

200401168 A

厚生労働科学研究研究費補助金

医薬品・医療機器レギュラトリーサイエンス総合研究事業

先端技術を活用した医療機器の評価に関する研究

平成 16 年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 岡野 光夫

平成 17 (2005) 年 4 月

目 次

I. 総括研究報告	1
先端技術を活用した医療機器の評価に関する研究	
岡野光夫	
II. 分担研究報告	9
1. 先端技術を活用した医療機器の評価に関する研究	
土屋利江	
III. 研究成果の刊行に関する一覧表	18
IV. 研究成果の刊行物・別刷	29

厚生労働科学研究研究費補助金
(医薬品・医療機器レギュラトリーサイエンス総合研究事業)
総括研究報告書

先端技術を活用した医療機器の評価に関する研究

主任研究者 岡野 光夫
東京女子医科大学先端生命医科学研究所所長・教授

研究要旨 近年、小規模ではあるがヒト臨床応用が開始されている細胞組織医療用具の有効性および安全性の評価技術の確立を目指して、細胞組織医療用具に関する現状把握に関する調査研究、それらに対する評価に関する研究、細胞組織利用医療機器の承認申請マニュアルに関する研究、組織工学用材用の安全性研究をおこなった。これらの成果は、有効性の高い細胞組織医療用具が安全に供給される体制の構築に貢献するものと考えられる。

A. 研究目的

(1) 細胞組織医療用具に関する現状把握に関する調査研究

小規模ではあるがヒト臨床応用が開始されている細胞組織医療用具の有効性および安全性の評価技術の確立を目指して、細胞組織医療用具に関する現状把握に関する調査研究をおこなう。

(2) 有害事象の原因となりうる細胞組織医療用具特異的問題に関する実験研究

有害事象の原因となりうると思われる細胞組織医療用具特異的問題に関して実験的研究により、その可能性を検討する。

B. 研究方法

(1) 細胞組織医療用具に関する現状把握に関する調査研究

PubMed (www.pubmed.gov)を用いた文献調査により、細胞組織医療用具(培養人工組織)のヒト臨床に関する報告を検索した。初年度にあたる本年度では角膜上皮幹細胞疲弊症治療のための培養角膜上皮細胞移植と、重症心不全治療を目的とする細胞移植に集中して研究をおこなった。

この他、ヒト臨床を開始もしくは準備している医師および研究者、細胞組織医療用具の商品化を目指しているバイオベンチャー企業にインタビュー

一をおこなった。

(2) 有害事象の原因となりうる細胞組織医療用具特異的問題に関する実験研究

角膜上皮幹細胞疲弊症の治療に用いる培養上皮組織においては、上皮幹細胞もしくは前駆細胞が十分な量、含まれていることが必要である。フローサイトメトリー、コロニー形成能試験、免疫組織染色、ウェスタンブロッティングなどを用い、様々な培養条件で作製した培養上皮組織中に含まれる上皮幹細胞もしくは前駆細胞を評価する。

培養骨や培養軟骨を中心に多くの培養組織の作製において足場材料として広く一般的に用いられている生分解性高分子材料であるポリ乳酸-ポリグリコール酸共重合体が惹起する炎症反応について小動物を用いた移植実験により評価する。

重症心不全治療を目的としておこなわれている自己骨髄細胞または自己筋芽細胞の注射筒による移植にもなう炎症反応について、小動物を用いた移植実験により評価する。

C. 研究結果

(1) 細胞組織医療用具に関する現状把握に関する調査研究

角膜上皮幹細胞疲弊症の再生医療的治療に関する論文は10報あり、合計69名の患者が治療を受けていた(表1)。重症心不全の治療を目的とした細胞移植のヒト臨床に関する論文は13報あり、145名の患者が治療を受けてい

た(表2)。論文化されていないヒト臨床研究として、この他に国内で角膜上皮幹細胞疲弊症治療を目的とした培養角膜上皮細胞移植が10数例、重症心不全治療を目的とした自己細胞移植も同様に10数例確認された。

角膜上皮幹細胞疲弊症の治療を目的とした培養上皮幹細胞移植では、ドナー角膜の利用以外に、片眼性の症例では細胞ソースとして自己健常眼より採取した輪部上皮細胞(角膜上皮幹細胞を含むと考えられている)が用いられていた。両眼性の症例ではドナー(血縁者を含む)から採取した輪部上皮細胞が多く用いられていた。

ドナー由来細胞を用いた場合、移植後の免疫抑制の制御が難しく、長期的な視力の改善が得られていない症例が報告されていた。この問題の解決を目指して、両眼性の症例の治療を目的として自己口腔粘膜上皮細胞を細胞ソースとした臨床研究が最近2報刊行されている。結果はおおむね良好であり、将来的には、両眼性の症例に関しては自己口腔粘膜上皮細胞を細胞ソースとして広く用いられるものと予想された。

角膜上皮幹細胞疲弊症では、患部組織内の角膜上皮幹細胞は完全に枯渇していると考えられており、移植に供する培養角膜組織中には上皮幹細胞もしくは前駆細胞が必須である。また長期の視力改善を期待するためには、これらの細胞が十分量存在することが必要であると考えられる。免疫抑制剤を使用することなく長期的に良好な予後を期待して自己細胞を用いるプロトコルでは、免疫抑制剤の副作用

や煩雑な投与量制御などの問題がすべて解決されるが、商品化にあたっては、以下のような問題が存在することが明らかになった。すなわち、患者から採取した細胞の増殖ポテンシャルや組織片中に含まれている幹細胞・前駆細胞の比率は患者ごとに大きく異なる可能性が想定され、一律の採取法や培養条件、評価法を適用することは現実にそぐわないとの懸念が多くの有識者より指摘された。

角膜上皮細胞の培養には、10報中7報でX線処理またはマイトマイシンC処理した3T3フィーダーレイヤーを用いていた。そのうちの一部ではカルチャーインサートを用いて、移植に供する培養上皮組織中への3T3フィーダーレイヤーのコンタミネーションを防止していた。ただしこの場合でも、3T3フィーダーレイヤーが合成・分泌したマウスタンパク質、糖質等の混入を防ぐことはできない。

牛胎児血清は、13報中12報で角膜上皮細胞の培養に用いられていた。現在までにBSE（狂牛病）が報告されていないニュージーランドやオーストラリア産の牛胎児血清を用いているものと考えられるが、将来にわたって、これらの地域でBSEが発生しないことを保証することはできないため、患者自己血清に置き換わっていくものと考えられる。

