

2011年度 生物工学功績賞 受賞



新分野セルプロセッシング工学の展開

高木 睦



Development of cell processing engineering

Mutsumi Takagi (Department of Biotechnology and Macromolecular Chemistry, Graduate School of Engineering, Hokkaido University, N13W8 Kita-ku, Sapporo, Hokkaido 060-8628)
Seibutsu-kogaku 90: 20-27, 2012.

高まるセルプロセッシング工学の重要性

ヒト体内に存在する生理活性タンパク質が医薬品として1980年代から注目され、その高次構造と糖鎖の維持の必要性から動物細胞培養プロセスが医薬品の生産手段として重要となった。さらに2000年代前半から数多くの抗体が優れた医薬品（抗体医薬）として開発、上市されるにつれて医薬タンパク質生産技術としての動物細胞培養プロセスの需要は飛躍的に高まった。

他方、胚性幹細胞（ES細胞）や人工多能性幹細胞（iPS細胞）に代表される再生医療の基礎研究が1990年代から急速に進歩し、それらを応用した細胞移植医療（再生医療）の実用化が期待されている。これらの移植用細胞の培養プロセスの場合、細胞の増殖だけでなく分化や3次元化（立体的な組織化）といった細胞加工（セルプロセッシング）が必要となること、培養した細胞そのものをヒトに投与することの2点が前述の医薬タンパク質生産目的の培養プロセスとは異なり、一層高度かつ安全な動物細胞培養技術が要求される。

筆者らはこれらの課題に対応する新分野セルプロセッシング工学の必要性（図1）を提起し、その確立に取り組んできた。具体的には、細胞に最適な環境、安全な培地および担体の設計から、細胞間相互作用に留意した効率的培養技術、自動培養技術、非侵襲的細胞品質評価技術といった移植用ヒト細胞培養技術への展開である^{1,2)}。

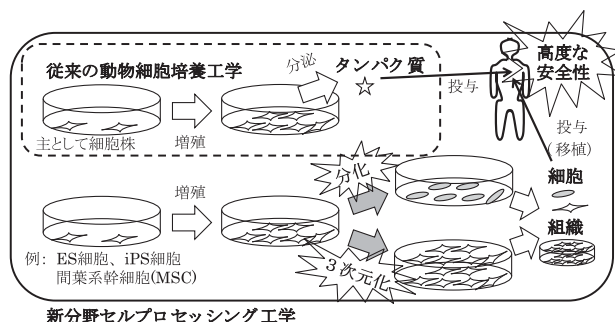


図1. 新分野セルプロセッシング工学の必要性

動物細胞特異的培養環境因子の制御培養法

静圧、浸透圧などが、動物細胞に特異的に影響する環境因子であることおよびその影響様式を明らかにし、これらの環境因子の制御により細胞活性を亢進し、細胞死（アポトーシス）を抑制することにより、血栓溶解剤（tPA）（図2）や抗体などの医薬タンパク質生産性を増大させる手法を確立した。

温度、pH、溶存酸素、培地成分などの環境因子は動物細胞培養においても制御すべき基本的環境因子として重要であり、なかでも酸素供給の方策は動物細胞の脆弱さゆえに解決の困難な課題の一つであった³⁻⁷⁾。細胞死、特に血清成分制限下の細胞死の大部分を占めるアポトーシスをミトコンドリア膜ポテンシャルの維持を介して緩和するのにアスコルビン酸リン酸エステルや還元型グル



図2. tPA 製造培養プラント

タチオンといった抗酸化剤とキレート剤などの添加が有効であることを示した⁸⁻¹⁰⁾。培地成分の枯渇に対しては主として新鮮培地への交換，すなわち培地交換が採用される。その際，培養液を細胞と使用済みの培地に分離する方法，条件なども検討した^{11,12)}。

浸透圧は動物細胞に特異的な環境因子であるとともに，塩の添加などにより比較的操作しやすい操作因子でもある。動物細胞に対して等張 (isotonic) または生理的浸透圧は通常 290～300 mOsm/kg であるが，これに対して高浸透圧 (～500 mOsm/kg) 下で動物細胞を培養すると細胞の比増殖速度は低下するが，抗体などタンパク質の比生産速度は増加するために，タンパク質生産性は等張より高い浸透圧において最適となることが知られている。ハイブリドーマ細胞の培養において，高浸透圧下では生理的浸透圧下と比較してエネルギー代謝がグルコース代謝からグルタミン代謝へとシフトする傾向があるものの，両者の和としての ATP 比生成速度は浸透圧上昇に応じて増大することを示した^{13,14)}。一般にタンパク質生産目的の細胞培養プロセスは，前半の細胞増殖期と後半のタンパク生産期に分けられる。そこで，浸透圧の経時的な上昇プロファイルを種々検討した結果，生理的浸透圧下での培養に比べて抗体生産量が約 1.4 倍に増大する結果が得られた。また，浸透圧を 1 日ごとに 300⇔500 mOsm/kg と周期的に変化させたところ，浸透圧一定の場合に比べて tPA 生産性が増大した^{15,16)}。

圧力もコストアップを伴わずに容易に操作できる環境因子であり，高静圧下では比増殖速度がほとんど低下しないが，シグナル伝達および転写活性化を介してタンパク質の比生産速度が増大することを明らかにした^{4,17-20)} (図3)。

