

幹細胞等を用いた細胞組織医療機器の開発と評価技術 の標準化

所属 国立医薬品食品衛生研究所 療品部

研究者 土屋 利江

研究要旨 再生医療製品として待ち望まれている各種(軟骨・骨・心筋・血管など)製品と製品に使用される組織工学材料の開発、およびそれらの製品の品質・有効性(臨床評価を含む)確保に重要な評価技術の標準化を行う。眼科では、コスト面から産業化が可能であり、開発が望まれる治療的レンズ材料の開発を行う。平成 16 年度は安全性評価についても実施した。具体的には、17 項目について研究を行い、以下に示す成果をあげた。

分担研究者

- (1) 国立医薬品食品衛生研究所療品部 松岡厚子
- (2) 国立医薬品食品衛生研究所療品部 澤田留美
- (3) 国立医薬品食品衛生研究所療品部 中岡竜介
- (4) 国立医薬品食品衛生研究所療品部 中村直仁
- (5) テルモ(株)研究開発センター 片倉健男
- (6) (株)カネカ ライフサイエンス RD センター
増田茂樹
- (7) オリンパス光学工業(株)研究開発センター
森山 剛
- (8) (株)メニコン 基礎研究課 平谷治之
- (9) (株)ウベ循環 坂井正宗
- (10) グンゼ(株)研究開発センター 富畑賢司
- (11) 生化学工業(株)中央研究所 荻谷 豊
- (12) ペンタックス(株)ニューセラミックス事業部
小川哲朗
- (13) 株式会社高研 バイオサイエンス研究所
阿蘇 雄
- (14) 京都大学国際融合創造センター 富田直秀
- (15) 信州大学医学部附属病院整形外科 脇谷滋之
- (16) 大阪大学大学院器官制御外科学 吉川秀樹
- (17) 東京女子医科大学心臓血管外科 新岡俊治
- (18) 大阪大学医学系研究科臓器制御外科 澤 芳樹

A. 研究目的

近年、材料とハイブリッドした培養皮膚や、軟骨の細胞治療が海外では、承認され臨床使用されている。

しかしながら、海外で数千例すでに臨床使用されている軟骨の細胞治療では、その有効性が疑問視され、学会で論争となっている。その原因は、採取したヒト軟骨細胞の単層培養による増殖過程で脱分化すること。さらに、細胞を軟骨再建部へ注入するのみで、固定できないため、注入した軟骨細胞が治療すべき部位にとどまり、治癒に有効であるのか疑問視されている。これらを解決するためには、分化機能を維持した細胞の培養方法、対象となる部位への固定方法、臨床使用されている幹細胞の分化発現機能の安定性確保、細胞の足場となる材料の細胞性免疫アレルゲン、液性免疫アレルゲン、汎用使用されている触媒で合成された生分解性材料との相互作用による幹細胞等の機能への悪影響をなくした高機能性の組織工学用材料の開発、臨床評価が困難な再生軟骨での臨床評価手法の開発など多くの解決すべき課題がある。これらの課題への解決手法や評価技術の標準化が進めば、細胞組織医療機器の開発が現実のものとなり、新しい先端医療技術と製品を日本から世界人類のために、提供できる。

具体的には、力学も考慮した再生軟骨・難治性骨欠損治療・骨髄幹細胞からの再生人工血管・心筋再生など緊急性のある研究内容を含む。従来の医工連携や国研単独での枠組みでは得られなかった実用的で優れた

細胞組織医療機器・医療材料開発を目的とする。すなわち、再生医療として期待されている製品の開発とそれらの製品の品質・有効性(臨床評価も含む)・確保に重要な評価技術の標準化を行う。研究項目としては、材料系、細胞系、これらを組み込んだ細胞組織医療機器系からなる。材料系は、DDS組込型を含むスキャホールドの開発とその有効性評価。細胞系は、幹細胞の維持、幹細胞からの分化誘導、幹細胞から誘導した分化発現細胞の分離技術。細胞組織医療機器系は、骨髄細胞からの細胞組織医療機器の開発、細胞組織医療機器の品質評価技術の標準化、細胞組織医療機器の有効性評価指標の標準化などである。

具体的な組織・臓器としては、軟骨、骨、血管、心臓、角膜等を対象とする。

B. 研究方法

幹細胞を用いた細胞組織医療機器の開発と評価技術の標準化を行うために以下の研究手法を用いて検討した。

材料開発

- 1) ウシ以外のコラーゲンの現状調査を行う。各種生物由来アテロコラーゲンを調製し、SDS 電気泳動、アミノ酸分析、旋光度分析から 50%変成した温度を求めた。等イオン点も測定した。イズミダイコラーゲン抗体との反応性を ELISA で測定した。
- 2) 血管内皮増殖因子とファイブロネクチン・コラーゲン結合ドメインが付与されたコラーゲン結合性血管内皮増殖因子(FNCBD-VEGF)融合タンパク質の発現ベクターの構築を行う。この融合タンパク質を調製し、この融合タンパク質のコラーゲン結合性と WST1 法による血管内皮細胞増殖活性を調べた。
- 3) 緑内障治療薬であるチモロールをゲスト薬物として用い、これを分子インプリントさせたヒドロゲル(新規ソフトコンタクトレンズ材料)を作製し、得られたゲルの含水率、チモロール放出実験、ウサギ角膜上皮細胞増殖抑制率の測定を行った。
- 4) ヒアルロン酸を主骨格とした各種官能基導入多糖の合成を行い、ヒト幹細胞の軟骨分化にその多糖添加がどのように影響するか検討した。
- 5) これまでの研究により、生分解・生体吸収性の材料

に含まれている触媒由来の成分が、その分解と吸収の過程において、細胞の増殖・分化に影響を及ぼす現象が見いだされている。これについて、錫系、チタン系、鉄系、亜鉛系の触媒成分に変更した候補材料の合成を行った。

6) マナマコの体壁からフカン硫酸の類縁体の単離・精製を行い、2種のフカン硫酸を得た。TRAP法で染色することにより、分化・生成した破骨細胞様細胞の個数を光学顕微鏡を用いて計数し、破骨細胞形成抑制活性を測定した。

評価技術の標準化

- 7) ヒト間葉系幹細胞を培養した細胞からの染色体標本作製のための最適プロトコルの検討を行った。細胞の老化については、Scenescence Detection Kitによる染色により評価した。
- 8) 幹細胞の癌化に対する安全性の評価を目的として、正常ヒト間葉系幹細胞(hMSC)の継代に伴う遺伝子発現の変化について、2種類の癌細胞(HeLa S3とHepG2)と比較検討した。すなわち、細胞増殖に関わる遺伝子の mRNA 発現について、癌細胞と幹細胞(hMSC)間で比較した。また hMSC の継代数の増加に伴う変化についても調べた。発癌に関わると考えられる遺伝子、発癌抑制及び恒常性機能維持遺伝子群である Connexin26(Cx26) Cx32、Cx43、更に、発癌や分化に関わるといわれているサイトカインである TGF β とその受容体について、癌細胞と hMSC で、Real time RT-PCR を用いて遺伝子発現を比較した。
- 9) 二次元及び三次元培養系において間葉系幹細胞の増殖時の代謝物質量的変化に着目し、培地中の消費グルコース量、産生乳酸量の定量を行った。
- 10) フィブロイン及びコラーゲンゲルを基材として再生軟骨を作製し、その摩擦特性の評価機器として、一方向往復型試験機を作製した。また、培養中に様々な物理刺激を加える機器の試作を行った。
- 11) 前臨床動物試験における再生軟骨による治療効果の評価方法案(複数種)を作成した。評価項目(力学)・aggregate modulus(equilibrium modulus)・Poisson's ratio(dynamic stiffness)・streaming potential(permeability)・光音響法による