培養角膜上皮組織の移植には、キャリアーなしが2報、フィブリンゲルが2報、残り9報でヒト羊膜を用いていた。ヒト羊膜は出産時に採取されたものであり、フィブリンは血液製剤として市販されているものが用いられてい

た。十分な検査の後に培養に供されているものと考えられるが未知の病原体の感染を完全に否定することはできないため、可能であれば培養系、移植に供する培養組織から除去すべきである。このような観点からは温度応答性培養皿を用いて作製し、培養細胞以外に何も培養上皮組織中に含まない方法は、より安全な方法であると評価できる。

重症心不全治療を目的とした自己細胞注射の臨床研究に関する報告13報中10報で、冠動脈バイパス術(CABG)、経血管血管形成術(PTCA)、左心房補助装置(LVAD)の装着と同時におこなわれており、細胞移植それ自身の効果は明らかではない。また対照群が存在しない報告がほとんどであった。

すべての臨床研究で、注射筒を用いた細胞懸濁液の移植が用いられていた。動物実験用いた研究では、この方法では移植した細胞の数パーセントしか組織に生着できないことが明らかになっており、新しい細胞移植法の開発が必要である。

また数十から百カ所以上に注射をおこなっており、(2)で詳述するように、注射針が組織を傷つける問題を無視できるかに関して今後の検証が必要であると考えられる。

副作用として、心房性頻脈や心房性不整脈が複数報告されており、死亡例に関する記載もあった。これらの合併症と細胞移植との因果関係は十分に明らかではないが、今後、動物実験等を用いて、検証すべきである。

(2) 有害事象の原因となりうる細胞

組織医療用具特異的問題に関する実験研究

角膜上皮幹細胞疲弊症の治療に用いる培養上皮組織においては、上皮幹細胞もしくは前駆細胞が十分な量、含まれていることが必要である。これらの評価は、安全かつ有効な再生医療の実現にはきわめて重要であるものと想定されるが、これまでに蓄積された上皮幹細胞に関する治験は決して十分なものとは言えない。解決すべき諸問題の克服を目的として、以下の実験結果を得た。

これまでに報告されている様々な報告から、輪部上皮基底細胞のうち一部の細胞が角膜上皮幹細胞であることが明らかになっている。さらに我々は、種々の臓器の体性幹細胞に共通の性質であるヘキスト33342を排出するATP依存性トランスポーターABC2を細胞膜表面に発現するSP細胞を輪部上皮より単離することに世界で初めて成功した。この細胞は輪部上皮細胞の0.2~0.4%程度ときわめて少ないが、ヒト、ウサギ、ラットなどで共通に、この程度の頻度で存在していた。造血系SP細胞の移植結果から類推すれば、この輪部上皮SP細胞は、これまでに知られているいかなる上皮幹細胞よりも発生学的に上流に位置する細胞であると考えられる。今後、この細胞から最終分化上皮細胞までの細胞系譜とその制御、および各ステージ固有の分化マーカーの同定が必要である。また、このような基礎研究に立脚した移植に供する培養上皮組織の評価システムの開発が必要である。

現行の典型的な上皮細胞の培養条

件は、X線照射またはマイトマイシンC処理した3T3フィーダーレイヤーを用いて培地に種々の添加物と牛胎児血清を添加するものである。特に3T3フィーダーレイヤーと牛胎児血清は、コロニー形成試験などの細胞生物学的な実験から、最終的にでき上がった培養上皮組織中の幹細胞および前駆細胞の維持に必須であると考えられてきた。今後、培地血清や3T3フィーダーレイヤーの除去等により、最終的に移植に供する組織中の幹細胞・前駆細胞の量がどのように変化するかを定量的に検討する必要がある。本年度におこなった実験から、一様に移植可能な培養上皮を作成可能な種々の培養条件の間でも、上皮幹細胞・前駆細胞に特異的に発現すると考えられているp63の発現が大きく異なることを見出した。今後、この分子に注目したさらなる検討が必要である。

培養骨や培養軟骨を中心に多くの培養組織の作製において足場材料として広く一般的に用いられている生分解性高分子材料であるポリ乳酸-ポリグリコール酸共重合体は培養直後から顕著な炎症反応を惹起し、移植後10日目でも終焉することがなかった。すでに臨床に供されている素材ではあるが、異物認識の程度は決して小さくない。大量の細胞が播種されており、多少の細胞に傷害あっても問題とならないような場合では無視できるかもしれないものの、今後広まっていくと考えられる、少量の幹細胞を導入する系では無視できない可能性が高い。

重症心不全治療を目的としておこなわれている自己骨髄細胞または自

己筋芽細胞の注射筒による移植にともなう炎症反応について、小動物を用いた移植実験により評価した。皮下注射および筋肉注射をおこなったが、既報どおり細胞の組織への生着率は非常に低く数パーセント程度以下と見積もられた。注射針による組織傷害の結果と考えられる出血と血腫が観察されたが、炎症は1週以内に終了していた。注射した細胞は小さなコロニー状に組織中に生着していた。

D. 考察

(1) 細胞組織医療用具に関する現状把握に関する調査研究

1980年代中頃よりヒト臨床が始まった培養表皮に続いて、培養角膜上皮のヒト臨床も1995年より開始されていた。しかし、細胞ソースの最適化、培養系に含まれる他種成分、移植法等、今後解決すべき問題も多く残されている。

また、細胞ソースとしての自己細胞や免疫学的な有効性や、患者自己血清の感染症回避の観点からの有効性は明白であるものの、患者ごとに採取される組織片に含まれる幹細胞・前駆細胞や血清中の有効成分の量と質が異なる可能性が高く、一律のレギュレーションで対処すべきかどうかは十分な検討が必要である。

重症心不全患者心筋壁への自己細胞懸濁液の注射は、全例ではないものの著名な心機能の改善が報告されており、将来大きく期待できる。しかし、頻脈、不整脈などの合併症が複数例報告されており、この問題の解決は重要

である。また、細胞移植にともなう心機能の改善の分子機構も明らかにされるべきである。

(2) 有害事象の原因となりうる細胞組織医療用具特異的問題に関する実験研究

角膜上皮幹細胞疲弊症の治療に用いる培養上皮組織においては、上皮幹細胞もしくは前駆細胞が十分な量、含まれていることが必要であり、これを担保するためのヴァリデーション法の確立が必要である。現在でも、フローサイトメトリー、コロニー形成能試験、免疫組織染色、ウェスタンブロッティングなどを用いたアプローチが可能であるが、約2週間の培養期間中、可能であれば移植前日にきわめて短時間で迅速かつ精確にこれらの情報をえるためのプロトコルの開発が待たれる。

