

## 生体適合性・機能性に優れた材料と評価技術の開発に関する研究

所 属 国立医薬品食品衛生研究所 療品部  
研究者 土屋 利江

### 分担研究者

(1)国立医薬品食品衛生研究所 療品部	中岡竜介
(2)鐘淵化学工業株式会社 ライフサイエンス RD センター	増田茂樹
(3)テルモ(株) 研究開発センター	片倉健男
(4)株式会社 高研 高研バイオサイエンス研究所	阿蘇 雄
(5)株式会社 メニコン 総合研究所	今安正樹
(6)宇部興産株式会社 高分子研究所(千葉)	坂井正宗
(7)生化学工業株式会社 中央研究所	荻谷 豊

**要旨** 多糖類誘導体の新生物活性を発見した。ヒトバイオ軟骨の分化と力学的強度や、ヒト皮膚繊維芽細胞の重要なサイトカイン産生能とコネキシン機能とは密接な関係があった。バイオ軟骨の力学的・電気化学的評価指標と測定機器の試作を行った。3次元角膜上皮組織の *in vitro* 作製、器官形成膜開発、ハニカム構造調製法、コラーゲン・ゼラチン変性度と生体影響評価を行った。

### 1. 研究目的

21世紀の新医療技術として細胞工学に基づく人工臓器、医療機器の研究開発が進められているが、これらで使用される最適な材料は未だ少ない。13-14年度において、(1)材料設計、可溶性因子、力学的刺激等に注目して、力学的に強度のあるバイオ軟骨を作製する。また、分化指標とその機能維持に重要なコネキシン機能評価もおこなう。更に、細胞間連絡機能亢進・抑制作用に注目し、新たな薬理活性を有する多糖類を検索し、バルーンカテーテル等による血管再狭窄を抑制できる安全性の高い新規材料の開発を行う。(2)バイオ軟骨の機能および力学的特性評価法の調査と評価機器の設計・製作と、三次元マトリックスの設計・調製を行う。(3)生体適合性・機能性に優れた多糖類の新規探索・創製を行うために、フコース分岐含量を低減化した複数のコンドロイチン硫酸誘導体を合成し、t-PAを介したプラスミノジェンの活性化能と破骨細胞形成抑制活性の評価を行う。(4)生体適合性、力学的適合性に優れたバイオ角膜の創製およびそれを用いたコンタクトレンズケア用品の安全性評価系を確立するために、ウサギ角膜上皮細胞を重層化培養し、*in vitro* で構築したバイオ角膜(角膜上皮)のタイト結合、デスモゾーム、ギャップ結合について、*in vivo* 角膜と比較検討し、構築組織の完成度の精査を行う。(5)医療分野での活用を目的とし、吸収性材料ポリ-L-乳酸、生体適合性材料硫酸化ポリウレタン、温度応答性ポリマーポリ N-イソプロピルアクリルアミドの修飾体の研究を行う。(6)細胞組み込み型人工臓器の最適な足場の構造を明らかにするために、孔径サイズが異なるコラーゲンハニカム構造体・type別コラーゲン・化学修飾コラーゲンからなる3次元設計構造体の作製を行う。(7)系統的処理を行ったコラーゲン、ゼラチンを作製し、その生体反応を調べ、再生医療用基材としての適用指標の設定を行うことを目的とする。

### 2. 研究方法

(1)ヒト皮膚繊維芽細胞のギャップ結合機能亢進・抑制作用を示す新規多糖類の発見と力学的適合性を示すバイオ軟骨作製に必要な因子に関する研究 材料：Heparin、2DSH(2-desulfated heparin)、6DSH(6-desulfated heparin)、NDSH(N-desulfated heparin)は、生化学工業で調製。L-乳酸-カプロラクトン(50:50)共重合体(分子量57万)ポアサイズ250-350 $\mu$ mの連通孔型3次元構造体の作製。細胞間連絡機能評価法：蛍光色素移行量の定量的測定法と、同色素移行距離測定法(scrape-loading dye transfer assay:SLDT)使用。ウエスタンブロット法：ECLシステムでコネキシン43タンパクバンドを検出。