これら種々の環境因子の制御を実行する際に細胞の生

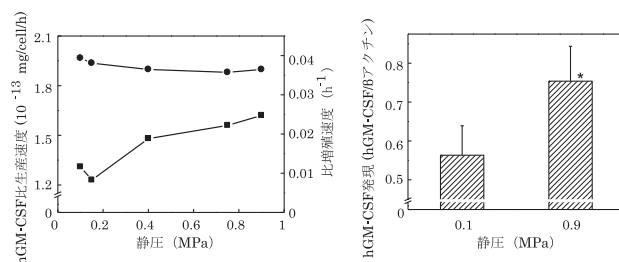


図3. 静圧がGM-CSF 生産に与える影響¹⁸⁾。組換えCHO細胞を一定静圧で静置培養した場合の比増殖速度 (●)，GM-CSF 比生産速度 (■) およびGM-CSF mRNA 発現。

理状態を把握するための重要な指標となる呼吸速度のオンライン測定方法と利用法も提案した^{21,22)}。

医療適応の安全培地設計

BSEなどの病原体を含む可能性のあるウシ胎児血清 (FCS) など動物由来成分を培地から除外するため，ヒト血清，魚類血清，組換え体タンパクなどの培地成分としての有用性を，間葉系幹細胞 (MSC) やCHO細胞の培養プロセスにおいて実証し，医療用途の細胞培養に求められる高度な安全性を確保する手法を提案した。

魚類にはヒトに感染するウイルスが報告されておらず²³⁾，魚血清はFCSより安全性が高い可能性があると考え，魚血清を利用したCHO細胞培養法について検討した。魚血清を接着増殖培養に用いる際には，熱処理と低濃度添加が重要であった。FCSの場合と異なり魚血清の高濃度添加で細胞増殖が阻害されたのは，魚血清中に高濃度で含まれる脂質が原因の一つである可能性が高いと考えられた (図4A)。一方，CHO細胞の浮遊培養では，魚

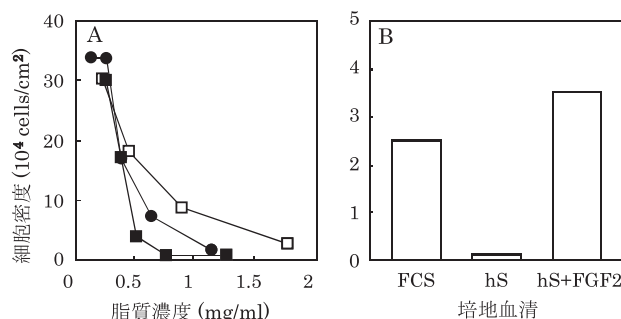


図4. 脂質濃度およびヒト血清が細胞増殖に与える影響。(A) CHO細胞。□，魚血清添加濃度1.25～10%；■，魚血清1.25%培地に魚血清から抽出した脂質を添加；●，FCS 10%培地に抽出脂質を添加²⁵⁾。(B) MSC. FCS，ウシ胎児血清10%；hS，ヒト自己血清10%；hS+FGF2，hS+FGF2 10 ng/ml を添加²⁸⁾。

血清をFCSと同様に高濃度添加できることと、熱処理する必要がないことがわかった²⁴⁻²⁶⁾。

FCSには危険性の他に幹細胞の分化に影響するという問題もあった²⁷⁾。そこで、FCSの代わりにヒト自己血清（骨髓ドナーの血清）を用いたヒト骨髓MSCの増殖を検討した。自己血清（10%）と増殖因子（FGF2, 10 ng/ml）を添加した培地を用いて、ヒト腸骨骨髓液中の有核細胞を直接ディッシュに播種し静置培養した。その結果、得られた接着細胞密度はFCS添加の場合の1.4～2.7倍であった（図4B）。本培地を用いた継代増殖において、表面抗原（CD45⁻, CD105⁺の細胞の割合）および軟骨細胞への分化能（ペレット培養）の良好な維持が確認された²⁸⁾。

細胞接着担体設計による細胞機能制御培養法

動物細胞の機能発現に必須である細胞接着をつかさどる細胞担体材料の設計に対して、プラズマ処理による親水化、タンパク質リガンドの担体結合および新規な糖リガンドの発明・活用により、動物細胞に高度な機能を発現させる手法を提案した。また、担体を用いない、より安全性の高いスキヤフォールドフリー培養法も提案した。

中空糸膜の血液側に血管内皮細胞を接着した炎症性ハイブリッド型人工肺構築^{29,30)}（図5）を目指し、疎水性ポリプロピレン中空糸膜への強固な細胞接着法を検討した。中空糸膜を0.05 mmHg NH₃雰囲気下5分間プラズマ放電処理（13.56 MHz, 30 W）し、浮遊培養用ディッシュ底面に接着剤で固定した。ここにウシ大動脈内皮細胞を播種し、静置培養したところ接着細胞密度は増加したが、せん断力1.6 dyne/cm²の層流負荷により約60%の細胞が剥離した³¹⁾。一方、エチレン・ビニルアルコール