粘弾性・MRI・K-modulus を選出した。

生化学、組織学:他の分担研究者と共同で被験動物(ブタ)を用いた埋植試験を開始した。他の分担研究者から提供を受けた基材を用いて多孔質体(細胞播種用支持体)の試作も実施した。

12) 輸入骨髓液をDME培地に10%ウシ血清と増殖因子を添加した増殖培地で培養し、間葉系幹細胞を増殖させた。得られた間葉系幹細胞を12ウェルプレートに4000細胞/cm²の密度で播種し、デキサメタゾン、β-グリセロフォスフェート、ビタミンCにより骨芽細胞への分化を誘導した。骨芽細胞にはアルカリフォスファターゼ(ALP)活性、オステオポンチン、オステオカルシン、マトリックスグラブリン、コラゲナーゼなど幾つかの分化パラメーターが知られており、それ以外にも骨代謝における骨形成マーカーとしてI型コラーゲンプロペプチドが知られている。そのため、骨芽細胞への分化を確認するためにはこれらのパラメーターを測定すればよいと考え、①分化初期のパラメーターであり、骨形成マーカーであるI型コラーゲン、②骨芽細胞の形質を示す細胞に特異的に発現する骨型ALP活性、③成熟骨芽細胞が特異的に発現するオステオカルシンのうちハイドロキシアパタイトに結合して生理活性を有するGla型オステオカルシンを選択し、測定方法の検討を行った。

13) 出発原料であるコラーゲンの特性評価方法としてハイドロキシアパタイトカラムを用いた高速液体クロマトグラフィーを検討した。さらにコラーゲン原料を用いて作成したスポンジ状のアパタイト・コラーゲン複合体上におけるラット新生仔頭蓋骨由来骨芽細胞を用い、骨分化評価指標として、アルカリフォスファターゼ活性を測定した。

臨床評価

14) 細胞移植による関節軟骨欠損修復の有効性、安全性を評価するためには、まず関節軟骨欠損の臨床症状の評価法の確立が必要である。そのために、関節軟骨欠損の症例を集め、その臨床症状、血清、関節液中のマーカー、MRI、物理学的評価を行い、さらには経過を追ってのそれらの変化を調べるプロトコルを作成した。このプロトコルを、病院の倫理審査委員会に申請し、手続きを完了し、症例を集めている。臨床症状

は、International Cartilage Repair Society の評価基準を使用、MRI で軟骨欠損の評価を行う。

15) 前臨床試験として、ラット骨髓由来細胞と連通多孔体ハイドロキシアパタイトとのハイブリッド人工骨の作成を行い、ラット in vivo での骨再生を評価した。人工骨内の骨形成を単純 X 線、マイクロ CT、骨塩定量(DEXA 法)、圧縮強度などの力学試験を行って評価し、組織学的評価との対比により、非侵襲的画像検査ー組織学的評価ー力学試験の3評価法の相関性を検証した。良性骨腫瘍2例に対し病巣掻爬し、通常の人工骨(NEOBONE)移植を行った症例で経時的に造影MRI所見について検討した

16) 根治手術時、全身麻酔下に骨髓穿刺を行い、体重あたり2-5ccの骨髓液を採取する。血液成分分離装置により完全清潔下に操作を施行した。直ちに生分解性ポリマーの導管に播種した後、自己血清液中に浸漬し、手術室内の細胞培養室にて細胞の viability を維持しつつ保存した(約二時間)。フィブリン糊を塗布した吸収性人工血管壁に細胞を固定後、自己血清に浸漬し、骨髓細胞ができるだけ多くポリマー繊維に接着するように誘導する。

17) 自己筋芽シートの効果の検討:自己筋芽細胞より分化誘導された細胞を、温度感応性応答培養皿を用いて、単層の筋芽細胞シートを作製し、これを重層三次元化し、cardiac graft を作製する。この graft 移植により、ヒト心筋組織への自家細胞移植の安全性の課題を抽出した。骨髓細胞、骨格筋細胞などの移植後の変化を移植前と比較した。

C. 研究結果

材料開発

1) 安全なコラーゲン材料の開発を目的とした。ウシ以外の原料として入手可能な動物種を調査した。その結果、哺乳類としてはブタ、ウマ、鳥類としてはニワトリ、魚類としてはサメ、マグロ、イヅミダイ、シタビラメ等が現在、医療分野・化粧品分野・食品分野等で原材料として用いられている。その中でブタ、サメ、マグロ、イヅミダイについて原料よりアテロコラーゲンを作成し、得られた標品について基本的なコラーゲンの特性について評価し比較した。その結果、ブタアテロコラーゲンの特性は、ウ

シと殆ど同等であった。一方魚類のコラーゲンは種間でコラーゲンを構成する α 鎖に差異があり、SDS-PAGE、変性温度によりその差異が確認された。さらに、種免疫的な交差性は極めて低い事が確認された。

2) 血管内皮増殖因子にファイブロネクチン・コラーゲン結合ドメインが付与されたコラーゲン結合性血管内皮増殖因子(FNCBD-VEGF)を、遺伝子工学的に作成し、開発した。この FNCBD-VEGF について、コラーゲン結合性、血管内皮細胞増殖活性などの機能解析を行った。その結果、強固なコラーゲン結合活性および天然型と同様の冠状動脈血管内皮細胞に対する細胞増殖活性を確認できた。

3) 緑内障治療薬であるチモロールをゲスト薬物として用い、これを分子インプリントさせたヒドロゲル(ソフトコンタクトレンズ用新規材料)を開発し、得られたゲルの機能について評価した。その結果、ゲル合成時の各種条件(架橋剤濃度、官能基成分濃度、ゲスト薬物濃度など)によって得られたゲルからの薬物放出速度に違いがみられ、自由にコントロールすることができた。

4) ヒアルロン酸を主骨格とした各種官能基導入多糖の合成を行い、ヒト幹細胞の軟骨分化にその多糖添加がどのように影響するか検討した。その結果、軟骨分化を促進し、かつ安全性が期待される材料を開発できた。

5) これまでの研究により、生分解・生体吸収性の材料に含まれている触媒由来の成分が、その分解と吸収の過程において、細胞の増殖・分化に影響を及ぼす現象が見いだされている。これについて、触媒成分を変更した候補材料の合成などを行なった。細胞の増殖・分化に及ぼす影響と安全性を評価し、安全で有用な生分解性材料を開発する。