細胞増殖度は、Alamar Blue 法により評価した。軟骨分化度は、アルシアンブルー染色法で測定。

バイオ軟骨の力学評価：テクスチャーアナライザー TA-XT2i (英弘精機製) でテストした。

**(2)力学的適合性に優れたバイオ軟骨の創製** 力学的評価系の文献調査と評価機器の構築をおこない力学指標と測定機器を作製した。生化学指標であるアグリカン、コンドロイチン硫酸異性体・コラーゲン typeII および typeI の定量系の検討。ウサギ・ヤギ・ウシの生体軟骨の脱灰、染色方法と三次元マトリックスの切片作製、染色方法の検討を行った。Poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyhexanoate)(P(3HB-co-3HH)) を用い 3 次元支持体の調製方法を検討した。P(3HB-co-3HH)のラット皮下埋植とウサギ一次刺激性試験を行った。ポリ乳酸について、ラット背部に高分子フィルムを埋植し、経時的にフィルムを取り出し、周辺組織、主要臓器の観察を行った。骨伝導性を評価するために、磷酸カルシウムを吹き付け固定した三次元マトリックス及び基材マトリックスをヤギ後肢膝関節に埋植し、2 ヶ月後組織学的に観察した。細胞播種定着について、ウサギ、ヤギ、ウシ軟骨細胞を調製し、マトリックスへの播種定着性を検討した。

**(3)生体適合性・機能性に優れた多糖類に関する研究** フコース分岐を有するコンドロイチン硫酸 E(SC-GAG)をマナマコから各種分離操作を行ない 210mg を得た。フコース分岐含量を低減化したコンドロイチン硫酸 E 誘導体 (FRSC-GAG) の合成を行ない、未水解物 34.7mg、3h-水解物 18.1mg、6h-水解物 15.0mg を得た。t-PA を介したプラスミノジェン活性化能と破骨細胞形成抑制活性を測定した。

**(4)生体適合性・機能性に優れた眼科関連材料と評価技術開発に関する研究** ウサギ角膜上皮細胞の初代培養を行った。フィーダーレイヤーとしてマウス 3T3 細胞を用いて TC インサート上で suspension 法または Explant 法でウサギ角膜上皮初代培養細胞を得た。不死化ヒト角膜上皮細胞をコラーゲン膜上で培養し、Air-Lifting した。これらの角膜上皮細胞とラット角膜について、タイト結合(ZO-1)、デスモゾーム (デスモグレイン 1+2)、ギャップ結合(コネキシン 43)を免疫染色し、レーザー共焦点顕微鏡で観察した。

**(5)生体適合性・機能性に優れた吸収性材料と器官形成機能性膜の開発に関する研究** 生体吸収性材料として、無触媒で合成されたポリ乳酸の粉末試料の調製と Ti あるいはスズ触媒で生分解性材料を合成した。ポリオレフィン製多孔平膜を処理し、硫酸化ポリウレタン修飾膜の作製と機能性培養床としての温度応答性材料の機能化について N-isopropylacrylamide(NIPAM)の修飾や硫酸化材料との複合化を試みた。

**(6)生体適合性・機能性に優れたコラーゲン複合体の高次構造構築技術の開発に関する研究** アテロコラーゲンを原料として酸性溶液を調製し、種々の異なる条件で中和し、洗浄後凍結乾燥を行ない、得られたハニカム構造体を 1mm厚にスライスし、状態を観察した。ウシ関節軟骨 TypeII コラーゲンの酸性溶液(1%)を作製し、同様に中和、乾燥、スライスし観察した。