一方、今後、自己細胞を用いた治療が主流になる場合には、一律の評価法と一律の評価基準ですべての症例を評価することの意義について十分な検討をすべきである。高齢な患者と若年層の患者で、同量の幹細胞が必要であるとは考えにくい。

生分解性高分子製足場の分解や注射針の侵襲による炎症反応はたしかに存在していた。しかし、軽微な炎症反応は血管新生の観点からはむしろ有利であり、移植された細胞の傷害の程度とのバランスで評価されるべきであると思われる。

E. 結論

(1) 細胞組織医療用具に関する現状把握に関する調査研究

細胞ないし培養組織の移植による治療効果について分子レベルで理解することは必要であり、そのための基礎研究の充実は必要である。また、臨床結果の長期フォローアップはきわめて重要である。

(2) 有害事象の原因となりうる細胞組織医療用具特異的問題に関する実験研究

臨床の実態に即した評価技術の開発が必要である。闇雲に厳密な評価が必要であるか、評価法それぞれの意義を検討することも合わせて重要な課題である。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) K. Watanabe, K. Nishida, M. Yamato, T. Umemoto, T. Sumide, K. Yamamoto, N. Maeda, H. Watanabe, T. Okano and Y. Tano, "Human limbal epithelium contains side population cell expressing the ATP-binding cassette transporter ABCG2", *FEBS Lett.*, **565**, 6-10 (2004).
- 2) K. Nishida, M. Yamato, Y. Hayashida, K. Watanabe, K. Yamamoto, E. Adachi, S. Nagai, A.

Kikuchi, N. Maeda, H. Watanabe, T. Okano and Y. Tano, "Corneal reconstruction with tissue-engineered cell sheets composed of autologous oral mucosal epithelium", *N. Engl. J. Med.*, **351**(12), 1187-1196 (2004).

2. 学会発表

第7回日本組織工学会 2004. 7. 1-2 東京

- ・ 梅本晃正, 大和雅之, 西田幸二, 河野千夏, 渡辺克彦, 田野保雄, 岡野光夫, "角膜輪部上皮SP細胞における幹細胞・前駆細胞マーカーの発現解析", プログラム・抄録集, 89 (2004).

第25回日本炎症・再生医学会 -炎症の人為的制御- 2004.7. 13-14 東京

- ・ 梅本晃正, 大和雅之, 西田幸二, 河野千夏, 田野保雄, 岡野光夫, "角膜輪部上皮SP細胞における幹細胞/前駆細胞マーカーの発現解析", 炎症・再生, 24 (4), 500 (2004).

日本バイオマテリアル学会 シンポジウム2004 2004. 11. 15-16 つくば

- ・ 西田幸二, 大和雅之, 林田康隆, 菊池明彦, 岡野光夫, 田野保雄, "細胞シート工学による角膜再生", 予稿集, 85 (2004).

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

細胞ソース	培養条件	術式	患者数	対象患者の手術前の状態	追跡期間(平均)	結果	著者
自己角膜辺縁部 羊膜上 3週間	マイトマイシンC不活化3T3 低濃度牛血清 カルシウムなどを入れ 1週間気液界面	結膜化部除去後 10-0ナイロン糸 で縫合	1名	化学熱傷	19週間	19週間後に上皮は正常	Shigeru Kinoshita他 Acta Ophthalmol Scand 2004;82:468-471
自己角膜辺縁部 2-3週間 (2-3cmまで)	5%牛血清添加 0.5% DMSO, EGF, insulin cholera toxin	結膜化部除去後 10-0ナイロン糸 で縫合	6名	化学熱傷 偽翼状片 先天性翼状片	15ヶ月	2-4日で再上皮化 5例で「視力回復 炎症・血管新生なし 自己移植患者は上皮正常化 視力回復。」 近視トナー移植者は成功。 追跡中	N Engl J Med 2000;343:86-93
自己角膜辺縁部 羊膜上 10-14日培養	コロニー確立まで3T3共培養。 その後3T3除去。 その後羊膜上では気液界面	結膜化部除去後 10-0ナイロン糸 で縫合	14名(7名 自己)	化学熱傷 熱傷 SJS	11ヶ月(自己)		Cornea 2000;19: 421-426
米国角膜バンク 角膜辺縁部 羊膜上 28日	3T3共培養だがインサートによって隔離。 最後の数日は気液界面。	結膜化部除去後 10-0ナイロン糸 で縫合	11名	化学熱傷 SJS 偽翼状片 OCP	11ヶ月	5日で上皮化。 13眼中10眼が視力回復	Shigeru Kinoshita他 Ophthalmology 2001;108:1569-1574
所属する病院のアイバンク 角膜辺縁部細胞 羊膜上 15日	3T3は使用しているかについて言及なし。 ナイロン糸 で縫合	結膜化部除去後 10-0および8-0 ナイロン糸 で縫合	1名	熱熱傷	1年	視力の改善	Virender S. Sangwan他 Cornea 2003;21:478-481
自己生検結膜組織を 羊膜上 12-14日	無血清、KGF、EGF、insulin 牛脚下垂体抽出物	10-0 Vicryl 糸で縫合	7名	緑内障 偽翼状片	12ヶ月	約3日後に上皮化。 追跡期間中上皮は正常	ROGER W. BEUERMAN他 Transplantation 2004;77:1729-1734
自己口腔結膜上皮 羊膜上 1-2週間培養	マイトマイシンC不活化3T3。 1週間気液界面	結膜化部除去後 10-0ナイロン糸 で縫合	4名	化学熱傷 SJS	18ヶ月	二日後に上皮化。 視力は回復し安定。	S Kinoshita他 Br J Ophthalmol 2004;88:1280-1284
自己口腔結膜上皮 2週間	温度応答性インサート 3T3。 放射線照射された3T3。	結膜化部除去後 縫合なしで接着 培養皿からデイスバーで回収 ペトロラムガムゼカコンタクト に載せて濡んだ角膜除去後眼 に装着	4名 2名	OCP SJS 3名は角膜移植実施経験あり アルカ熱傷	14ヶ月 2年以上	2-10週で視力回復。 追跡期間中透明性は保たれる。 両例とも上皮化正常。 血管新生なし。 免疫組織学的な結果も正常。 14例が成功。 炎症や血管新生なし。 視力回復。 3例は視力回復見られず。 他の例では追跡期間中視力安定。	N Engl J Med 2004;351:1187-96 Lancet 1997;349:990-93
自己角膜・結膜・角膜辺縁部 16ないし19日	放射線照射された3T3。	コンタクトレンズに24h-36h 置けた後、結膜化部除去後 に8-0ナイロン糸で縫合	18名	角膜上皮幹細胞癌症	約1年		Graziella Pellegrini他 Transplantation 2001;72:1478-85