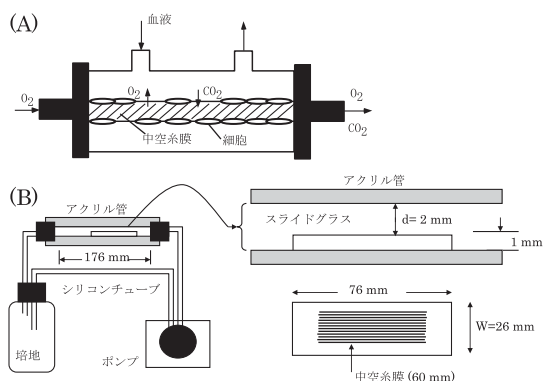


図5. ハイブリッド型人工肺^{29,31)}。(A) ハイブリッド型人工肺の概念図、(B) 中空糸膜表面への細胞接着強度の評価装置。

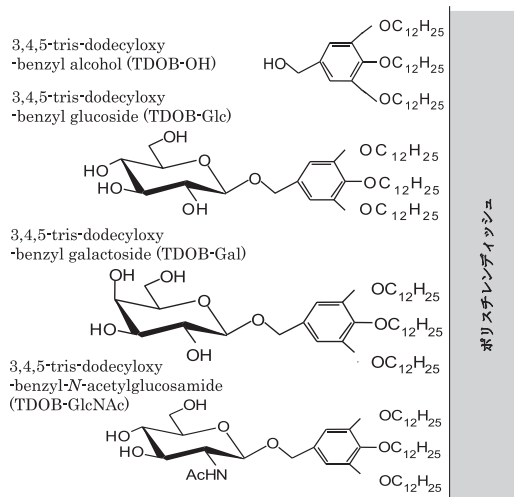


図6. 合成脂質および糖誘導体の例

ルでコートしたあとフィブロネクチンを共有結合した中空糸膜では、層流負荷（11.5 dyne/cm²）を180分間続けても95%の細胞が残存した³²⁾。

合成脂質（図6）を利用して、その骨格に、糖鎖やペプチドあるいはタンパク質などの活性リガンドを導入すれば、任意の形状を持った疎水性担体の表面に、合成脂質部分での疎水性吸着により、さまざまな活性リガンドを提示することが可能であると考え、合成脂質に結合した活性リガンドを細胞培養に応用することを検討した。単糖を結合した一群の誘導体を用いて糖鎖が提示されたポリスチレンディッシュ上で、初代ラット肝臓細胞を培養したところ、細胞接着形態に影響することなく、ガラクトースがアンモニア消費活性を、グルコースおよびガラクトースが糖新生活性をそれぞれ賦活化することが判明した³³⁻³⁵⁾。さらに、硫酸糖を結合した誘導体をコーティングした不織布を用いたヒト臍帯血造血細胞の三次元培養系で、硫酸糖が未分化造血前駆細胞の増幅を促進することも判明した^{34,36)}。

以上の技術を総合して、ヒト骨髓間葉系幹細胞を利用した軟骨再生治療法の開発にも取り組んでいる³⁷⁻⁴⁰⁾。その中でも糖がマトリックス合成に影響することが明らかとなった^{41,42)}。一方、分解物による炎症反応や病原体混入などの原因となる可能性があるこれらの担体を排除したスキヤフォールドフリー培養法の構築も試みている^{43,44)}。

細胞間相互作用による細胞機能制御培養法

細胞コミュニティ中の細胞の機能を最大限に発揮させるための細胞間相互作用コントロール培養法として、

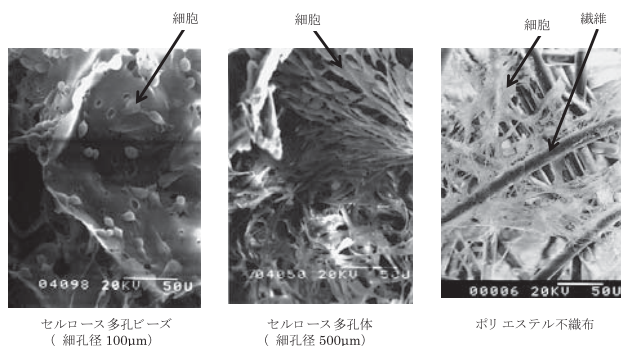


図7. 種々の多孔性担体に接着増殖したストローマ細胞

不織布などの新規多孔性担体を利用した3次元共培養法、多孔性膜を利用した隔膜共培養法⁴⁵⁻⁴⁷⁾などを提案し、未分化造血細胞の体外増幅プロセスにおいてその有効性を実証した。

体外での造血幹細胞や造血前駆細胞の増幅培養が数多く試みられているが、ほとんどすべての例で高価なサイトカインを大量に添加する必要がある。筆者らは骨髓中の造血支持細胞であるストローマ細胞の役割に注目し、三次元的（立体的）に接着培養したストローマ細胞と造血細胞とを共培養すれば、サイトカインを添加しなくても、造血前駆細胞の増幅が可能になるのではないかと考え三次元共培養系の確立を試みた。マウスストローマ細胞株を種々の多孔性担体を用いて培養した結果、ポリエステル不織布上では細胞が繊維芽状に伸展して高密度で接着することがSEMで観察された(図7)⁴⁸⁾。そこで、ウェル内に不織布を置き、マウスストローマ細胞株を播種した後に、マウス骨髓造血細胞を播種し、サイトカインを添加しない培地を用いて3週間三次元共培養した。その結果、ディッシュ底面に接着したストローマ細胞の上に造血細胞を播種した二次元共培養ではもっとも未分化な前駆細胞であるCFU-Mix数はまったく増加しなかったが、三次元共培養では約5倍に増加した^{49,50)}。一方、ストローマ細胞近傍のタンパク質量を調べた結果、明らかに三次元培養の方が二次元培養に比べて多量だった。さらに、未分化な造血細胞と親和性のある細胞外マトリックスであるラミニン $\alpha 5$ の転写量は三次元培養したストローマ細胞の方が高かった。したがって、ポリエステル不織布を用いた三次元培養では、より骨髓中に近い造血微小環境が構築されていると考えられた⁵¹⁾。他方、軟骨組織の再生には軟骨組織の環境が適していることも明らかになりつつある⁵²⁾。