**(7)生体適合性・機能性に優れた天然高分子材料の評価技術の開発に関する研究** アテロコラーゲン溶液を 40℃、30分 (弱変性) 60℃、30分 (親ゼラチン化)、100℃、3時間 (ゼラチン化、過変性) の各条件で熱変性させ、未変性の原液とともに、電気泳動分析、粘度測定、旋光度測定を行った。各熱変性コラーゲンを混合したコラーゲンマトリックスを作製し、ラット皮膚全層欠損層に適用し組織を観察した。ウシコラーゲンスポンジ人工真皮でアレルギー様患者の血液の抗コラーゲン抗体価の測定を行った。

### 3. 研究結果

**(1)ヒト皮膚繊維芽細胞のギャップ結合機能亢進・抑制作用を示す新規多糖類の探索と力学的適合性を示すバイオ軟骨作製に必要な因子に関する研究** ヒト皮膚繊維芽細胞で、bFGF 存在下、2DSH と NDSH は著しい細胞間連絡機能の亢進作用が認められた。一方、6 DSH 体の場合には、bFGF との共存下で、顕著なコネキシン機能抑制作用を発見した。コネキシン 43 タンパク発現量について解析した結果、もギャップ機能と相関する結果がえられた。静置培養に比べ、ヒアルロン酸(HA)存在下で動的培養を行うと、軟骨基質であるプロテオグリカン量を 3 倍増加させることができた。バイオ軟骨中に十分量のヒアルロン酸とプロテオグリカン量が多いバイオ軟骨が、圧縮強度を増加した。静的培養に比べ、動的培養下では、コネキシン 43 タンパク分子の発現量が著しく増加した。次に、L-乳酸・カプロラクトン共重合体の 3 次元スポンジには、ヒト軟骨細胞が接着しないため、ファイブロネクチンで表面をコートした後、動的な環境下で培養した。細胞増殖度は、HA+bFGF+2DSH>HA+bFGF+Heparin>HA+bFGF>control の順に良好であった。ヘパリン脱硫酸化体は、増殖・強度ともに Heparin に比べて優れていた。半定量的 RT-PCR を行い、collagen typeII, aggrecan, connexin43 の mRNA 発現量とアルシアンブルーによる軟骨分化度の関係について比較した。3 つの指標を説明変数として細胞分化度との間で重回帰分析を行った結果、 $Y=84X_{agg} + 36X_{cx43} - 2.8X_{coll} - 9.1$  ( $r=0.96$ ) となり、軟骨の主プロテオグリカンである aggrecan(agg)と connexin(cx) 43 の mRNA レベルが上昇すると軟骨分化は亢進するが、collagen typeII(coll)の mRNA 発現量は、軟骨分化に寄与していなかった。

**(2)力学的適合性に優れたバイオ軟骨の創製** 力学的評価系について、文献調査より有用と考えられる 10 項目を選び出した。測定するために Texture Analyser TX-XT2i (Stable Micro System 社) 及び Rheo Stress RS150 (HAAKE 社) をベースに、加電流装置・電極等の付属装置と評価機器システムの作製を行った。三次元マトリックスでは、種々のプロシテーを有する連通型多孔質体を調製し、P(3HB-co-3HH) をラットに埋植後、4 週において埋植周辺に軽度の肉芽形成、52 週現在、肉芽組織の減少が観察された。材料の分子量および重量は経時的に減少し、サンプル片の破断はなかった。ヤギでの骨伝導性埋植試験では、欠損のみの場合、術後 41 日経過時点で繊維化が起きていた。マトリックス基材埋植では、PLGA 基材では 58 日目で繊維化しており、軟骨再生は認められなかった。燐酸カルシウム固定マトリックス埋植では、癒痕組織となっており、骨組織を確認できなかった。軟骨の再生も不十分であった。骨伝導性において、燐酸カルシウムの影響を特定できなかった。ヤギ培養軟骨では、Compressive modulus 又は Equilibrium modulus がヤギ生体軟骨に近い物性を持ったバイオ軟骨が得られたが、両方の値が近似な培養軟骨は得られていない。電気化学的測定は、電極の改変を現在対応中である。