OCP: 眼瞼天窓
SJS: スタイブアンズジョンソン症候群

表1 角膜の再生医療

細胞	移植方法	患者数	参加条件	追跡期間	結果	著者
自己単核骨髄細胞	CABG施行時 心筋注射	5	梗塞後時間がたっていないこと	1年	心還流量の増大(3人)	Hamano他 Jpn Circ J 2001; 65:845-847.
自己単核骨髄細胞	PTCA施行時 冠動脈内注入	10	梗塞後5-9日	3ヶ月	虚血部の縮小 心壁の動きの増加 心還流量の増加	Strauer他 Circulation 2002;106:1913-1918.
自己単核骨髄細胞と 培養自己血管内皮前駆細胞	PTCA施行時 冠動脈内注	20	梗塞後3日未満	4ヶ月	LVEFと収縮期量の改善 心還流量の増加 収縮能の改善	Assmus他 Circulation 2002; 106:3009-3017.
AC133と自己骨髄細胞	CABG施行時 心筋注射	12	梗塞後10日以上で3ヶ月未満	3-9ヶ月	4/6でEFの改善・5/6で還流量増加	Stamm他 Lancet 2003; 361:45-46. Thorac Cardiovasc Surg 2004; 52:152-158.
自己単核骨髄細胞	心筋注射 エレクトロマップを用いて 開胸しない	8	重症心虚血		angial症状の改善 心還流量の改善 収縮能の改善	Tse他 Lancet 2003; 361:47-49.
自己単核骨髄細胞	心筋注射 エレクトロマップを用いて 開胸しない	14	うっ血性心疾患	3ヶ月	LVEFと収縮期量の改善 心還流量の増加 収縮能の改善	Perin他 Circulation 2003; 107:2294-2302.
自己骨格筋筋芽細胞	CABG施行時 心筋注射	10	うっ血性心疾患	2ヶ月	LVEFと収縮期量の改善 心収縮能の改善	Menasche他 J Am Coll Cardiol 2003; 41:1078-1083.
自己骨格筋筋芽細胞	CABG施行時 心筋注射	12	時間のたった梗塞と虚血性のCAD	10.9ヶ月	LVEF改善例 高所収縮性改善例	Paganini他 J Am Coll Cardiol 2003; 41:879-888.
自己骨格筋筋芽細胞	LVAD施行時 心筋注射	5	心虚血性疾患とうっ血性心不全	68-191日	痛んだ心筋に筋管の発生	Smits他 J Am Coll Cardiol 2003;42:2063-2069.
自己骨格筋筋芽細胞	心筋注射 エレクトロマップを用いて 開胸しない	5	虚血性心疾患	6ヶ月	LVEFの改善と心壁の 厚さが注入部で改善	Wollert他 Lancet 2004;364:141-148.
自己骨髄細胞	PTCA施行時 冠動脈内注入	30	梗塞から5日未満	6ヶ月	LVEFの改善と 収縮能の改善	Chen他 Am J Cardiol 2004; 94:92-95.
自己骨髄間葉系細胞	PTCA施行から18日後 冠動脈内注入	34	梗塞後10日	3-6ヶ月	心壁の運動能異常と 還流量異常の減少 心筋のEDVとLESVなくなり 心壁の動きの速度とLVEF改善	Kang他 Lancet 2004; 363:751-756.
自己末梢血細胞と 静脈内注入G-CSF	PTCA施行時 冠動脈内注入	10	急性梗塞(48時間以上)もしくは時間のたった梗塞ヶ月		G-CSFの群では ステント内に再狭窄	

表2 心筋の再生医療

先端技術を活用した医療機器の評価に関する研究

分担研究者 土屋利江 国立医薬品食品衛生研究所 療品部

- (1) シート工学として注目され、様々な細胞組織医療機器への製造工程に使用される温度応答性ポリマーの生体適合性評価を行い、ギャップ機能を顕著に亢進する優れた材料であった。具体的には、培養ディッシュにコーティングした温度応答性ポリマーである、ポリ-N-イソプロピルアクリルアミドが、正常ヒト皮膚繊維芽細胞のギャップ結合細胞間連絡機能に与える影響および、そのギャップ結合細胞間連絡機能を担うタンパク質の一種であるコネキシン 43 の発現に与える影響、さらに繊維芽細胞の増殖に与える影響に関する研究を行った。
- (2) 骨再生用スキャホールドとしてリン酸カルシウム材料が使用されている。5種の材料の細胞毒性を調べた結果、 α 型リン酸三カルシウムとフッ素化アパタイトが強い細胞毒性を示し、5種の材料は、いずれもバルク上でのコロニー形成を抑制し、改質する必要がある。具体的には、水酸アパタイト($\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$: HAp), フッ素化アパタイト($\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6\text{F}_2$: FAp), α 型リン酸三カルシウム(α - $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$: α -TCP), β 型リン酸三カルシウム(β - $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$: β -TCP), そしてリン酸四カルシウム($\text{Ca}_4(\text{PO}_4)_2\text{O}$: TTCP)の5種の粉末を一軸加圧成形しペレット状にした。日本国のガイドラインに基づき、V79細胞を用いてこれら5種類のバルク体についてコロニー試験を行った。FApと α -TCPは強い細胞毒性を示した。これらの細胞毒性は、リン酸カルシウム化合物からの溶出成分によるものであり、FApについては溶出成分に含まれるフッ素イオンが、また α -TCPでは表面で起こるHApへの転化反応の際に放出されるリン酸が主な毒性の原因であると考えられた。
- (3) 細胞組織医療機器の発ガン性評価に有用な2種の試験法のガイドライン化のための素案を示した。具体的には（ア）軟寒天コロニー形成能試験と（イ）ヌードマウス移植試験である。