移植用細胞の培養自動化

再生医療では、移植用細胞を汚染することなく培養することが重要である。そのために、CPC（Cell Processing Center）においてGMPに準拠して細胞は培養されているが、CPCは建設費、維持費ともに高価である上、培養作業者にもクリーン衣の着用など、大きな負担がかかるとともに、人件費も過大になる。これに対して、間違いを起こすことなく、クリーンに作業を行うことは、半導体作業などで発展したクリーンロボットを中心とした自動機械の得意とするところである。また、培養作業の途中には、顕微鏡観察などを行い、継代時期などの判断が必要とされるが、後述の非侵襲的細胞品質評価技術を使い、自動化可能と考えた。しかし、患者自身の細胞を培養後に元の患者に移植する自家移植が再生医療の主流であるが、1ロット（1患者）の自家細胞の培養を1台の培養装置で行うと培養装置のコストパフォーマンスが極めて悪くなる。一方、1台の培養装置で多ロット（多検体、たとえば100人の患者の細胞）を同時に並行して培養することは物理的には可能であるが、異なるロットの自家細胞の間での病原体を含めた種々の混入事故をいかにして防ぐかという課題がある。これに対して筆者らは、培養装置の内部を複数のインキュベーター部と1つの操作・診断部に隔離できる構造とすることで解決することを提案し、再生医療用の自動細胞培養装置（図8）を試作し、信州大学附属病院先端医療センターで自動培養が手動培養と同成績である事を実証した⁵³⁾。また培養のみならず培養用の細胞の採取の自動化も検討した⁵⁴⁾。

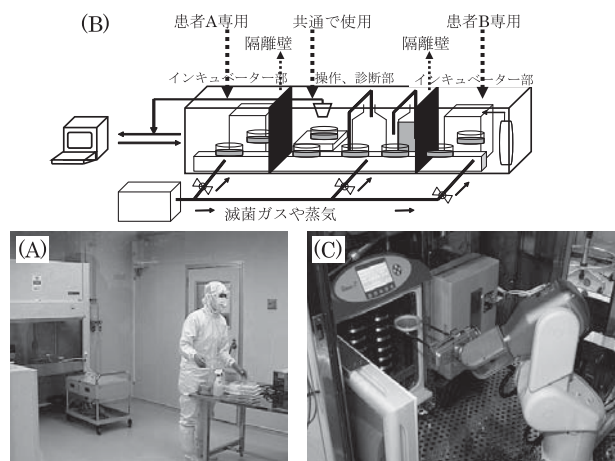


図8. 多患者細胞対応型自動培養装置のイメージ。(A) CPCでの手作業；(B) 多患者細胞対応型自動培養装置の概念；(C) クリーンロボットによる作業。

移植用細胞の非侵襲的品質評価法

ヒト由来の自家細胞の培養プロセスで生産される移植用の細胞集団は一般にきわめてヘテロであるため、品質管理の観点から、細胞品質の非侵襲的評価法の開発が急務であることを提唱した。培養上清中の代謝物解析や、接着細胞の平面形状解析が、幹細胞の分化度評価に有効であることを明らかにするとともに、新規に考案した光学顕微鏡を用いた細胞の立体形状および屈折率解析により個々の細胞の細胞周期やガン化の有無を評価できることを明らかにした。

再生医療の産業化のためには高度な安全性が求められる。すなわち、「ヒト由来細胞・組織加工医薬品などの品質および安全性の確保に関する指針」では、細胞・組織の採取、保存、運搬、培養のプロセスの一貫した品質管理システムの構築が求められている。これは移植用細胞や組織の製造に特有な問題ではなく、一般の医薬品製造においても同じ考え方がある。製造プロセスの品質管理システムを確立するためには製品の品質評価技術が不可欠である。医薬品製造における製品の品質評価技術としては、製品ロットから抜き出した検体について、製品の化学組成、不純物含量、水分含量などの多くの測定項目について測定を行う方法がほぼ確立されている。

一方、再生医療の主流である自家移植では、必要以上に多量の細胞を患者から採取できない、細胞を体外増幅できる代数に限りがある、代数を経ると細胞増殖能や分化能が低下する、経済的に培養期間を短くする必要があるなどの理由から、移植に必要な最低限の量の移植用細胞や組織しか培養により得られない。したがって、自家移植では、移植用細胞や組織に対して統計処理可能な抜き取り検査は困難である。そのため、自家移植用細胞や組織の品質評価のためには、移植に供しようとする細胞や組織が培養器に入ったままで、かつ移植成績に影響を与えない方法で品質評価する必要がある。すなわち、非侵襲的に、非破壊的に、短時間での品質評価が必要と考えられた。しかし、染色観察、フローサイトメトリー、動物への移植など従来の品質評価方法は侵襲的、破壊的で長時間を要するため、移植用自家細胞や組織の品質評価には適用できない。したがって、細胞および組織の非侵襲的品質評価技術が新たに必要となると、筆者らは考えた。