**(3)生体適合性・機能性に優れた多糖類に関する研究** コンドロイチン硫酸 E (MW.78,000) とその部分酵素消化物 (MW.21,000) および 3h-水解物はいずれも、 $\alpha$ -PA を介したプラスミノジェン活性化能が 6.25  $\mu$ g/ml で活性極大を示し、6h-水解物、コンドロイチン硫酸 E 部分酵素消化物 (MW7,000) は 100  $\mu$ g/ml で活性極大を示した。他方、破骨細胞形成抑制活性は、側鎖である硫酸化フコピオシル基の存在が活性発現に重要であることが示唆された。

**(4)生体適合性・機能性に優れた眼科関連材料と評価技術開発に関する研究** Suspension 法で初代培養したウサギ角膜上皮細胞は、死滅した浮遊細胞が多く、培養 5 日目でコンフルエントに達した。Explant 法では、細胞の outgrowth は、角膜側に限定されており、強膜側からの細胞増殖はなかった。ウサギ角膜上皮細胞の HE 染色像は、4-5 層に重層化し、基底細胞層の形態、最表層細胞層の扁平化の程度も in vivo 角膜と類似していたが、基底細胞層から最表細胞層にかけての細胞形態の変化が乏しくデスマグレインは、基底層においても発現し、ウサギ in vivo 角膜の発現と異なっていた。Explant 法では、in vivo 角膜のような分化が起こっていなかった。不死化ヒト角膜上皮細胞を Air-Lifting 法で培養した標本は、ZO-1 が最表層に近い細胞間で、デスマグレインは最表層-基底層の中間層の細胞間で明瞭に発現し、Connexin43 は基底層に近い細胞間でドット状に発現した。コラーゲン膜上で培養した不死化ヒト角膜上皮は、ラット生体角膜に比べ、細胞形態の変化が乏しい結果となった。

**(5)生体適合性・機能性に優れた吸収性材料と器官形成機能性膜の開発に関する研究** 生体吸収性ポリ乳酸について、直径 30  $\mu$ m から 100  $\mu$ m のサイズのを調製できた。分子量 3000 程度の無触媒下で合成したポリ乳酸等も合成できた。柔軟なバッグ状の構造体を示す硫酸化ポリウレタン修飾膜による膜構造体を作製できた。温度応答による細胞回収性と細胞との親和性とを備えた培養床のための材料を検討した。

**(6)生体適合性・機能性に優れたコラーゲン複合体の高次構造構築技術の開発に関する研究** 濃度が異なるアテロコラーゲン酸性溶液を用いて作製したハニカム構造体は、濃度があがるにつれ、孔径サイズが大きくなり、孔の密度が減少した。1%アテロコラーゲン酸性溶液について、中和液の濃度を増加させると、孔径サイズに大きな違いは見られなかったが、壁厚が若干厚くなる傾向が見られた。TypeII コラーゲンを同様に処理して得たスポンジは、ハニカム構造を作らず、ランダム構造体となった。

**(7)生体適合性・機能性に優れた天然高分子材料の評価技術の開発に関する研究** 電気泳動で解析した結果、熱変性条件の過酷さに応じて高分子側のバンドが減り、低分子側のバンドが増えた。3つの領域に大別し、低分子成分領域(複分解成分)の割合を求めたところ、熱処理の度合いを反映した数値が得られた。粘度測定からも、変性度を数値化できた。旋光度は、測定の結果、未処理原液は、3重螺旋構造を示し、親ゼラチンでは、1本鎖構造を、過変性条件では、1本鎖が更に寸断されたゼラチンの状態を示す旋光度を示した。親ゼラチン化条件で変性したサンプルの場合が最も顕著に巻き戻る現象が観察された。In vivo 組織反応は、治癒が良好な順に、親ゼラチン化条件>過変性条件>弱変性条件という結果であった。ウシコラーゲンスポンジ適用後にアレルギー様症状を呈した患者の血中の抗ウシアテロコラーゲンヒト IgG の値は、高値であった。他クラスの抗ウシコラーゲン抗体値は、対照と同等に低値であった。この患者は、スポンジ適用以前に、ウシコラーゲンまたはウシゼラチンによって感作されていたものであろうと推測される。