A. 研究目的

(1)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生体適合性評価に関する研究

温度に応答して相変化を起こす温度応答性ポリマーは、薬剤運搬機構、細胞培養、生体分子の分離などの様々な分野において、機能性の素材として研究されてきた。温度応答性ポリマーであるポリ-

N-イソプロピルアクリルアミドは、32℃以上で相変化を起こして脱水状態になり、コンパクトな鎖状形態になる。この特性を利用して、ポリ-N-イソプロピルアクリルアミドは様々な培養細胞を分離するための培養機構として研究されてきた。近年、ポリ-N-イソプロピルアクリルアミドをコーティングしたディッシュを用いた回収方法により培養細胞を、単層のシート状組織として回収する

ことが可能となった。シート状の細胞組織は、生体内において臓器形成の基本単位となるものであり、単一の細胞と比較して高い自己組織化能を有し、自ら臓器を形成する性質がある。

上記の回収方法では、トリプシン処理を行わないため細胞膜に存在する機能性タンパク質が損傷を受けることがなく、ギャップ結合細胞間連絡機能も維持されている。ギャップ結合は、隣り合う哺乳動物細胞間に存在する 1.5~2.0nm の細胞膜チャンネルであり、増殖制御物質の選択的通路として機能し、相対分子量は約 1.6Kda である。ギャップ結合細胞間連絡機能は、細胞増殖、細胞分化および組織恒常性において重要な役割を担い、組織再生においても重要な機能であると考えられている。

ギャップ結合細胞間連絡機能が、ポリ-N-イソプロピルアクリルアミドから受ける影響については未だ解析されていない。本研究の目的は、電子線の照射により重合化したポリ-N-イソプロピルアクリルアミドをコーティングしたポリスチレンディッシュが、培養した正常ヒト皮膚繊維芽細胞のギャップ結合細胞間連絡機能に与える効果を解明することである。さらに、細胞の増殖に与える影響や細胞間連絡機能の構成タンパク質の 1 つであるコネキシン 43 の発現に与える影響を解析する。

(2)各種リン酸カルシウムセラミックスの細胞毒性に関する研究

種々のリン酸カルシウム化合物は、歯科治療あるいは骨組織再生などの医療用のスキャホールドなど広く医療分野で使用されている。例えば、水酸アパタイト ($\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$: HAp) あるいは β 型リン酸三カルシウム (β - $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$:

β -TCP) は、骨充填材あるいは骨組織再生用のスキャホールドとして広く利用されている。また、 α 型リン酸三カルシウム (α - $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$: α -TCP) やリン酸四カルシウム ($\text{Ca}_4(\text{PO}_4)_2\text{O}$: TTCP) は骨セメントの原料であり歯科医療の分野で広く利用されている。同様に歯科医療分野において、水酸アパタイトの水酸基をフッ素イオンに置換したフッ素アパタイト ($\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6\text{F}_2$: FAp) は、水酸アパタイトよりも耐酸性に優れていることから、歯磨きなどのう蝕防止用の材料として期待されている。近年、生体内での使用を目的として、これらのリン酸カルシウム系の化合物を用い種々の生体材料が開発されてきており、その利用は多様化してきている。個々の材料の安全性については *in vivo* あるいは *in vitro* で安全性の評価は行われているものの統一した評価システムで毒性評価を行った研究例はない。そこで本研究では、より安全な材料設計の指針を示すことを主たる目的とし、現在、医療材料として汎用されている 5 種類のリン酸カルシウム化合物について細胞毒性評価を行った。

(3)細胞組織製品の前臨床試験法ガイドライン化に関する研究

細胞組織製品の前臨床試験法の中で癌化能に関する試験方法は、生物学的安全性試験の中できわめて重要な試験項目のひとつである。本年度は、(ア)軟寒天コロニー形成能試験法と (イ)ヌードマウス移植試験法についてガイドライン化(案)を作成する。

B. 研究方法

(1)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生体適合性評価に関する研究

正常ヒト皮膚繊維芽細胞は、25、100、250、500 K Gy の電子線を照射して重合化したポリ-N-イソプロピルアクリルアミドをコーティングしたディッシュと、コーティングしていないディッシュで培養した。

細胞がコンフルエントに達した後に、ギャップ結合細胞間連絡機能 SLDT 法により解析した。SLDT 法は、蛍光染色液の移行する距離によってギャップ結合細胞間連絡機能を検討する解析法である。コネキシン 43 の発現はウエスタンブローディング法により検出した。細胞の増殖は、タンパク質の量を測定することで決定した。

素材：平均分子量 22,000 のポリ-N-イソプロピルアクリルアミドは和光純薬株式会社から、イソプロピルアルコールは DOJINDO より購入した。

細胞培養：正常ヒト皮膚繊維芽細胞は 10%ウシ胎児血清、1%ペニシリンーストレプトマイシン含有 DMEM 培地で 37°C、5%CO₂ で培養した。

ポリ-N-イソプロピルアクリルアミドをコーティングしたディッシュの作製：N-イソプロピルアクリルアミドを、イソプロピルアルコールに溶かして濃度 40%の溶液にした後に、その溶液 100μl を 35mm ディッシュに加え、広域電子線システムを用いてそれぞれ 25、100、250、500 K Gy の電子線を照射して単量体の N-イソプロピルアクリルアミドを重合化して 4 種類のディッシュを作製した。コーティングしたディッシュは 2 ml の冷水で 5 分間洗い、洗いを 3 度繰り返した後に風乾した。

SLDT 法：SLDT(Scrape-loading dye transfer)法は、ギャップ結合を通して染色液が移行した距離によってギャップ結合細胞間連絡機能を評価する方法である。

コンフルエントの状態の細胞に切れ目を入れ、蛍光色素であるルシフェルイエローを加えてから 10 分後に、蛍光染色液の移行した距離を室温で蛍光顕微鏡を用いて計測した。

ウエスタンブローディング法：コネキシン 43 を認識する一次抗体を 1/1000 に希釈し、2 次抗体を 1/5000 に希釈して使用した。一次抗体、二次抗体を処理した後に、ECL キットを用いて検出した。

BCA 法：BCA (Bicinchonic acid) 法は、細胞から抽出したタンパク質サンプルと試薬を混合して 30 分間インキュベーションし、562nm で吸光度を計測した。

(2)各種リン酸カルシウムセラミックスの細胞毒性に関する研究

(被験試料)