ヒト骨髄MSCから軟骨細胞への分化培養および脱分化した軟骨細胞の再分化培養における培養上清のメラノマ阻害活性（MIA）分析の結果、分化度すなわち

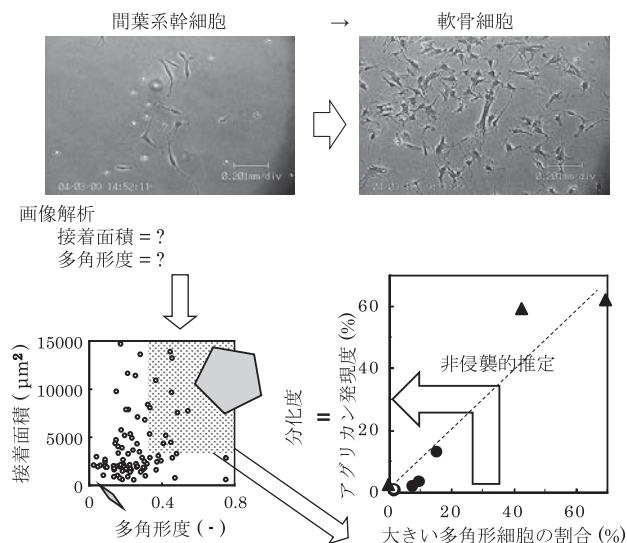


図9. 間葉系幹細胞から軟骨細胞への分化誘導培養における分化度の細胞形態解析による非侵襲的推定

軟骨に特有な細胞外マトリックスであるアグリカンの遺伝子発現度とMIA比生産速度との間に良好な正の相関関係が得られた。したがって、培養上清中のMIA定量から、非侵襲的に軟骨細胞への分化度を推定できる可能性が示されたが、個々の細胞の分化度は本方法では得られない⁵⁵⁾。

そこで、細胞の機能や分化状態の変化は細胞形態の変化に表れる場合が多いことから、まず単層培養での細胞形態分析による分化度推定を試みた。たとえば、分化誘導因子を添加した培地を用いて、ヒト骨髄MSCから軟骨細胞への分化誘導培養を行うと、アグリカンの遺伝子発現度は経時的に増大した⁵⁶⁾。この間の位相差顕微鏡観察では、分化誘導因子無添加の培養では細胞形態はもとの繊維芽状のままでほとんど変化しなかったが、分化誘導因子存在下では多角形様の細胞が次第に多くなった(図9)。これらの位相差顕微鏡画像中の各細胞の面積(A)および長径(L)を計測し、個々の細胞について次式で定義する多角形度(PI)を算出した。

$$PI = A/L^2 \quad (1)$$

分化培養における顕微鏡画像中の各細胞についてPIに対してAをプロットすると、AとPIの両方が大きい細胞が分化培養では経時的に増大することがわかった。さらに、AとPIの両方が大きい細胞(大きい多角形細胞)が含まれる割合とアグリカンの遺伝子発現度との間に相関が認められた。すなわち、細胞形態の解析により軟骨

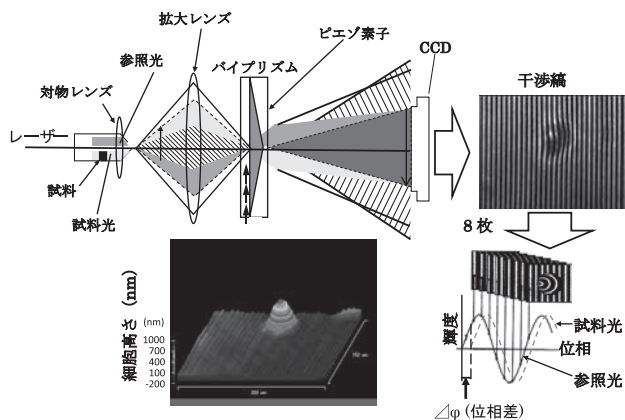


図10. 位相シフトレーザー顕微鏡により得られる細胞立体形状

細胞への分化度を非侵襲的・非破壊的に診断できることが示された⁵⁷⁾。

位相差顕微鏡をはじめとする通常の顕微鏡では、2次元培養における接着細胞の立体形状の定量はできない。近年、電子部品の計測用に開発された位相シフトレーザー顕微鏡 (phase shift laser microscope, PLM (エフケー光学研究所))⁵⁸⁾ (図10) では、光軸の片側に置いた観察対象物を透過するレーザー光と光軸の反対側の観察対象物のない部分を透過したレーザー光との間に生じる干渉縞画像を8枚取得し、対象物の厚みと屈折率に起因する位相差を視野内の1画素ごとに定量できる。すなわち、対象物の厚みを d 、対象物の屈折率を n_c 、媒質の屈折率を n_0 とすると、位相差 $\Delta\Phi$ は次式で表される。ただし、 λ はレーザーの波長である。

$$\Delta\Phi = (2\pi/\lambda) \times (n_c - n_0) \times d \quad (2)$$

この位相差 $\Delta\Phi$ を視野内の1画素ごとにプロットすると、細胞の位相差分布図が得られる。また、細胞の屈折率も PLM を用いて求めることができるので、厚みの分布図の描画、すなわち細胞の立体形状の定量ができる。すなわち、ディッシュで接着培養したヒト臍帯静脈内皮細胞 (HUVEC)、MSC および CHO 細胞について固定せずに PLM で求めた厚み (高さ) は、固定後原子間力顕微鏡 (AFM) により求めた高さにほぼ一致した。また、PLM で測定した浮遊 CHO 細胞 (ほぼ球状) の高さは同一細胞の直径に近い値を示した⁵⁹⁾。さらに、浸透圧による CHO 細胞の高さの差異を PLM でも AFM でも定量できた⁵⁹⁾。このように PLM を用いることにより、細胞を固定することなく、培養中に30秒程度の短時間で細胞の立体形状を非侵襲的に定量できることを筆者らは明ら