#### 4. 考察・まとめ

コネキシン機能に及ぼす bFGF との相互作用において、Heparin の特定の位置について、脱硫酸化された Heparin 誘導体は、その硫酸基の位置の違いによりコネキシン機能の亢進および抑制と全く相反する効果を示すことが明らかになった。このようなコネキシン機能亢進および抑制活性を示す多糖類は新規な物

質であり、我々の研究で初めて見出したものである（特許出願 3 件）。一定の力学的強度を示すバイオ軟骨を作製するためには、力学的刺激とヒアルロン酸のような物理的強度保持構成成分の添加が有力な方法であることを明らかにした。半定量的 RT-PCR を行い、軟骨の主プロテオグリカンである aggrecan と connexin43 の mRNA レベルが上昇すると軟骨分化は亢進するが、collagen typeII の mRNA 発現量は、軟骨分化への寄与は検出されなかった。生体適合性に優れたバイオ軟骨を創製するために必要な力学的評価機器を立ち上げることができた。生化学的評価、組織学的評価および三次元マトリックス構造体の調製も技術的レベルを上げることができた。

機能性評価用の多糖試料として着目したフコース分岐を有するコンドロイチン硫酸誘導体につき、t-PA を介するプラスミノジェン活性化能試験に供した結果、中程度のフコース分岐を有するコンドロイチン硫酸誘導体の機能性が極めて高いことが判明した。破骨細胞形成抑制活性は、硫酸化フコピオシル基の存在がその活性発現に重要であった（特許出願 1 件）。

ウサギ角膜より、suspension 法、Explant 法により、角膜上皮細胞の初代培養細胞を得た。マウス 3T3 細胞のフィーダーレイヤー上で行うことにより 5-6 層に重層化させることに成功した。細胞間にデスマグレインを発現し、全体的には、in vivo 角膜上皮細胞の形態と類似していたが、基底細胞層から最表層細胞層にかけての形態変化において少し差異があった。コラーゲン膜上で培養した不死化ヒト角膜細胞上皮は、ラット生体角膜に比べ形態学的に劣っていた。

生体吸収性材料について、その形状・サイズや分子量などの性状を制御することで、細胞との相互作用を調節することを試みた。硫酸化ポリウレタンで修飾したポリオレフィン多孔膜による構造体は、埋植用材料の免疫原性を評価するための、有望な評価系となることが期待される（特許出願 1 件）。温度応答による細胞回収性と細胞との親和性を備えた培養床材料を試作した。

アテロコラーゲンを好適な条件下で中和することにより種々のハニカム構造をもつ骨格材料を得ることができた。今後、種々の生体成分との複合化による高機能骨格材料の検討、評価系の確立について検討する。系統的に変性させたコラーゲン、ゼラチンを用いて、変性度の評価法を確立し、また、in vivo 評価を行って、変性状態により生体反応に及ぼす影響が異なることを確認した。ウシアテロコラーゲン適用後にアレルギー症状を誘発した患者は、血中の抗ウシアテロコラーゲン IgG 値が対照と比較して高値で検出された。