本研究では、現在医療分野で汎用されている 5 種類のリン酸カルシウム化合物、HAp, FAp, α -TCP, β -TCP, TTCP(すべて生体材料研究グレード：和光)を対象物質とした。臨床では、これらのリン酸カルシウムは粉末状ではなく主にバルク体として使用されるため、本研究においても同一の条件でこれらのバルク体を作製し被験試料とした。バルク体は、各種リン酸カルシウム化合物 0.25g をステンレス製の金型を用いて 30MPa, 1 分間保持の条件で 1 軸加圧することにより成形した。得られたバルク体の大きさは 12mm ϕ 厚さ約 1mm である。滅菌は、121°C, 20 分でオートクレーブ滅菌した。

また、これらのリン酸カルシウムからの溶出成分による細胞毒性を検討するために、各種リン酸カルシウムを 100mg/mL の割合で培地に混合し、37°C, 72 時間シェーカーで攪拌することにより抽出溶液を調製した。

(細胞毒性評価)

日本国における安全性評価手法のガイドラインに基づき、V79 細胞を用いてコロニー法により各種リン酸カルシウム化合物の細胞毒性を評価した。培養液は、10%ウシ血清含有培地(イーグル MEM)を用いた。リン酸カルシウムバルク体については、24wells のディッシュの各well にひとつずつリン酸カルシウムバルク体をいれた後、300 μ L の培地を入れた。次いで、50cells/ml/well になるように V79 細胞懸濁液を 300 μ L 加え、細胞をリン酸カルシウムバルク体上に播種した。37 $^{\circ}$ C、5%CO₂ で 4 時間培養した後、400 μ L の培地を加え、一週間培養した。

また、リン酸カルシウムバルク体上の細胞の接着性を検討するために、4 時間培養後の培地を交換したものと、抜き取った培地を別の well に移したものを同様に一週間培養した。一方、各種リン酸カルシウム化合物からの溶出成分による細胞毒性を検討するために、抽出成分を 1/3 ずつ段階希釈したものについても同様のコロニー試験を行った。

一週間の培養後、メタノールでコロニーを固定し、5%に希釈したギムザ溶液を用いて染色した。

リン酸カルシウムバルク体を入れないものをコントロールとし、ポジティブコントロールとして、8 μ g/mL の ZDBC(0.05%DMSO)を用いた。

(リン酸カルシウム化合物の特性評価)

培養前後あるいはオートクレーブ滅菌前後でのリン酸カルシウムの構造変化を明らかにするために、粉末 X 線回折分析(XRD : Rigaku/RINT2000, CuK α , 40kV, 20mA)ならびに走査型電子顕微鏡観察(SEM : 日立/LV5400, 加速電圧 20kV)を行った

(3)細胞組織製品の前臨床試験法ガイドライン化に関する研究

われわれがこれまで研究し、実際に実験を行った経験をもとに、癌化能試験 2 種についてガイドライン化(案)を作成した。

C. 研究結果

(1)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生体適合性評価に関する研究

2. 0×10^5 個の正常ヒト皮膚繊維芽細胞を、コーティングしていないディッシュと、ポリ-N-イソプロピルアクリルアミドをコーティングした4種類のディッシュ(電子線 25、100、250、500 KGy を照射)に播種した。ポリ-N-イソプロピルアクリルアミドをコーティングしたディッシュに対する、正常ヒト皮膚繊維芽細胞の接着する能力は、コーティングしていないディッシュで2~4日培養した繊維芽細胞とほぼ同程度であった。しかしながら、500 KGy の電子線を照射したディッシュを用いた培養の初期段階では、細胞の接着率がわずかに劣ることが判明した(図1)。

この結果から、ポリ-N-イソプロピルアクリルアミドの細胞への接着性と、N-イソプロピルアクリルアミドに照射した電子線量の間に関係があることが明らかとなった。ディッシュ表面にコーティングされた4種類のポリマーは、細胞の接着、増殖および分化を制御する主要な因子の1つであるが、そのポリマーの浸潤性にわずかの違いがあることが考えられる。コーティングしていないディッシュと、コーティングしたディッシュの両方において細胞は完全に接着し、4日後にコンフルエントに達した(図1)。

コーティングしていないディッシュとコーティングしたディッシュの両方において、ギャップ結合細胞間連絡機能の測定を行った。その測定は、正常ヒト皮膚繊維芽細胞が完全なコンフルエントに達した後に、SLDT法により行った(図2)。染色液の移行した距離は200~330 μ mである。ポリ-N-イソプロピルアクリルアミドをコーティングした全てのディッシュ上の細胞は、コーティングしていないディッシュの細胞より約1.4倍以上の高いルシフェルイエロー染色液の移行を示していた(図3)。25、100、500 K Gyの電子線を照射したディッシュではあまり変わらないが、250 K Gyの電子線を照射したディッシュでは最高値を示した(図3)。

細胞増殖度を比較するために、細胞増殖をタンパク質量で比較した(図4)。ポリ-N-イソプロピルアクリルアミドをコーティングしたディッシュから回収した細胞数は、コーティングしていないディッシュから回収した細胞数と比較して、その細胞数の減少は認められない。100 K Gyおよび250 K Gyを照射したディッシュで培養した細胞は、コーティングしていないディッシュから回収した細胞数と比較して増加が確認された(図4)。正常皮膚繊維芽細胞の細胞膜に存在するコネキシン43の発現量を、ウエスタンブロッティング法により解析した。リン酸化されていないコネキシン43であるNPバンド、リン酸化されたP1バンド、コネキシンが細胞間連絡機能を果たすうえで重要な機能性のP2バンドの3つが確認できる(図5)。

ポリ-N-イソプロピルアクリルアミドをコーティングしたディッシュから回収した細胞では、コーティングしていないディッシュから回収した細胞と比較し

てNP、P1、P2のいずれのバンドにおいても発現量は増加した(図6)。100 K Gyおよび250 K Gyの電子線を照射したディッシュで培養した細胞においては、バンドの発現量は特に高く、ほぼ同レベルの増加が確認された。250 K Gyの電子線を照射したディッシュで培養した細胞では、最もギャップ結合細胞間連絡機能が亢進されていたが、機能性のコネキシンであるP2バンドも250 K Gyのディッシュにおいて最も高い値を示している(図6)。

本研究から、ポリ-N-イソプロピルアクリルアミドをコーティングしたディッシュは、正常ヒト皮膚繊維芽細胞のギャップ結合細胞間連絡機能を亢進し、さらにその機能を担うタンパク質の一種である、コネキシン43の発現を増加させることが判明した。