6) マナマコ体壁よりフカン硫酸 A および B の二種を単離・精製することに成功した。タイプ A および B の両フカン硫酸は、強い破骨細胞形成抑制活性を有することを初めて明らかにした。

評価技術の標準化

7) ヒト間葉系幹細胞を培養した細胞からの染色体標本作製最適プロトコルを検討した。ヒト間葉系幹細胞の染色体標本では、1番染色体、4番染色体、c-mycを蛍光染色したところ正常であった。HeLa 細胞では、異

常なシグナルを検出した。組織工学材料が染色体に与える影響評価系の標準化を目指す。

8) 幹細胞の癌化に対する安全性の評価を目的として、正常ヒト間葉系幹細胞(hMSC)の継代に伴う遺伝子発現の変化について、2種類の癌細胞(HeLa S3とHepG2)と比較検討した。細胞増殖に関わる遺伝子群の mRNA 発現は、癌細胞に比べて幹細胞(hMSC)では著しく低く、また hMSC の継代数の増加に伴い低下した。幹細胞(hMSC)と癌細胞(HeLaS3,HepG2)とを比較して、幹細胞の方が発現が高かった遺伝子は Cx43、TGF- β 1、- β 2、- β RI、- β RII,TRF1 であった。幹細胞の継代数の増加に伴い、低下したものが c-myc、Wnt-8B、Cx43 であった。TGF- β RII および TRF1 は hMSC の継代による変化は認められなかった。ヒト幹細胞の遺伝子発現による安全性評価系の標準化を目指す。

9) 二次元及び三次元培養系において非破壊的及び連続的なヒト骨髄由来間葉細胞増殖過程の評価方法を確立した。標準化を目指す。

10) 再生軟骨の摩擦に対する機能は、軟骨基質の産生量のみならず、その機能性、保持性の評価が重要であることが示唆された。おそらくコラーゲン網とのネットワーク形成がこれらの機能に関係する。

11) 食用ブタおよびミニブタを被験動物として検討した結果、ミニブタのアダルト(10ヶ月齢以上)を関節軟骨欠損のヒト疾患モデルとして選択した。予試験において、欠損作成 3ヶ月時点において、自然治癒が生じないこと、組織学的評価において、欠損全体として、アルシアンブルー、サフランin-oの染色性は不十分で、正常軟骨とは判定できないことを確認した。軟骨修復までに 6~12ヶ月以上観察する必要がある。

12) 骨再生製品の迅速な品質評価系を開発し、標準化するための検討を行った。間葉系幹細胞を骨芽細胞に分化させ、培養細胞中のオステオカルシンと骨型アルカリフォスファターゼを測定したところ、骨型アルカリフォスファターゼは 0.5%ノニデットP-40/生食抽出液、オステオカルシンは 10%ギ酸抽出液にて測定できることが確認できた。また、骨形成マーカーの一つである I型コラーゲンの生成過程で生じるプロペプチド(PINP およびPICP)は骨芽細胞の分化に伴い、培養上清中

への生成量が増加することが確認された。以上の結果から、骨型アルカリフォスファターゼとオステオカルシンは細胞抽出液から、I型コラーゲンは培養上清から測定可能であることを明らかにした。骨再生製品の品質評価方法として標準化を目指す。

13) グレードの異なるコラーゲンハイドロキシアパタイトクロマトグラフィーを行った。いずれのコラーゲンもアパタイトに吸着し約200mM付近のリン酸緩衝液濃度で溶出した。溶出位置、ピーク形状に僅かな違いが認められるが類似した溶出パターンであった。一方、60℃、2時間加熱処理することにより熱変性したコラーゲンのクロマトグラフィー結果では、未加熱のものとは比べ溶出時間が短くなるとともにピークが分離した。

ラット新生仔頭蓋骨由来骨芽細胞をハイドロキシアパタイト上で培養すると、日数とともに、アルカリフォスファターゼ(ALP)活性値が上昇した。一方、アパタイト・コラーゲン上で培養した場合はALP活性の上昇が僅かしかみられなかった。ALP染色の発色も多孔質ハイドロキシアパタイトに比べて弱かった。

臨床評価

14) 再生軟骨:本年度は、倫理審査委員会への申請、認可、症例の集積、様々な因子の測定方法の開発を行った。1)臨床評価方法 International Cartilage Repair Societyの評価基準としてWOMAC scoreを使用することに決定。2)軟骨代謝マーカーとしてII型コラーゲンの分解の指標 Collagen Type II Cleavage (C2C)と Procollagen Type II C-Propeptide (CPII)を測定する。アグリカンの分解の指標である Aggrecan Chondroitin Sulfate 846 Epitope (CS-846)も測定する。別に、総アグリカン量、コンドロイチン 6 硫酸、コンドロイチン 4 硫酸、ヒアルロン酸の測定が出来るようなシステムを確立した。3)MRI は上記の臨床的に使用されている方法以外に、新しいシークエンスで軟骨基質の評価が出来る方法を検討中である。4)物理学的評価:生体力学的評価としてインデンテーション、超音波による評価、光音響による評価を検討している。

15) 再生骨組織:単純X線像、骨密度、マイクロCTでの気孔内新生骨体積、病理組織所見は類似した経時的变化を示した。一方、圧縮強度はこれらの測定法に

比べ変化が遅い傾向が見られた。臨床症例では、術後6ヶ月では、造影MRIで人工骨充填領域に内部に向かって約1cmの環状の造影所見を認めた。その内側の非造影範囲は経時的に縮小し、術後約9ヶ月に撮影したMRIでは充填領域最深部までほぼ均一に造影された。

16) バイオ血管:現在まで47症例での移植が終了している。手術死亡例は無いが、遠隔死亡を一例認めた。これは再生血管に起因するものではなく術後心機能不全による遠隔死亡であった。再手術は一例に認めた。この際に採取した組織片より、良好な内皮化、中膜の形成を認めた。遠隔期に狭窄増を認めたものは4例で3例にバルーン血管形成術を施行した。最長4年半の経過観察で、瘤化、破裂、石灰化、悪性新生物の発生は認めていない。遠隔死亡1例以外は元気に外来に通院中である。

17) 心筋再生:組織学的検討において、筋芽細胞シート移植群において、移植細胞の生着が確認された。シート移植群では線維化の抑制、新生血管の増加、心筋細胞のアポトーシスの抑制などの心筋リモデリング抑制効果が認められた。また、心臓超音波検査による心機能の検討では、術後早期より細胞移植群での左室収縮及び拡張能の改善が確認され、左室内径拡大抑制・壁厚菲薄化抑制効果が認められた

D. 考察

材料開発

成長因子を特殊ゲルに含有させコンタクトレンズ形状とし、角膜上皮欠損家兎で治癒効果のある新規材料開発となりうる。新合成法により、高機能で、独創性のある生分解性材料の開発が可能となると考えられる。幹細胞制御能がある多糖とその誘導体を探索し、創薬シーズを見出す。牛由来コラーゲンと同等の原料となる他の生物種コラーゲンについては、有効性等について代替しうる医療用コラーゲンを得ることにより、BSEフリーの医療用コラーゲン開発が可能となる。見出したフカン硫酸2種は骨粗しょう症の改善候補物質たりうる可能性がある。