## 5. 研究発表

### 論文発表

1. Kariya, Y., Sakai, T., Kaneko, T., Suzuki, K., Kyogashima, M. Enhancement of t-PA-Mediated Plasminogen Activation by Partially Defucosylated Glycosaminoglycans from the Sea Cucumber *Stichopus japonicus*. *J. Biochem.* 2002, 132, 335-343
2. Kyogashima, M., Sakai, T., Kariya, Y., Takada, Y., and Takada, A., The comparison of ability to exert fibrinolytic and anti-coagulant activities of chondroitin sulfate E (CSE) and fucose-branched glycosaminoglycan possessing the same core structure with CSE. *Glycoconjugate J.* (2001) 18, 145.
3. Sakai, T., Kyogashima, M., Kariya, Y., Urano, T., Takada, Y., and Takada, A., Importance of GlcUA $\beta$ 1-3GalNAc(4S,6S) in Chondroitin Sulfate for t-PA and u-PA-Mediated Glu-Plasminogen Activation. *Thrombosis Research* (2000) 100, 557-565
4. Kariya, Y., Kyogashima, M., Suzuki, K., Isomura, T., Sakamoto, T., Horie, K., Ishihara, M., Takano, R., Kamei, K., and Hara, S. Preparation of Completely 6-O-Desulfated Heparin and Its Ability to Enhance Activity of Basic Fibroblast Growth Factor. *J. Biol. Chem.* (2000) 275, 25949-259
5. Jeongung Park, Toshie Tsuchiya, Yutaka Kariya and Akira Ichikawa, Chondroitin sulfate inhibits the GJIC function resulting in reducing the bFGF and KGF productions in NHDF cells but enhance the stability of both cytokines. submitted.
6. Jeongung Park, and Toshie Tsuchiya, Evaluation of the cornea cells affected by multi-purpose solutions for contact lenses. *Animal cell Technology*, accepted.
7. MS Rahman, Yasmin Banu, Atsuko Matsuoka, Akira Ichikawa, Masamune Sakai, Hiroyuki Ikeda and Toshie Tsuchiya, Evaluation of the immuno-protective effects of the new  $\gamma$ -type of bags using ELISA and faces analysis. *Animal cell Technology*, accepted.
8. Toshie Tsuchiya, Masamune Sakai, Hiroyuki Ikeda, Tadahiko Mashino and Yasmin Banu, Biocompatible biomaterials for the human chondrocyte differentiation estimated by RT-PCR method. *Animal cell Technology*, submitted.
9. Muhammad Shahidur Rahman, Toshie Tsuchiya, A remarkable increase of the mechanical strength of the human articular chondrocytes cultured with hyaluronic acid using honey-comb scaffold under the dynamic conditions. submitted.
10. Muhammad Shahidur Rahman, Toshie Tsuchiya, Enhancement factors of chondrogenic differentiation of the human articular chondrocytes using the 3-dimensional scaffold under the dynamic culture condition. submitted.