(2)各種リン酸カルシウムセラミックスの細胞毒性に関する研究

粉末X線回折分析の結果より、オートクレーブ滅菌前後でリン酸カルシウムの結晶構造は変化していないことがわかった。滅菌一週間培養後の各種リン酸カルシウムバルク体上での形成されたコロニーおよびディッシュ上で形成されたコロニー(コントロール)の様子を図7に示す。また図8には、リン酸カルシウムバルク体を取り出した後の培養ディッシュの写真を示す。図7に示すように、 α -TCPを除いてすべてのリン酸カルシウム上でのコロニー形成が認められる。またリン酸カルシウムバルク体を取り除いた後のディッシュ(図8)からも分かるように、若干wellの端にコロニー形成が認められるが、wellの中央付近でのコロニーの形成はない。したがって、播種した際に細胞はバルク体の裏側に回りこむことなく、適切にバルク体上に播種さ

れているものと判断される。

図9は各種リン酸カルシウムバルク体上で形成されたコロニー数である。FApおよび α -TCP上ではコロニーの形成はほとんど認められない。一方、HAp、 β -TCPそしてTTCPでは、コントロールに対してそれぞれ、52%、46%、そして60%のコロニー形成率であった。これらの各種材料上でのコロニー形成の差異は、材料自体の細胞毒性によるものであるか、あるいは、材料への細胞接着の違いによるものであるか判断できない。そこで、各種リン酸カルシウムバルク体上へ細胞を播種し4時間培養を行った後、培地を抜きその培地を培養することでリン酸カルシウムバルク体上に接着していない細胞数の評価を行った。

図10に4時間培養後培地を抜き取り、別のwellに移し培養した試料のコロニーの形成である。図中のno treatmentはこの操作をしないでそのまま培養したものである。リン酸カルシウムバルク体に細胞が接着し生存していれば、この培地中には細胞は存在せず、コロニーは形成されない。図10に示すように、リン酸カルシウムの種類によらず、抜き取った培地を培養した試料では、コロニーの形成はほとんど見られない。図11は、培地を抜き取った後、新しい培地を加えて各種リン酸カルシウムバルク体上で培養した試料のコロニー数である。図11に示すように培地交換を行った場合でも、行わなかった系と全く同じ傾向を示しており、播種した細胞は4時間の培養でその表面に接着していると考えられる。以上より、これらのリン酸カルシウムバルク体上でのコロニー形成の違いは、細胞の接着性によるものではなく、各種リン酸カルシウムの組成、結晶構造あるいは溶出物による影響が強いと判断される。

溶出成分の影響を検討するために、各種リン酸カルシウム化合物を培地に100mg/mLの割合で混合し、37°Cで72時間攪拌し溶出成分を抽出した。図12に各種リン酸カルシウムの抽出前後の粉末X線回折パターン(XRD)を示す。このXRDパターンに示すように、本抽出処理前後で結晶構造の変化は認められない。各種リン酸カルシウムの抽出液で一週間培養した結果を図13に示す。種々のリン酸カルシウム化合物の抽出液を用いて培養した場合と、各種リン酸カルシウムバルク体上でのコロニー形成は同じ傾向を示している。したがって、各種のリン酸カルシウムバルク体上でのコロニー形成の差異は、これらのリン酸カルシウムからの溶出成分によるものであると判断される

(3)細胞組織製品の前臨床試験法ガイドライン化に関する研究

(ア)軟寒天コロニー形成試験法

(a)12ウエルプレートを用いる方法

0.5%アガロース・10%FCS含有培地を12ウエルプレートに1mlずつ分注してシード層とする。細胞を1000細胞/mlに調製し、0.5%アガロース・10%FCS含有培地と1:2に混合し、1ml/wellでシード層上に分注する。

5%炭酸ガス下、37°Cで2~3週間培養する。

コロニーは、1mg/ml p-iodonitrotetrazolium violetで48時間染色する。コロニーのサイズが $10\mu\text{m}^2$ 以上のものを陽性とみなす。

陽性対照として、HepG2細胞、HeLa細胞を用いる。

陰性対照として、正常ヒト皮膚繊維芽細胞、細胞を含まないアガロース培地のみを用いる。

(b)60mm デッシュを用いる方法

0. 5%アガロース-10%FCS-MEM 培地を 60mm デッシュに 5ml 入れる。

10^5 の細胞を 2mL の 0. 3%アガロース-10%FCS-MEM 軟寒天培養液に混合し、シード層上に分注する。

4 週間培養した。コロニーは、1 mg/ml *p*-iodotetrazolium violet で 48 時間染色した。コロニーのサイズが 0. 1mm 以上のものを陽性とみなす。

(イ)ヌードマウス移植試験

5 週齢の雄の BALB/cAnCrj-nu ノードマウスを用いる。滅菌済み固形飼料及び滅菌水を自由摂取させる。

細胞 (2×10^6 /0. 2mL PBS) をヌードマウスの背部皮下に注入する。その後、腫瘍の形成について観察する。細胞注入後 10 週間以内に明らかな塊が現れ、その後そのサイズが大きくなったものを腫瘍が形成されたとみなす。腫瘍形成がなされないとの判断は、注入後少なくとも 5 ヶ月後に行う。腫瘍の大きさを測定し、病理学的検査を実施する。

陽性対照として、HepG2 細胞や HeLa 細胞を用いる。

陰性対照として、正常細胞や PBS 溶液のみを用いる。

D. 考察

(1)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生体適合性評価に関する研究

上記の結果から、温度応答性ゲルを用いた細胞の分離・回収の際に細胞膜タンパク質が損傷を受けず、ギャップ結合細胞間連絡機能が維持されることは明白である。

観察された機能性のコネキシン 43 で

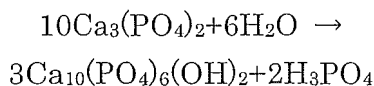
ある P2 バンドの増加が、細胞間連絡機能の亢進の一因である可能性が考えられる。また、コネキシンは約 20 種類が存在するが、ポリ-N-イソプロピルアクリルアミドが今回解析したコネキシン 43 以外のコネキシンの発現を亢進させている可能性も考えられる。