評価技術の標準化

幹細胞(hMSC)と癌細胞では、細胞増殖や発癌に関わる遺伝子の発現のパターンに差がみられ、その特徴の違いは明らかであった。しかし、一方で、hMSC を *in vitro* で培養続けることによってその増殖能は低下し、遺伝子発現レベルも変化することが確認された。

軟骨の機能は関節の可動性を維持すること及び衝撃に対する抵抗性を獲得維持することである。衝撃には、いくつかのパターンがある。すなわち、Static loading、Dynamic loading、Impact or Excess Loading がある。ASTM では、Static Loading には、aggregate modulus、Dynamic Loading には、Poisson's ratio、Impact or Excess Loading には、permeability の測定を当てている。しかし、aggregate modulus の測定には、1 点の測定に 2 時間必要である。permeability の測定には、複雑な装置および計算式を使用する必要がある。また、これらの測定には、軟骨または再生部分を摘出し評価する必要がある。これらの評価方法は、使用模擬試験において使用可能であり、複雑な系と長い時間がかかる。動物での評価の段階にのみしか使用できない。動物での評価結果を基にヒトへの外挿が困難である。動物での評価方法が ヒトにおいて使用でき、患者にとって侵襲度が低くなければ、有用な評価とはいえない。

間葉系幹細胞を二次元で骨芽細胞に分化させた細胞を評価する場合には、骨芽細胞の分化パラメーターである I 型コラーゲン(P1NP)、骨型 ALP 活性、Gla 型オステオカルシンの発現を測定すればよいと考えられた。しかしながら、今回の結果はあくまで二次元培養系での測定のため、三次元培養を行った際には、細胞の活性や状態が異なっていることが予測された。また、スキャフォールドに播種して三次元培養を行った場合には、目的成分のスキャフォールドへの吸着やスキャフォールドからの成分溶出などの問題も起こりうることから、抽出方法に工夫が必要になると考えられた。そこで来年度以降は、培養骨のスキャフォールドである β -TCP に間葉系幹細胞を播種して、実際に培養骨を作製し、これらの分化パラメーターが測定可能か検討する必要があると思われる。また、今回用いた分化パラメーターは少なくとも 3 日目以降でなければ検討できず、細胞への侵襲もあることから、できるだけ少ない細胞数で高感度の測

定ができる系の開発を目指している。

ハイドロキシアパタイトクロマトグラフィーはコラーゲンメーカー間の微妙な違いや、熱変性などによって生じた、コラーゲンの分子構造変化を検出することが可能であり、原料の品質管理に応用できる可能性がある。

ラット頭蓋骨(Calvarial)由来骨芽細胞は採取直後から担体上で増殖分化するため材料の *in vitro* 培養評価をした。今回、アパタイト・コラーゲン複合体上で培養した場合 ALP 活性の上昇が見られなかった。原因として、ナノ構造を有する複合体の比表面積が大きいため、培地中に存在する分化増殖に影響を及ぼす無機イオンまたは成長因子などタンパク成分が吸着され細胞の増殖・分化に不利な培養環境を引き起こした可能性がある。

臨床評価

関節軟骨欠損は、臨床症状が出にくく、欠損があっても全く症状の無いことも被い、しかし、これまでの報告では、10 年から 20 年の経過で症状が出現し、レントゲン上で変形性関節症性変化がでるとのことである。しかし、これだけの時間は観察できないので、短時間で変形性関節症への進行を評価する方法の開発が必要である。様々な軟骨代謝マーカーの変化をとらえる試みを計画した。このマーカーを使って、軟骨欠損修復法を行い、変形性関節症性変化を抑制することができれば、修復方法の有用性を評価できる。

ラットの骨再生では、単純 X 線像、骨密度、マイクロ CT が有用であった。マイクロ CT は、臨床応用が未だ困難である。MRI による造影所見は、直接骨形成を反映するとは限らないが、血流のある組織の新生を示しており、重要な指標となりうる。今後の課題である。

中期遠隔期までの経過観察で、再生血管は他に選択枝のない複雑心奇形症例において有用で現在まで、安全性にも問題がないと考えている。広く普及するために、産官学の協同体制が不可欠である。

心筋梗塞モデルにおいて、骨格筋筋芽細胞注射針での注入群(MI)と骨格筋筋芽細胞シート群(MS)では、MS 群の方が心室壁肥厚、HGF、VEGF の増加、血管新生のいずれにおいても優れていた。拡張型心筋症動物モデルにおいても、シート群の法が細胞注入群よりも

心不全の治療効果が優れていた。

E. 結論

材料開発では、BSE フリーの安全なコラーゲンとしてブタアテロコラーゲンはウシと同等の特性であった。魚類のコラーゲンは、変成温度に差があり、種免疫的交差性は極めて低い。コラーゲン結合性血管内皮増殖因子を開発した。薬物放出速度を制御できる治療用ソフトコンタクトレンズを開発した。ヒト軟骨分化を促進する新規多糖材料を開発した。従来触媒に比べて毒性のない触媒に変更した生分解性材料を合成した。マナマコ体壁よりフカン硫酸 A, および B の二種を単離・精製し、両フカン硫酸の、強い破骨細胞形成抑制活性を発見した。

評価技術の標準化では、ヒト間葉系幹細胞の染色体標本作製最適プロトコルを確立した。幹細胞の癌化に対する安全性として、細胞増殖に係る c-myc, Nucleostemin, 発癌に関わる Wnt-8B, cx43 などの遺伝子発現解析が重要な評価システムの候補となる。二次元、三次元培養系における非破壊的及び連続的な細胞増殖過程の評価方法を確立した。再生軟骨の摩擦特性評価機器として、一方向往復試験機を作製した。動物モデルにおける再生軟骨治療効果の評価方法の開発のためにブタを用いた実験を開始した。再生製品の迅速な品質評価系として、培養上清から I 型コラーゲン、細胞抽出液から ALP 活性、Gla 型オステオカルシンの測定が可能であった。ハイドロキシアパタイト・コラーゲン複合体の材料規格・試験方法について検討した。ハイドロキシアパタイトカラムを用いた高速液体クロマトグラフィー法はコラーゲン溶液を非破壊的に簡便・迅速に評価する方法として有用である。ラット頭蓋骨由来骨芽細胞は骨補填材の評価に使用可能であったが、アパタイト・コラーゲンの評価については、骨分化能が予想外に悪く、前処理条件、培養条件の最適化などを検討する必要がある。

臨床評価では、関節軟骨欠損の症例をみつめ、臨床症状、血清、関節液中のマーカー、MRI、物理学的評価のプロトコルを作成した。再生骨では、連通多孔体人工骨にラットの骨髄由来細胞を導入し、ラット筋肉内で