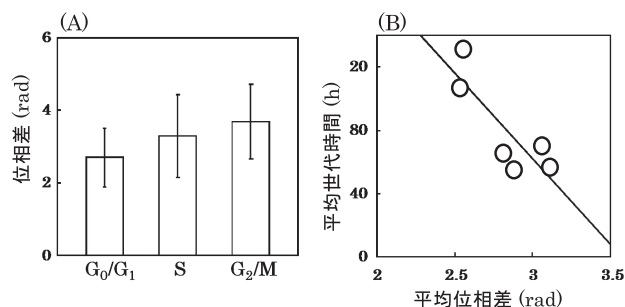


図11. 位相シフトレーザー顕微鏡による細胞周期および増殖速度の推定. (A) 各細胞周期の細胞の位相差, (B) 平均位相差と平均世代時間の関係。

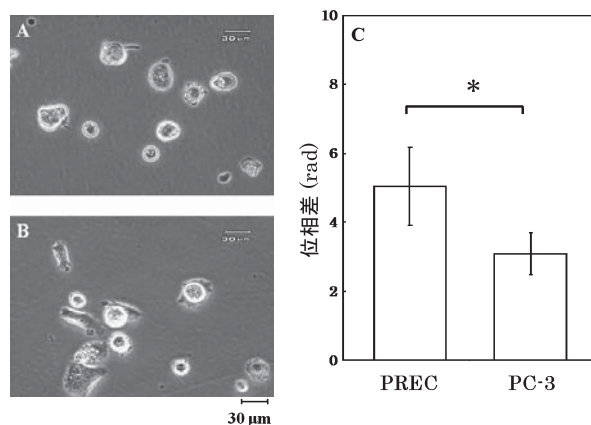


図12. 位相シフトレーザー顕微鏡による正常細胞とがん細胞の識別. (A) 正常ヒト前立腺上皮細胞 (PREC) の形態, (B) ヒト前立腺上皮ガン細胞 (PC-3) の形態, (C) PREC 細胞と PC-3 細胞の位相差の比較。

かにした。

次に2次元培養における細胞の細胞周期および増殖速度の PLM による非侵襲的推定を試みた。CHO 細胞およびヒト MSC を2次元同調または非同調培養し、BrdU と DAPI で染色し各細胞の細胞周期を決定すると共に、PLM で各細胞の位相差を定量した。その結果、同調培養、非同調培養ともに、G₂/M 期細胞の位相差は他の周期の細胞の位相差に比べて有意に高かった。また、細胞集団の平均位相差と平均世代時間の間には明確な負の相関が認められた。以上から、MSC の細胞周期および増殖速度を PLM を用いて非侵襲的に推定できる可能性が示された^{60,61)} (図11)。

移植用細胞の品質のうち最も重要なものの一つがガン化の有無である。そこで、正常細胞とガン細胞の PLM を用いた非侵襲的識別を試みた。2次元培養した正常ヒト前立腺上皮細胞 (PREC) およびヒト前立腺上皮ガン

細胞 (PC-3) の細胞形態に差異は認められなかったが、PLMで測定したPC-3の位相差はPRECの位相差に比べて明らかに小さかった (図12)。同様にヒト肝ガン細胞株 (Hep3B, HLF, Huh-7, PLC) の位相差はヒト凍結肝細胞の位相差に比べて顕著に小さかった。このようにガン細胞と正常細胞はPLMによる位相差測定により識別可能と考えられた。実際に、PREC細胞集団にPC-3細胞が10%混入した細胞集団の位相差測定によりPC-3細胞の混入が検出できた⁶²⁾。

最後に

セルプロセッシング工学の主たる対象産業分野のひとつである再生医療に関する基礎研究は、iPS細胞の例に代表されるように目覚ましい進展を留まることなく遂げ続けており、しかも我が日本がリードしている部分も少なからずある。それに対して、再生医療の日本での産業化はJ-TEC社による培養皮膚を除くと遅々として進んでいない。このおもな原因は法整備の遅れなど官にあると言われているが、これはセルプロセッシング工学の遅れに対する猶予であると筆者は考えている。たとえば、幹細胞の分化には通常数週間も要し、しかも目的の細胞に分化する幹細胞の割合は50%に達しないこともあり、プロセス工学的には極めて不満足な現状である。この例のようにセルプロセッシング工学が解決すべき研究課題はまだまだ山積しており、セルプロセッシング工学の研究開発に従事する諸氏の活躍に期待したい。筆者も微力ながら努力したいと考えている。

本研究は他方面の共同研究者の協力を得て、主として旭化成株式会社ライフサイエンス総合研究所、大阪大学生物工学国際交流センター吉田敏臣研究室および北海道大学大学院工学研究院細胞培養工学研究室で行われたものです。旭化成株式会社ライフサイエンス総合研究所新薬開発研究部においては林紘部長以下血栓溶解剤ティッシュプラスミノゲンアクティベータ (tPA) 開発グループのみなさん全員と共に、1983～1990年の前臨床試験、臨床試験、製造承認申請、工場設計、建設と当時としては手本のない研究開発の中で行わせていただいたものです。また、この分野への参加を後押ししていただきました平野惇博士、北嶋伸雄氏にも感謝致します。さらに大阪大学生物工学国際交流センターでは、吉田敏臣教授に新しい研究の方向性に関して示唆に富んだご指導をいただき、中嶋幹男博士のほか多くの学生諸氏の協力に、また北大の藤原政司博士ほか研究室の多くの学生諸氏の協力に感謝します。ご指導賜りました脇谷滋之教授、澤芳樹教授、三澤弘明教授、細川陽一郎博士、相馬俊裕教授をはじめとする多くの共同研究先の先生方、協力頂いた会社の皆様方に感謝致します。また切磋琢磨しながらセルプロセッシング工学分野の開発にと