11. Yasmin Banu, Toshie Tsuchiya, Studies on the development of evaluation method and the biocompatibility of functional biomaterials. submitted.
12. Taizo Sumide, Toshie Tsuchiya, Effects of Multipurpose Solutions (MPS) for Hydrogel Contact Lenses on Gap-Junctional Intercellular Communication (GJIC) in Rabbit Corneal Keratocytes. *J. Biomed Mater. Res., Appl Biomater* 2003, 64B, 57-64
13. 土屋利江、生分解性高分子材料の軟骨分化機能等への影響、*バイオインダストリー*、2002, 7, 30-37
14. Jeongung Park, and Toshie Tsuchiya, Tumor-Promoting Activity of 48 kDa Molecular Mass Hyaluronic Acid. *Materials Transactions*, 2002, 43, 3128-3130
15. Ryusuke Nakaoka and Toshie Tsuchiya, Biocompatibility of Various Kinds of Polymer Microspheres Estimated from Their Effect on Gap Junctional Intercellular Communication of Fibroblasts. *Materials Transactions*, 2002, 43, 3122-3127
16. Ryusuke Nakaoka, Toshie Tsuchiya, and Akitada Nakamura, Different neural differentiation of midbrain cells on various protein-immobilized polyethylene films. *J. Biomedical Materials Research*, 2003, 64A(3), 439-46.
17. Kazuo Isama and Toshie Tsuchiya, Effect of  $\gamma$ -ray irradiated poly(L-lactide) on the differentiation of mouse osteoblast-like MC3T3-E1 cells. *J. Biomater. Sci. Polymer Edn.* 2002, 13, 153-166.
18. Jeong Ung Park and Toshie Tsuchiya, Increase of Gap Junctional Intercellular communication by High Molecular Weight Hyaluronic Acid Associated with FGF-2 and KGF-Production in Normal Human Dermal Fibroblasts. *TISSUE ENGINEERING*, 2002, 8, 419-427.
19. Muhamad Shahidur Rahman and Toshie Tsuchiya, Enhancement of Chondrogenic Differentiation of Human Articular Chondrocytes by Biodegradable Polymers. *TISSUE ENGINEERING*. 2001, 7(6), 781-790.
20. 土屋利江、中岡竜介、林正雄、市川明、細胞によるバイオマテリアルの評価法、*バイオインダストリー*、2001, 10, 81-93.
21. Toshie Tsuchiya, Yuka Itahashi, Tomoko Ichikawa and Akira Ichikawa, Studies on the biocompatibility of artificial organs and tissue engineered products: embryonic neuronal cell differentiation on the various kinds of biodegradable polymers. *Animal Cell Technology*, 2002, 12, 253-256.
22. Jeong Ung Park and Toshie Tsuchiya, Increase in gap-junctional intercellular communications(GJIC) on normal human dermal fibroblasts(NHDF) on surfaces coated with high molecular weight hyaluronic acid (HMWHA), *J. Biomedical Materials Research*, 2002, 542-547.
23. Ryusuke Nakaoka, Toshie Tsuchiya, Keisuke Sakaguchi and Akitada Nakamura, Studies on in vitro evaluation for the biocompatibility of various biomaterials: Inhibitory activity of various kinds of polymer microspheres on metabolic cooperation. *J. Biomed Mater Research*, 2001, 57, 279-284.
24. Taizo Sumide, Toshie Tsuchiya, Evaluation of chemical disinfectants for hydrogel contact lenses by metabolic cooperation assay. (Japanese) *J. of Japanese Society for Biomaterials*, 2001, 19, No.3, 93-97.
25. Muhammad Shahidur Rahman, Toshie Tsuchiya, Effects of biomaterials and nutrient factors on chondrogenesis of human chondrocytes. *Animal Cell Technology*, 2002, 12, 235-239.
26. Muhammad Shahidur Rahman, Toshie Tsuchiya, In vitro culture of human chondrocytes(1): A novel enhancement action of ferrous sulfate on the differentiation of human chondrocytes. *Cytotechnology*, 2001, 37, 163-169.

#### 学会発表 (以下の発表も含め 26 件)

- 1 今安正樹：バイオ角膜の開発と評価 第24回日本バイオマテリアル学会ワークショップ、2002年11月 東京
- 2 坂井正宗：人工血管の現状と再生医療への展望 第24回日本バイオマテリアル学会ワークショップ、2002年11月 東京
- 3 片倉健男：再生医療材料・製品の安全性と標準化 第24回日本バイオマテリアル学会ワークショップ、2002年11月 東京
4. Toshie Tsuchiya, A useful marker for evaluating the safety and efficacy of tissue engineered products. *ASTM TEMPs 2002 Symposium*, Nov4-5, 2002, Miami
5. Toshie Tsuchiya and Soichiro Isobe, Reform of biological product regulation in Japan: Revision of pharmaceutical affairs law (PAL) and principles of good tissue practice (GTP) for cellular and tissue based products. *ASTM TEMPs 2002 Symposium*, Nov4-5, 2002, Miami
6. 土屋利江：再生医療材料・製品の安全性と標準化 第24回日本バイオマテリアル学会ワークショップ、2002年11月 東京

#### 6 知的所有権取得状況

- (ア) 特許取得 (特願 5 件) 特願 2001-311484/ギャップ機能亢進剤/土屋利江・苅谷 豊  
 特願 2001-311485/ギャップ機能抑制剤/土屋利江・苅谷 豊  
 特願 2002-78407/宿主内埋め込み用構造体および繁殖方法/土屋利江・坂井正宗・池田博之  
 特願 2002-055053/硫酸化フコビオシルコンドロイチン硫酸誘導体/苅谷 豊・坂井登紀子・金子卓嗣・京ヶ島守  
 特願 2003-8855/ギャップ機能抑制剤/土屋利江・苅谷 豊 (イ) 実用新案登録 なし (ウ) その他 なし