の骨再生を 3 次元 CT を用いて定量評価できた。同様に、患者における再生骨評価も可能であった。フィブリン弼塗布した生分解性導管に、骨髄細胞を播種後、自己血清に浸漬して細胞を接着させて、バイオ血管を構築できた。心筋再生におけるヒト臨床評価での安全性の課題を抽出するために、自己の筋芽細胞を分化誘導した細胞を温度感応性応答皿で重層三次元筋芽シートを作製し、ラット、ハムスター、犬の各心筋組織へ移植し、移植前後の効果を比較できた。

F. 研究発表

1. 論文発表

1. 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、印刷中
2. Nagahata M, Nakaoka R, Teramoto A, Abe K, Tsuchiya T, The response of normal human osteoblasts to anionic polysaccharide polyelectrolyte complexes. *Biomaterials*, accepted.
3. Nakaoka R, Ahmed S, Tsuchiya T, Hydroxyapatite microspheres enhance gap junctional intercellular communication of human osteoblasts composed of connexin 43 and 45. *J. Biomed. Mater. Res. A*, accepted.
4. Saifuddin Ahmed, Toshie Tsuchiya and Yutaka Kariya, 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* accepted.
5. Rumi Sawada, Tomomi Ito, Yoshie Matsuda, and Toshie Tsuchiya, Safety evaluation of tissue engineered medical devices using normal human mesenchymal stem cells. *Animal Cell Technology* accepted.
6. Nasreen Banu, Toshie Tsuchiya, Saifuddin Ahmed, and Rumi Sawada, 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* accepted.
7. Yuping Li, Tsutomu Nagira and Toshie Tsuchiya, Increase of the insulin secretion in hit-t15 cells: Gap Junctional Intercellular communications Enhanced by Hyaluronic Acid. *Animal Cell Technology* accepted.
8. Nasreen Banu and Toshie Tsuchiya, Markedly different action of the Hyaluronic acids and Chondroitin sulfate-A on the differentiation of human articular chondrocytes between micromass and 3-D honeycomb rotation cultures. *Biomaterials* Submitted
9. Tsutomu Nagira, Susan Matthew, Yoko Yamakoshi and Toshie Tsuchiya, A Remarkable Enhancement of Gap junctional Intracellular Communication of Normal Human Dermal Fibroblasts Cultured on Polystyrene Dishes Grafted with Poly-N-isopropylacrylamide (PIPAAm). *Tissue Engineering*. Accepted.
10. Nasreen Banu, Yasmin Banu, Toshie Tsuchiya, Studies on the development of evaluation method and the biocompatibility of functional biomaterials. *J. Artificial Organs*. Submitted
11. Toshie Tsuchiya A useful marker for evaluating the safety and efficacy of tissue engineered products. *ASTM, STP1452*, 254-261, 2004.
12. Misao Nagahata, Toshie Tsuchiya et. al, A novel function of N-cadherin and Connexin43 :Marked enhancement of alkaline phosphatase activity in rat calvarial osteoblast exposed with sulfated hyaluronan, *Biochem. Biophys. Res. Commun* , 315(3), 603-611, 2004
13. 土屋利江, 第7章 再生医療とその周辺 再生医療をとりまく規制とその現状・今後, 立石 哲也, 田中 順三, 図解 再生医療工学, 工業調査会, 296-303, 2004.
14. 柳楽 勤, 土屋利江, メカニカルストレスに対する細胞応答の分子機構, 大森豊明, 生体物理刺激と生体反応, フジテクノシステム, 667-677, 2004
15. 土屋利江、バイオマテリアルの安全性を考える、バイオマテリアル-生体材料-, 22-2, 69-70, 2004
16. 土屋利江、バイオマテリアルの許認可と留意点、バイオマテリアル-生体材料-, 22-4, 258-264, 2004
17. Saifuddin Ahmed, Toshie Tsuchiya, Novel mechanism of tumorigenesis: Increased transforming growth factor-beta 1 suppresses the expression of connexin 43 in BALB/cJ mice after implantation of poly-L-lactic acid. *J Biomed Mater Res*, 70, 335-340, 2004
18. Takeshi Yagami, Yuji Haishima, Toshie Tsuchiya, Akiko Tomitaka-Yagami, Hisao Kano, Kayoko Matsunaga, Proteomic Analysis of Putative Latex Allergens. *Allergy and Immunology*, 135, 3-11, 2004
19. 土屋利江、バイオマテリアルの安全性について組織工学用材料を中心として、日本再生歯科医学会誌、2, 1-8, 2004
20. 土屋利江、ティッシュエンジニアリング用マテリアルの製品化条件と国際標準化、再生医療、3 巻,5 月号,71-75,2004
21. Tsuchiya T, Sakai M, Ikeda H, Mashino T, Banu Y, Biocompatible biomaterials for the human chondrocyte differentiation estimated by RT-PCR method, *Animal cell technology*, 13, 475-479, 2004
22. Saifuddin Ahmed and Toshie Tsuchiya, Different expression on Gap junctional protein connexin43 in two strains of mice after one-month Implantation of Poly-L-Lactic acid, *Animal cell technology*, 13, 481-485, 2004
23. Rahman MS, Banu Y, Matsuoka A, Ichikawa A, Sakai M, Ikeda H, Tsuchiya T, Evaluation of the immuno-protective effects of the new-type of bags using elisa and facs-analysis, *Animal cell technology*, 13, 277-280, 2004
24. 土屋利江, 細胞組織医療機器等の製品化のため