も向き合って頂いたセル&ティッシュエンジニアリング研究部会およびセルプロセッシング計測評価研究部会の会員諸氏にも感謝致します。

文 献

- 1) 高木 睦：再生医療, **2**(4), 17–22 (2003).
- 2) 高木 睦：セルプロセッシング工学—抗体医薬から再生医療まで—, コロナ社 (2007).
- 3) Takagi, M. and Ueda, K.: *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **41**, 565–570 (1994).
- 4) Takagi, M., Okumura, H., Okada, T., Kobayashi, N., Kiyota, T., and Ueda, T.: *J. Ferment. Bioeng.*, **77**, 301–306 (1994).
- 5) Takagi, M. and Ueda, K.: *J. Ferment. Bioeng.*, **77**, 394–399 (1994).
- 6) Takagi, M., Kiyota, T., and Ueda, K.: *J. Ferment. Bioeng.*, **78**, 269–271 (1994).
- 7) Takagi, M., Hia, H. C., Jang, J. H., and Yoshida, T.: *J. Biosci. Bioeng.*, **91**, 515–521 (2001).
- 8) Yun, Z., Takagi, M., and Yoshida, T.: *J. Biosci. Bioeng.*, **91**, 581–585 (2001).
- 9) Yun, Z., Takagi, M., and Yoshida, T.: *J. Biosci. Bioeng.*, **95**, 124–127 (2003).
- 10) Yun, Z., Takagi, M., and Yoshida, T.: *J. Biosci. Bioeng.*, **96**, 59–64 (2003).
- 11) Takagi, M., Hayashi, H., and Yoshida, T.: *J. Biosci. Bioeng.*, **88**, 693–695 (1999).
- 12) Takagi, M., Ilias, M., and Yoshida, T.: *J. Biosci. Bioeng.*, **89**, 340–344 (2000).
- 13) Takagi, M., Hayashi, H., and Yoshida, T.: *Cytotechnology*, **32**, 171–179 (2000).
- 14) Lin, J., Takagi, M., Qu, Y., Gao, P., and Yoshida, T.: *J. Biosci. Bioeng.*, **87**, 255–257 (1999).
- 15) Lin, J., Takagi, M., Qu, Y., Gao, P., and Yoshida, T.: *Cytotechnology*, **29**, 27–33 (1999).
- 16) Takagi, M., Moriyama, T., and Yoshida, T.: *J. Biosci. Bioeng.*, **91**, 509–514 (2001).
- 17) Takagi, M., Ohara, K., and Yoshida, T.: *J. Ferment. Bioeng.*, **80**, 619–621 (1995).
- 18) Gong, H., Takagi, M., Moriyama, T., Ohno, T., and Yoshida, T.: *J. Biosci. Bioeng.*, **94**, 271–274 (2002).
- 19) Gong, H., Takagi, M., and Yoshida, T.: *J. Biosci. Bioeng.*, **96**, 79–82 (2003).
- 20) Fujiwara, M., Koizumi, S., and Takagi, M.: *J. Biosci. Bioeng.*, **104**, 510–512 (2007).
- 21) Takagi, M. and Ueda, K.: *J. Ferment. Bioeng.*, **77**, 709–711 (1994).
- 22) Takagi, M. and Ueda, K.: *J. Ferment. Bioeng.*, **77**, 655–658 (1994).
- 23) 吉水 守, 笠井久会：化学と生物, **43**, 46–58 (2005).
- 24) Fujiwara, M., Tsukada, R., Tsujinaga, Y., and Takagi, M.: *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **75**, 983–987 (2007).
- 25) Fujiwara, M., Tsukada, R., Shioya, I., and Takagi, M.: *Cytotechnology*, **59**, 135–141 (2009).
- 26) Fujiwara, M., Aizu, Y., Shioya, I., and Takagi, M.: *J. Biosci. Bioeng.*, **109**, 307–309 (2010).
- 27) Yokoyama, M., Miwa, H., Maeda, S., Wakitani, S., and

