation by 1 x 10² cancer cells. Fisher's exact test was performed in statistical analysis. * P < 0.05 compared to the SCID strain. ** P < 0.01 compared to the BALB/cA *nu/nu* strain. † P < 0.05 compared to the BALB/cA *nu/nu* and SCID strain. ‡ P < 0.01 compared to the BALB/cA *nu/nu* and SCID strain. NT: not tested.

of up to 10⁵ cells. The SCID mice developed tumors with a lower cell inoculation dosage (10⁴ cells) compared to nude mice. This result supports the report stating that the implantation rate of human xenografts in subcutaneous tissue is significantly higher in SCID mice than in nude mice (Taghian *et al.*, 1993). SCID mice inoculated with 10⁴ HeLa S3 cells formed tumors within 22 days postinoculation, but at a rate of only 20% (2/10). In contrast to nude and SCID mice, all NOG mice (10/10; 100%) inoculated with 10⁴ HeLa S3 cells formed tumors within 22 days. Furthermore, 60% (6/10) of the NOG mice formed subcutaneous solid tumors within 22 days of inoculation with only 10³ HeLa S3 cells, and all NOG mice (10/10; 100%) formed tumors within 43 days (data not shown). On the other hand, no tumor formation was observed in

SCID mice within 22 days of inoculation with 10³ HeLa S3 cells, while 60% (6/10) formed subcutaneous solid tumors within 43 days (data not shown). Earlier, we demonstrated that just 10² AsPC-1, MIA PaCa-2, and PANC-1 cells (human pancreatic cancer cell lines) were needed for engraftment in NOG mice livers by intrasplenic inoculation within 56 days (Suemizu *et al.*, 2007). In this study, we examined the tumor-forming potential of subcutaneous tissue in NOG mice when inoculated with 10² HeLa S3 cells. Although the inoculation site differed from that of previous studies, the NOG mice showed a high engraftment rate (6/10; 60%) within 43 days of inoculation with 10² HeLa S3 cells, but not within 22 days (0/10; 0%, data not shown). These results demonstrate that the NOG mouse model is more sensitive for detecting tumorigenic-