(2)各種リン酸カルシウムセラミックスの細胞毒性に関する研究

FAp および α -TCP ではコロニー形成はほとんど認められず、強い細胞毒性を示している。表 1 に各種リン酸カルシウムバルク体上での培養後の培地の pH 値を示す。コロニー形成が認められなかった FAp と α -TCP に着目すると、FAp では HAp と同じ pH であり、一方、 α -TCP では他のリン酸カルシウムよりも低い pH であった。FAp は、HAp と全く同じ結晶であり、HAp の水酸基のサイトがフッ素イオンに置換した化合物である。上述したように、各種リン酸カルシウムバルク体上でのコロニー形成の差異はリン酸カルシウム材料からの溶出成分による影響が大きい。したがって、HAp では毒性が少なく FAp では細胞毒性が強い原因は培地中に溶出したフッ素イオンによるものであると考えられる。

一方、 α -TCP では、他のリン酸カルシウムよりも低い pH 値であった。この原因について検討するために、抽出前後の α -TCP 粉末の SEM 観察を行った。抽出前の α -TCP は粒径 $10 \mu\text{m}$ 程度の粒子 (図 14(a)) でその表面は平坦である。一方、抽出処理を行うと粒径に大きな変化は認められないが、その表面に長さ $1 \sim 2 \mu\text{m}$ 、幅 $200 \sim 300\text{nm}$ の針状の粒子が確認される。一般に、難水溶性固体リン酸塩が水中または各種イオンを含む水溶液中で、より安定な含水または含

水素リン酸塩に転化することが知られている。特に、 α -TCP は、水中で HAp に転化する。この転化反応は以下のように表される。



この転化反応に関する報告によると、 α -TCP の転化により生成した HAp は針状の結晶であることから、本研究で確認された針状粒子は HAp であり、上式で示した転化反応が進行していると判断される。この反応は図 12(c)の XRD パターンでは HAp の結晶相は確認されないことから、ごく表面のみで進行し HAp の生成量はきわめて少ないと判断される。しかしながら、上式から明らかであるように、この転化反応では副生成物としてリン酸が生成する。このリン酸が pH の低下を引き起こし、更に、リン酸イオンも細胞毒性を示したものであると考えられる。培地の pH あるいは培養温度の条件では、 β -TCP や TTCP も同様にこの HAp への転化が起こりうるが、 β -TCP や TTCP は α -TCP と比べその溶解度が極めて低いため、本研究で検討した時間内では、このような転化反応は起こらず細胞毒性を示さなかったと考えられる。

(3)細胞組織製品の前臨床試験法ガイドライン化に関する研究

細胞組織製品の前臨床試験でもとめられる癌化能の試験方法についてガイドライン化案を作成した。試験方法を示すことにより、これらの試験が不十分に行われることによる、安全性へのリスクへの懸念や、複数回試験をやり直すことを防ぐことにより、開発コストを抑えることができ、しいては、先進的医療機器の開発を促進するものと考えられる。

E. 結論

(1)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生体適合性評価に関する研究

以上の実験から見出される特性は、種々の細胞を培養して再生臓器を構築する目的に適しているため、ポリ-N-イソプロピルアクリルアミドは皮膚、腎臓等の人工器官の開発に安全な生体素材として使用できる可能性があると考えられる。細胞シートは、組み合わせることで3次元的な立体臓器の構築が可能となる、次世代の組織工学の技術である。今後、当研究室で開発中の機能性素材と共に応用することで、さらなる画期的な技術の開発が可能であると考えられる。

(2)各種リン酸カルシウムセラミックスの細胞毒性に関する研究

本研究では、骨充填材料あるいは歯科用材料として広く利用されている各種リン酸カルシウム化合物(HAp, FAp, α -TCP, β -TCP, TTCP)について、V79細胞を用いたコロニー法により細胞毒性を検討した。その結果、検討したリン酸カルシウムの中では FAp と α -TCP は強い毒性を示した。FAp については溶出成分に含まれるフッ素イオンが、また α -TCP では表面で起こる HAp への転化反応の際に放出されるリン酸が主な毒性の原因であると考えられた。

(3)細胞組織製品の前臨床試験法ガイドライン化に関する研究

細胞組織製品の前臨床試験でもとめられる癌化能の試験方法である2種の試験(軟寒天コロニー形成能試験、ヌードマウス移植試験)についてガイドライン化案を作成した。

F. 研究発表

1. 論文発表

Tsutomu Nagira, Susan Bijoo Matthew,
Yoko Yamakoshi, and 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 accepted (2005)

2. 学会発表

Susan Matthew, Tsutomu Nagira, Yoko
Yamakoshi and Toshie Tsuchiya
Enhancement of Gap Junction Intercellular
Communication of Normal Human Dermal
Fibroblast Cultured on Polystyrene Dishes
Grafted with Poly-*N*-isopropylacrylamide
(PIPAAm)
第6回日本組織工学会 口頭発表
2003年6月12日 早稲田大学

G. 知的所有権の出願・取得状況

1. 特許取得

特願 2004-330417 生体組織補填材およ
び生体組織補填体

2. 実用新案登録

3. その他

研究成果の刊行に関する一覧表レイアウト

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
K. Watanabe, K. Nishida, M. Yamato, T. Umemoto, T. Sumide, K. Yamamoto, N. Maeda, H. Watanabe, T. Okano and Y. Tano	Human limbal epithelium contains side population cell expressing the ATP-binding cassette transporter ABCG2	FEBS Lett.,	565	6-10	2004
K. Nishida, M. Yamato, Y. Hayashida, K. Watanabe, K. Yamamoto, E. Adachi, S. Nagai, A. Kikuchi, N. Maeda, H. Watanabe, T. Okano and Y. Tano	Corneal reconstruction with tissue-engineered cell sheets composed of autologous oral mucosal epithelium	N. Engl. J. Med.	351 (12)	1187-1196	2004
Tsutomu Nagira, Susan Bijoo, Matthew, Yoko Yamakoshi, and Toshie Tsuchiya	Enhancement of Gap Junctional Intercellular Communication of Normal Human Dermal Fibroblasts Cultured on Polystyrene Dishes Grafted with Poly- <i>N</i> -isopropylacrylamide (PIPAAm).	Tissue Engineering	accepted		2005
Nakaoka R, Ahmed S, Tsuchiya T	Hydroxy apatite microspheres enhance gap junctional intercellular communication of human osteoblasts composed of connexin 43 and 45.	J. Biomed. Mater. Res. A	accepted		
Tsuchiya Toshie	A Useful Marker for Evaluating the Safety and Efficacy of Tissue Engineered Products.	Tissue Engineering Medical Products(TEMPS)	ASTMSTP1452	254-261	2004