- のガイドライン・環境整備について 高分子、53巻、3月号、144-146、2004
25. 土屋利江, 細胞組織医療機器等の品質・安全性確保について, 再生医療, 3巻,2月号, 107-110, 2004
26. Atsuko Matsuoka, Toshie Tsuchiya, Gene expression changes in Balb/3T3 transformants induced by poly(L-lactic acid) or polyurethane film, *J. Biomed. Mater. Res*, 68A, 376-382, 2004
27. Zhang, Y., Kariya, Y., Conrad, A. H., Tasheva, E. S., and Conrad, G. W. Analysis of keratan sulfate oligosaccharides by electrospray ionization tandem mass spectrometry *Anal. Chem.*, 77, 902-910 (2005)
28. Kariya, Y., Mulloy, B., Imai, K., Tominaga, A., Kaneko, T., Asari, A., Suzuki, K., Masuda, H., Kyogashima, M., and Ishii, T. Isolation and partial characterization of fucan sulfates from the body wall of sea cucumber *Stichopus japonicus* and their ability to inhibit osteoclastogenesis. *Carbohydr. Res.*, 339, 1339-1346 (2004).
29. Ashikari-Hada, S., Habuchi, H., Kariya, Y., Itoh, N., Reddi, A. H., and Kimata, K. Characterization of growth factor-binding structures in heparin/heparan sulfate using an octasaccharide library *J. Biol. Chem.*, 279, 12346-12354 (2004).
30. Hayashi, N., Miyata, S., Kariya, Y., Takano, R., Hara, S., and Kamei, K. Attenuation of glial scar formation in the injured rat brain by heparin oligosaccharides *Neurosci. Res.*, 49, 19-27 (2004)
31. Wakitani S, Aoki H, Harada Y, Sonobe M, Morita Y, Mu Y, Tomita N, Nakamura Y, Takeda S, Watanabe T, Tanigami A. Embryonic stem cells form articular cartilage, not teratomas, in osteochondral defects of rat joints. *Cell Transplant* 13(4):331-336, 2004
32. Wakitani S, Mitsuoka T, Nakamura N, Toritsuka Y, Nakamura Y, Horibe S. Autologous bone marrow stromal cell transplantation for repair of full-thickness articular cartilage defects in human patellae: Two case reports. *Cell Transplant* 13(5): 595-600, 2004
33. Yamamoto T, Wakitani S, Imoto K, Hattori T, Nakaya H, Saito M, Yonenobu K. Fibroblast growth factor-2 promotes repair of partial thickness defects of immature rabbits but not in mature rabbits. *Osteoarthritis Cart* 12(8):636-641, 2004
34. Katayama R, Wakitani S, Tsumaki N, Morita Y, Matsushita I, Gejo R, Kimura T. Repair of articular cartilage defects in rabbits using CDMP1 gene-transfected autologous mesenchymal cells derived from bone marrow. *Rheumatology (Oxford)* 43(8):390-395, 2004
35. Takagi M, Fukui Y, Wakitani S, Yoshida T. Effect of poly DL-lactic-co-glycolic acid mesh on a three-dimensional culture of chondrocytes. *J Biosci Bioeng* 98(6):477-481, 2004
36. 脇谷滋之. 関節軟骨再生現状と展望. *分子リウマチ* 1(2):47-52(119-124), 2004
37. 服部高子、脇谷滋之. 骨髄間葉系細胞移植、関節外科 23(5):96-99(688-691), 2004
38. 天正恵治、中谷宏幸、岡部高弘、脇谷滋之. 変形性関節症の軟骨再生の現状と将来. *Journal of Clinical Rehabilitation* 13: 436-442, 2004
39. 縄田昌司、脇谷滋之. 軟骨再生 I. *臨床スポーツ医学* 21(6):605-610, 2004
40. 岡部高弘、中谷宏幸、天正恵治、脇谷滋之. 種々細胞利用による関節軟骨修復法の現状. *Clinical Calcium* 14: 1116-1121, 2004
41. Yoshikawa, H., Nakase, T., Myoui, A., Ueda, T.: Bone morphogenetic proteins in bone tumors. *Journal of Orthopaedic Science*, 9:334-340, 2004.
42. Myoui, A., Tamai, N., Nishikawa, M., Araki, N., Nakase, T., Akita, S., Yoshikawa, H.: Three-dimensionally engineered hydroxyapatite ceramics with interconnected pores as a bone substitute and tissue engineering scaffold. In: *Biomaterials in Orthopedics*, Marcel Dekker Inc., p. 287-300, 2004.

43. Akita, S., Tamai, N., Myoui, A., Nishikawa, M., Kaito, T., Takaoka, K., Yoshikawa, H.: Capillary vessel network integration by inserting a vascular pedicle enhances bone formation in tissue-engineered bone using interconnected porous hydroxyapatite ceramics. *Tissue Engineering*, 10:789-795, 2004
44. Nishikawa, M., Myoui, A., Ohgushi, H., Ikeuchi, M., Tamai, N., Yoshikawa, H.: Bone tissue engineering using novel interconnected porous hydroxyapatite ceramics combined with marrow mesenchymal cells: Quantitative and three-dimensional image analysis. *Cell Transplantation*, 13:367-376, 2004
45. 樋口周久、吉川秀樹: 骨形成因子(BMP)、骨粗鬆学・基礎・臨床研究の新しいパラダイム、日本臨床、62:52-56, 2004.
46. 名井陽、吉川秀樹: 連通多孔体型ハイドロキシアパタイトの開発と再生医療への展開、骨・関節・靭帯、17:1205-1215, 2004.
47. 玉井宣行、名井陽、荒木信人、秋田鐘弼、中瀬尚長、海渡貴司、村瀬剛、上田孝文、越智隆弘、吉川秀樹: 新規全気孔連通型 HA 多孔体 NEOBONE を用いた骨欠損に対する治療、関節外科、23:100-107, 2004.
48. 玉井宣行、名井陽、橋本英雄、西川昌孝、藤井昌一、中瀬尚長、橋本淳、上田孝文、越智隆弘、吉川秀樹: 人工骨材料と骨・関節修復、新規全気孔連通型 HA 多孔体 NEOBONE を用いた骨・関節修復、分子リウマチ、1:107-112, 2004.
49. Toshiharu Shin'oka, Hiromi Kurosawa Clinical results of tissue engineered vascular autografts seeded with autologous bone marrow cells *J Thorac Cardiovasc Surgery* (in press), 2005
50. 新岡俊治 骨髄細胞を使用する再生血管移植の臨床 外科学会雑誌 105:459-463, 2005
51. Toshiharu Shin'oka Mid-term clinical results of tissue engineered vascular autografts seeded with autologous bone marrow cells *Current Perspective in Cell Based Therapy* 45:73-74, 2004
52. 新岡俊治、黒澤博身、長津正芳、松村剛毅、小坂由道、小沼武司、日比野成俊 心臓血管外科の再生治療の臨床 *Cardiovascular Med-Surg* 6:346-356, 2004
53. 新岡俊治 「再生医療」小澤論文に対する comment *小児循環器学会誌* 20:15-16, 2004
54. 新岡俊治 骨髄細胞を使用する再生血管移植の臨床 *Medical View Point* 25:9, 2004
55. 新岡俊治、黒澤博身 「ラット肺に対する経肺動脈 HGF 遺伝子導入による新生血管の検討」小野論文に対する comment *心臓*
56. 保々恭子、松村剛毅、新岡俊治、黒澤博身 バイオ人工血管の臨床応用 *血管医学* 5:587-593, 2004
57. 小坂由道、松村剛毅、新岡俊治 ティッシュエンジニアリングによる血管再生とその臨床応用 *Angiology Frontier* 3:139-142, 2004
58. 松村剛毅、新岡俊治、黒澤博身 心臓血管外科の再生治療の基礎 *Cardiovascular Med-Surg* 6:340-345, 2004
59. 小坂由道、新岡俊治 自己骨髄細胞を用いた再生血管移植 *医学のあゆみ* 210: 215-216, 2004
60. 内藤祐次、新岡俊治、松村剛毅、日比野成俊、三宅武史、村田明、黒澤博身 *tissue engineering* 技術による血管の再生 *実験医学* 22:1188-1193, 2004
61. 内藤祐次、新岡俊治、松村剛毅 生体吸収性ポリマーを使用する再生血管の臨床応用高分子 53:153, 2004
62. 日比野成俊、新岡俊治 バイオ人工血管 バイオマテリアル 2004
63. 松村剛毅、新岡俊治 弁の再生医療 *現代医療* 36:23-27, 2004
64. Sakamoto T, Kurosawa H, Shin'oka T, Aoki M, Isomatsu Y The influence of pH strategy on cerebral and collateral circulation during hypothermic cardiopulmonary bypass in cyanotic patients with heart disease: Results of a randomized trial and real-time monitoring *J Thorac Cardiovasc Surgery* 127:12-19, 2004 R. Ohata, N. Tomita, and Y. Ikada, Effect of a static

magnetic field on ion transport in a cellulose membrane, *Journal of Colloid and Interface Science*, 270, 413-416 2004