- Takagi, M.: *J. Biosci. Bioeng.*, **106**, 46–50 (2008).
- 28) Takagi, M., Nakamura, T., Matsuda, C., Hattori, T., Wakitani, S., and Yoshida, T.: *Cytotechnology*, **43**, 89–96 (2003).
- 29) Inoue, T., Takagi, M., Sawa, Y., Shirakura, R., and Yoshida, T.: *Jpn. J. Artif. Organs*, **25**, 811–815 (1996).
- 30) Ohata, T., Sawa, Y., Ohtake, S., Takagi, M., Inoue, T., Yoshida, T., and Matsuda, H.: *Circulation*, **98**, II-269–II-274 (1998).
- 31) Takagi, M., Haraguchi, T., Kawai, H., Shiwaku, K., Inoue, T., Sawa, Y., Matsuda, H., and Yoshida, T.: *J. Artif. Organs*, **4**, 220–225 (2001).
- 32) Takagi, M., Shiwaku, K., Inoue, T., Shirakawa, Y., Sawa, Y., Matsuda, H., and Yoshida, T.: *J. Artif. Organs*, **6**, 222–226 (2003).
- 33) Takagi, M., Nomura, K., Sato, R., Toma, K., and Yoshida, T.: *J. Artif. Organs*, **4**, 315–319 (2001).
- 34) Takagi, M., Matsuda, C., Sato, R., Toma, K., and Yoshida, T.: *J. Biosci. Bioeng.*, **93**, 437–439 (2002).
- 35) Sato, R., Toma, K., Nomura, K., Takagi, M., Yoshida, T., Azefu, Y., and Tamiaki, H.: *J. Carbohydrate Chemistry*, **23**, 375–388 (2004).
- 36) Okamoto, T., Takagi, M., Soma, T., Ogawa, H., Kawakami, M., Mukubo, M., Kubo, K., Sato, R., Toma, K., and Yoshida, T.: *J. Artif. Organs*, **7**, 194–202 (2004).
- 37) Takagi, M., Fukui, Y., Wakitani, S., and Yoshida, T.: *J. Biosci. Bioeng.*, **98**, 477–481 (2004).
- 38) Nakahara, M., Takagi, M., Hattori, T., Wakitani, S., and Yoshida, T.: *Cytotechnology*, **47**, 19–27 (2005).
- 39) Takagi, M., Umetsu, Y., Fujiwara, M., and Wakitani, S.: *J. Biosci. Bioeng.*, **103**, 98–100 (2007).
- 40) Iwai, R., Kumagai, Y., Fujiwara, M., Wakitani, S., and Takagi, M.: *J. Biosci. Bioeng.*, **110**, 593–596 (2010).
- 41) Nishimoto, S., Takagi, M., Wakitani, S., Nihira, T., and Yoshida, T.: *J. Biosci. Bioeng.*, **100**, 123–126 (2005).
- 42) Kagita, E., Ikeda, M., Wakitani, S., and Takagi, M.: *J. Biosci. Bioeng.*, **109**, 51–54 (2010).
- 43) Maeda, S., Fujitomo, T., Okabe, T., Wakitani, S., and Takagi, M.: *J. Biosci. Bioeng.*, **111**, 489–492 (2011).
- 44) Niyama, K., Ide, N., Onoue, K., Kwaguchi, A., Okabe, T., Wakitani, S., and Takagi, M.: *J. Orthop. Sci.*, **16**, DOI: 10.1007/s00776-011-0120-9 (2011).
- 45) Takagi, M., Horii, K., and Yoshida, T.: *J. Artif. Organs*, **6**, 130–137 (2003).
- 46) Takagi, M., Kubomura, D., and Yoshida, T.: *J. Biosci. Bioeng.*, **88**, 200–204 (1999).
- 47) Takagi, M., Iemoto, N., and Yoshida, T.: *J. Biosci. Bioeng.*, **94**, 365–367 (2002).
- 48) Takagi, M., Sasaki, T., and Yoshida, T.: *Cytotechnology*, **31**, 225–231 (1999).
- 49) Tomimori, Y., Takagi, M., and Yoshida, T.: *Cytotechnology*, **34**, 121–130 (2000).
- 50) Sasaki, T., Takagi, M., Soma, T., and Yoshida, T.: *Cytotherapy*, **4**, 285–291 (2002).
- 51) Sasaki, T., Takagi, M., Soma, T., and Yoshida, T.: *J. Biosci. Bioeng.*, **96**, 76–78 (2003).
- 52) Iwai, R., Fujiwara, M., Wakitani, S., and Takagi, M.: *J. Biosci. Bioeng.*, **111**, 357–364 (2011).
- 53) 中嶋勝己, 金澤秀和, 高木 睦, 脇谷茂之, 稲木 誠: 炎症と再生, **29**, 131–134 (2009).
- 54) Takagi, M., Yoshioka, Y., and Wakitani, S.: *J. Biosci. Bioeng.*, **109**, 73–74 (2010).
- 55) Onoue, K., Kusubashi, K., Sato, Y., Wakitani, S., and Takagi, M.: *J. Biosci. Bioeng.*, **111**, 594–596 (2011).
- 56) Matsuda, C., Takagi, M., Hattori, T., Wakitani, S., and Yoshida, T.: *Cytotechnology*, **47**, 11–17 (2005).
- 57) Takagi, M., Kitabayashi, T., Koizumi, S., Hirose, H., Kondo, S., Fujiwara, M., Ueno, K., Misawa, H., Hosokawa, Y., Masuhara, H., and Wakitani, S.: *Biotechnology Letters*, **30**, 1189–1195 (2008).
- 58) Endo, J., Chen, J., Kobayashi, D., Wada, Y., and Fujita, H.: *Appl. Opt.*, **41**, 1308–1314 (2002).
- 59) Takagi, M., Kitabayashi, T., Ito, S., Fujiwara, M., and Tokuda, A.: *J. Biomed. Opt.*, **12**, 54010 (2007).
- 60) Ito, S. and Takagi, M.: *Biotechnology Letters*, **31**, 39–42 (2009).
- 61) Tokumitsu, A., Wakitani, S., and Takagi, M.: *Cytotechnology*, **59**, 161–167 (2009).
- 62) Tokumitsu, A., Wakitani, S., and Takagi, M.: *J. Biosci. Bioeng.*, **109**, 499–503 (2010).