65. Shigeyuki Wakitani, Hideyuki Aoki, Yasuji Harada, Masato Sonobe, Yusuke Morita, Ying Mu, Naohide Tomita, Yukio Nakamura, Satoshi Takeda, Takeshi K. Watanabe, and Akira Tanigami, Embryonic Stem Cells Form Articular Cartilage, not Teratomas, in Osteochondral Defects of Rat Joints, *Cell Transplantation*, 13, 331-336, 2004

66. 寺村 聡, 富田直秀, 河島俊一郎, 藤田和久, 青木正彦, 井須俊郎 人工膝関節用 Vitamin E 添加超高分子量ポリエチレンの耐酸化性, *表面科学*, 25(9), 568-572, 2004

67. 小林正和, 山下進介, 西脇眞二, 泉井一浩, 吉村允孝, 富田直秀 トポロジー最適化と形状最適化に基づいたコンプライアントメカニズムの多段階創成設計法, *精密工学会誌*, 70(11), 1455-1460, 2004

68. 柴田延幸, 富田直秀 ビタミン E の抗酸化作用がデラミネーションを含む UHMWPE の疲労特性の向上に及ぼす影響, *日本臨床バイオメカニクス学会誌*, 25, 357-362, 2004

69. 丹羽康仁, 山田修一, 柴田延幸, 倪慶清, 増田稔, 村田功二, 寺村 聡, 小林広樹, 富田直秀, 人工膝関節用超高分子量ポリエチレンの微小領域変形挙動に関する研究, *日本臨床バイオメカニクス学会誌*, 25, 363-368, 2004

70. 富田 直秀 生体材料と生体内環境設計 (bio-Environment Designing for Biomaterials), *材料*, 53(1), 91-94, 2004

71. 富田 直秀 生体内設計 (方法論としてのオートポイエティック・マシン), *骨・関節・靭帯*, 17(3), 269-274, 2004

72. 富田 直秀 人工膝関節の工学デザインの限界と可動性, *関節外科*, 23(7), 17-22, 2004

73. 富田 直秀 生体機能の自律性と効率化, *京機短信*, No.4, 1-2, 2004

74. 富田 直秀 「機能設計から生体環境設計へ (「安心」を育てる科学と医療)」序論:「生命」を基本に置く医

療を求めて, *生命誌との関わり* 中村桂子, 2005.2.25

2. 学会発表

1. 土屋利江:教育講演「再生医療実用化への道」第4回日本再生医療学会総会(2005.3) 大阪

2. 土屋利江:「ISO TC194 医療機器の生物学的評価と動物福祉」第27回日本学術会議トキシコロジー研究連絡委員会シンポジウム (2004.11) 東京

3. Saifuddin Afmed, Toshie Tsuchiya and Yutaka Kariya: Studies on the efficacy, safety and quality of the tissue engineered products: enhancement of proliferation of human mesenchymal stem cells by the new polysaccharides. The 17th Annual and International Meeting of the Japanese Association for Animal Cell technology. 2004 11. Nagoya

4. Nasreen Banu, Toshie Tsuchiya, Saifuddin Afmed and Rumi Sawada: Studies on the efficacy, safety and quality of the tissue engineered products: toxic effects of catalyst used in chondrogenesis of human articular cartilage. The 17th Annual and International Meeting of the Japanese Association for Animal Cell technology. 2004 11. Nagoya

5. Yuping Li, Tsutomu Nagira and Toshie Tsuchiya: Increase of the insulin secretion in HIT-T15 cells enhancement of gap functional intercellular communication caused by hyaluronic acid. The 17th Annual and International Meeting of the Japanese Association for Animal Cell technology. 2004 11. Nagoya

6. Rumi Sawada, Tomomi Ito, Yoshie Matsuda and Toshie Tsuchiya: Safety evaluation of tissue engineered medical devices using normal human mesenchymal stem cells. The 17th Annual and International Meeting of the Japanese Association for Animal Cell technology. 2004 11. Nagoya

7. N. Nakamura and T. Tsuchiya: Effect of

- biodegradable polymer plla on the cellular function of human astrocyte. The 17th Annual and International Meeting of the Japanese Association for Animal Cell technology. 2004 11. Nagoya
8. Toshie Tsuchiya: Regulation and Activities of Standardization for Tissue Engineered Products and Medical Devices in Japan. 4th ASIAN INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON BIOMATERIALS 2ND INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON FUSION OF NANO AND BIOTECHNOLOGIES (FNB) 2004 11. Tsukuba
 9. 柳楽勤、土屋利江、阿部康次、長幡操:「陰イオン修飾ヒアルロン酸によるヒト間葉系幹細胞の分化促進効果」日本バイオマテリアル学会シンポジウム 2004 (2004. 11) つくば
 10. 中岡竜介、Susan Hsiong、土屋利江、David J. Mooney:「細胞接着ペプチド修飾アルギン酸ゲル上での細胞機能変化 日本バイオマテリアル学会シンポジウム 2004 (2004. 11) つくば
 11. 松岡厚子、松田良枝、藪島由二、長谷川千恵、土屋利江:「医療機器の生物学的安全性試験の標準化に関する研究:医用材料関連物質による染色体数異常の誘発」日本バイオマテリアル学会シンポジウム 2004 (2004. 11) つくば
 12. 藪島由二、長谷川千恵、小園知、伊佐間和郎、佐々木和夫、矢上健、土屋利江:「エンドトキシン不活化処理を施した天然医用材料の生体親和性評価」日本バイオマテリアル学会シンポジウム 2004 (2004. 11) つくば
 13. 伊佐間和郎、藪島由二、長谷川千恵、小園知、佐々木和夫、土屋利江:「ガンマ線照射天然医療材料の生体適合性評価」日本バイオマテリアル学会シンポジウム 2004 (2004. 11) つくば
 14. 伊佐間和郎、土屋利江:「ガンマ線照射ポリ乳酸のアパタイト形成能」日本バイオマテリアル学会シンポジウム 2004 (2004. 11) つくば
 15. 五十嵐良明、鹿庭正昭、土屋利江:「マウスを用いたタンパク材料の即時型アレルギー性評価」日本バイオマテリアル学会シンポジウム 2004 (2004. 11) つくば
 16. 中岡竜介、長幡操、寺本彰、阿部康次、土屋利江:「高分子電解質錯体上での骨芽細胞の機能変化とその安全性の予測」日本バイオマテリアル学会シンポジウム 2004 (2004. 11) つくば
 17. Toshie Tsuchiya: Evaluation of Cell and tissue Based Products in Japan. The 2nd KFDA-KRIBB Joint International Symposium International Harmonization on Biopharmaceuticals. 2004 10. Korea
 18. 土屋利江:「前臨床試験としての動物モデル(特徴と限界)総論」第2回医療機器フォーラム 医療機器・細胞組織医療機器の前臨床試験等について (2004. 10) 東京
 19. 土屋利江:「国内における医療用具の安全性対策について」第42回日本人工臓器学会大会 (2004. 10) 東京
 20. 土屋利江:「金属材料等の評価について」第44回日本歯科理工学会学術講演会 (2004. 9) 京都
 21. 土屋利江:「期待される材料開発」交流連携推進委員会 医療準備会 (2004. 8) 東京
 22. 土屋利江:「医療機器としての人工臓器の開発」みらいせんい展健康系イベントシンポジウム 人工臓器とファイバー (2004. 8) 東京
 23. 土屋利江:「再生医療デバイス実用化のために」みらいせんい展健康系イベントシンポジウム 再生量を切りひらくファイバーエンジニアリング (2004. 8) 東京
 24. 五十嵐良明、鹿庭正昭、土屋利江:「マウスを用いた医用材料のアレルギー性評価法に関する検討」日本トキシコロジー学会学術年会 (2004. 7) 大阪
 25. 土屋利江:「医療用具の安全性」第35回バイオメディカルカリキュラム講義 (2004. 7) 東京
 26. 土屋利江:「医療機器、医療材料の薬事法改正による安全性確保対策等について」第20回日本人工臓器学会 教育セミナー (2004. 7) 東京
 27. Nasreen Banu, Toshie Tsuchiya, Saifddin Ahmed, Rumi Sawada: Studies on the efficacy, safety and quality of the tissue engineered products:Influence of a catalyst used in the synthesis of biodegradable polymer on chondrogenesis of human articular cartilage. 第7

- 回日本組織工学会 (2004. 7) 東京
28. Saifuddin Ahmed, Toshie Tsuchiya, Yutaka Kariya: Studies on the efficacy, safety and quality of the tissue engineered products: Effect of new polysaccharides in Human mesenchymal stem cells. 第7回日本組織工学会 (2004. 7) 東京
29. 澤田留美、伊藤友実、松田良枝、土屋利江:「細胞組織医療機器の有効性・安全性・品質評価に関する研究(2) 遺伝子発現解析によるヒト間葉系幹細胞とポリ乳酸の相互作用について」第7回日本組織工学会 (2004. 7) 東京
30. 伊藤友実、澤田留美、松田良枝、松岡厚子、土屋利江:「胞組織医療機器の有効性・安全性・品質評価に関する研究(3) ヒト間葉系幹細胞における TGF- β の遺伝子発現解析について」第7回日本組織工学会 (2004. 7) 東京
31. 長幡操、柳楽勤、土屋利江、阿部康次「採取年齢の違いによるヒト骨芽細胞の分化の顕著な違いと硫酸化ヒアルロン酸に反応する細胞内シグナル伝達分子の探索」第7回日本組織工学会 (2004. 7) 東京
32. 土屋利江:「なぜ医療機器は海外で開発されるのか? - 日本の現状と課題」次世代医療システム産業化フォーラム2004 (2004. 6) 大阪
33. Toshie Tsuchiya, Nasreen Banu, Sadami Tsutsumi: Different action on the chondrogenesis of human articular chondrocytes with hyaluronic acid and collagen matrix. 7th World Biomaterial Congress (2004,5) Sydney
34. Toshie Tsuchiya: Recent Activities of Standards of Medical Devices and Tissue Engineered Products in Japan. International Conference on Biomaterials and Tissue Engineering 2004 (2004,5) Kuala Lumpur.
35. Toshie Tsuchiya: Overview on Biological and Clinical Evaluation. International Conference on Biomaterials and Tissue Engineering 2004 (2004,5) Kuala Lumpur.
36. 土屋利江:「医療機器、細胞組織医療機器の製品化のための規制環境の整備について」東京大学医科学研究所 講演(2004.4) 東京
37. 土屋利江:「再生医療に関わる評価技術とその標準化」第3回 CERES 研究会・講演会 (2004. 4) 東京
38. N. Banu, T. Tsuchiya, S. Ahmed, R. Sawada “Studies on the efficacy, safety and quality of the tissue engineered products : Influence of a catalyst used in the synthesis of biodegradable polymer on chondrogenesis of human articular cartilage” 第7回組織工学会 (2004. 7)
39. R. Sawada, T. Ito, Y. Matsuda, and T. Tsuchiya “Safety evaluation of tissue engineered medical devices using normal human mesenchymal stem cells”, 17th Annual and International Meeting of the Japanese Association for Animal Cell Technology (JAACT) (2004. 11)
40. 澤田留美、李 玉萍、土屋利江「ヒト心線維芽細胞における物理的ストレスに反応する分子メカニズムの解明」第4回再生医療学会 (2005. 3)
41. 伊藤友実、澤田留美、土屋利江「ヒト間葉系幹細胞の増殖における b-FGF の影響」第4回再生医療学会 (2005. 3)
42. Wakitani S. Autologous culture expanded bone marrow mesenchymal cell transplantation for cartilage repair. International Cartilage Symposium Hiroshima, 2004.2.12, Hiroshima
43. 縄田昌司、脇谷滋之、中谷宏幸、中村幸男、天正恵治、岡部高弘、加藤博之、高岡邦夫. BMP と diffusion chamber による異所性軟骨誘導と骨軟骨欠損修復への応用. 第17回日本軟骨代謝学会、2004年3月 新宿
44. 縄田昌司、脇谷滋之、中谷宏幸、中村幸男、天正恵治、岡部高弘、加藤博之、高岡邦夫. BMP と diffusion chamber による異所性軟骨誘導. 第3回日本再生医療学会、2004年3月 幕張
45. 中嶋正明、脇谷滋之、原田恭治、園部正人、谷上信、富田直秀. 肺性幹細胞(ES 細胞)移植後の関節運動が関節軟骨の再生に及ぼす影響(part1). 第3回日本再生医療学会、2004年3月 幕張
46. 原田恭治、富田直秀、中嶋正明、脇谷滋之. 肺性

幹細胞 (ES 細胞) 移植後の関節運動が関節軟骨の再生に及ぼす影響(part2:正常修復との対比). 第 3 回日本再生医療学会、2004 年 3 月 幕張

47. 脇谷滋之. 骨髄間葉系細胞による関節軟骨の再生. 第 32 回日本リウマチ関節外科学会、2004 年 10 月 奈良

48. 脇谷滋之. ES 細胞からの軟骨分化. 第 19 回日本整形外科学会基礎学術集会、2004 年 10 月 高輪

G. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

特願 2004-026670 神経幹細胞増殖助剤及びこれを含んだ神経幹細胞用培地

特願 60/559030 (米国出願) 特異的 6-O-硫酸化 N-アセチルヘパロサンおよび造血幹細胞増殖助剤

特願 2004-264738 生理活性分子含有架橋ヘパリンゲル組成物

特願 2004-1932332 ギャップ機能抑制剤

特願 2004-167632 生体吸収性を有する新規材料、その製造方法、及びその用途

特願 2004-330417 生体組織補填材および生体組織補填体

特願準備中 生体組織補填材の製造方法

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし