

生体内環境を反映した細胞培養担体の開発と その再生医療あるいは創薬研究への応用構想

Development of Cell Culture Substrate Reflecting the Environment *in vivo* and their Application Concept for Regenerative Medicine and Drug Development Researches

竹澤俊明*

培養細胞に生体内環境を付与することを目指して、「コラーゲンビトリゲル担体」と「組織を薄切した切片担体」を近年開発した。これら担体の作製法および特徴を解説すると共に、担体を利用した細胞培養技術の有用性および先端研究を紹介する。さらに、各々の担体の特徴を活かして、再生医療あるいは創薬研究へ応用していく将来展望について述べる。

1. はじめに

培養細胞は培養担体の成分や構造に基づくシグナルを認識して、生死、付着形態、接着伸展、増殖、分化、極性表示、移行浸潤、および自己組織化などの挙動を決定する。それゆえ、培養細胞の挙動を制御するために、生物素材、人工素材、あるいは両者のハイブリッド素材を様々な形状に加工した種々の培養担体が開発されてきた（図1）^{1~3)}。筆者は、細胞の足場（生体内：細胞外マトリックス、生体外：培養担体）を人為的に操作した際に生じる細胞の挙動および形質発現に着眼した研究を一貫して行い、生体内細胞環境の再現に有用な以下の6つの細胞培養技術を開発してきた⁴⁾。

①ヘテロスフェロイドの培養技術^{5~7)}：温度感受性ポリマーとコラーゲンで作製した温度感受性培養担体を利用して、上皮細胞と間充織細胞のヘテロスフェロイド（2種類以上の細胞で構成される多細胞性球状凝集塊）を作製する技術。

②培養液の通液培養技術⁸⁾：イネの纖維状根やコラーゲンコートした綿製ガーゼを培養担体に利用して、培養液の通液路のある3次元再構築体を作製する技術。

③器官工学の培養技術⁹⁾：放血、細胞外マトリックスの破壊、および培養液供給担体となるコラーゲンゲルの導入を目的とした連続的3段階灌流により、臓器を培養バージョンに変換する器官工学の技術。

④切片利用の培養技術^{10~14)}：生体の組織特異的な微細構造と複合不均一成分を保持している組織切片を培養担体に利用して、生体内の微細構造とその成分に依存したシグナルを培養細胞に伝達する技術。

⑤ビトリゲル利用の培養技術^{13, 15~18)}：ピンセットで扱えるコラーゲンビトリゲル薄膜培養担体の両面に細胞を2次元培養することで、上皮間充織等の3次元培養モデルを容易に再構築する技術。

⑥シルク利用の培養技術^{15, 19)}：繭糸（シルク）構造物を培養担体に利用して、強度に優れた結合

*Toshiaki Takezawa 独農業生物資源研究所 遺伝子組換え家畜研究センター 主任研究員

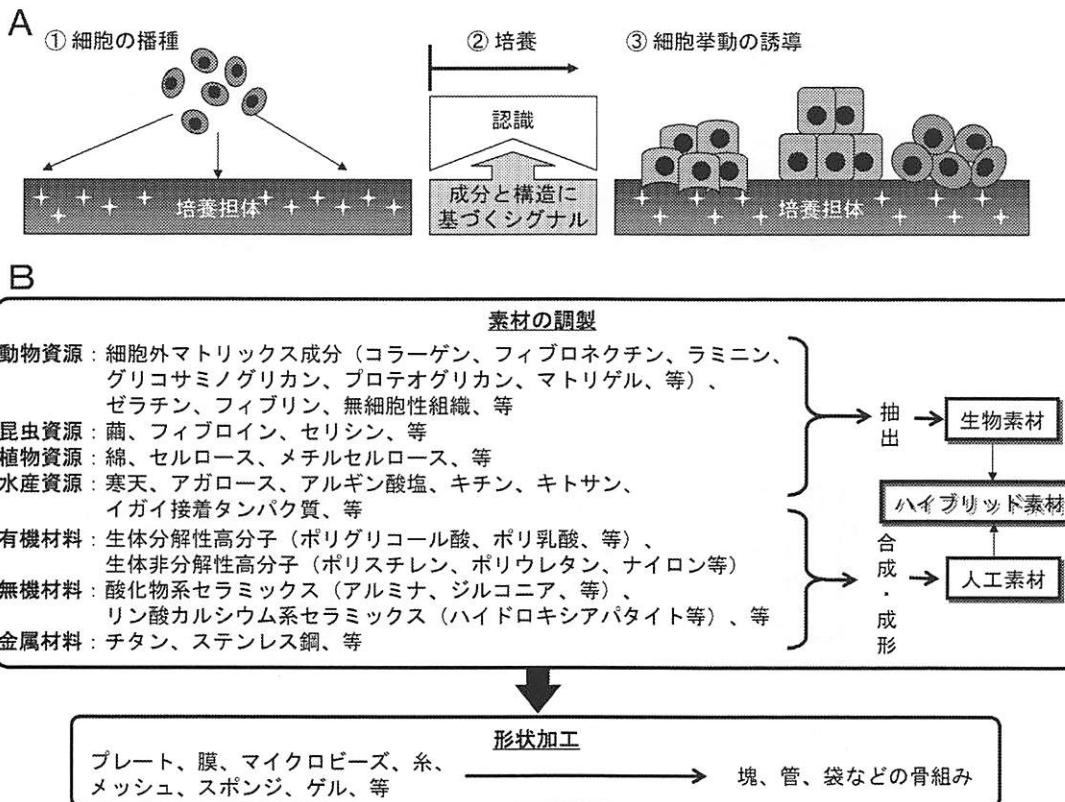


図1 細胞挙動を制御する培養担体(A)とその開発プロセス
(再生医療のための細胞生物学¹⁾, p.197, 図10.4 およびp.198, 図10.5を改変)

組織を再構築する技術。

これらの培養技術を開発した経緯については、他の総説を御参考頂ければ幸いである^{4, 13)}。ここでは、再生医療や創薬をはじめとするライフサイエンスの研究分野で多くの有用性が実証されて最近特に発展している⑤に関する一連の研究と、同様の研究分野で有用性が徐々に分かってきた④に関する一連の研究について詳細に紹介する。

2. 生体内結合組織のコラーゲン線維密度を反映した細胞培養担体の開発

コラーゲンに関する成書には、皮膚の乾燥重量の約70%、アキレス腱の乾燥重量の約85%がコラーゲンであると書かれている²⁰⁾。人体の約40%が固形成分であることと考え合わせると、湿重量では皮膚の約28%、アキレス腱の約34%がコラーゲンということになる。

また、コラーゲンが豊富な軟組織では、コラーゲンの割合は乾燥重量の75%で湿重量の30%であると生体医工学の専門書に記載されている²¹⁾。なお、結合組織で線維を形成するコラーゲンはI, II, III, VおよびXI型コラーゲンである。特に、I型コラーゲンは体内に最も豊富にあって硝子軟骨を除くほとんど全ての結合組織に存在し、コラーゲン分子同士が会合することで67nmの繩模様を呈する細線維を形成して機械的強度の保持のみならず細胞接着の役割も果たしている^{20, 22)}。一方、生体外ではI型コラーゲンは0.5%程度までの希薄な酸性溶液であれば、生理的な水素イオン濃度と塩濃度と温度を付与することでコラーゲン分子の線維化を誘導したゲルを形成できる。しかし、より高濃度のコラーゲン溶液では粘性が高いために生理的な水素イオン濃度

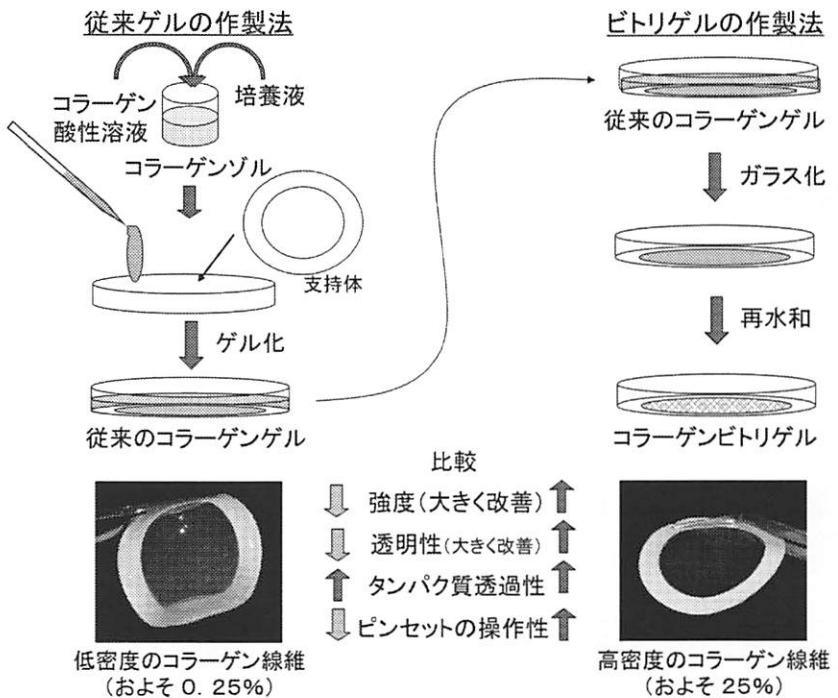


図2 支持体付きコラーゲンビトリゲル薄膜の作製とその特徴

度と塩濃度を有する均一なコラーゲンゾルを作製することは不可能になるので、生体内結合組織のような高密度のコラーゲン線維で構成されるゲルを作製することは従来の方法ではできなかった。

そこで注目したのが、ゆで卵の白身など熱変性タンパク質を乾燥して自由水のみならず結合水も徐々に除去することで、強度と透明性に優れたガラス様の物質に変換するという報告である²³⁾。つまり、このガラス化の概念を従来のコラーゲンゲル（低密度のコラーゲン線維で構成されるゲル）に応用することを考えた。具体的には、0.5% I型コラーゲン酸性溶液と培養液を等量混合したコラーゲンゾルを培養皿に注入した後、37°Cに保温してゲル化（gelation）することで従来のコラーゲンゲルを作製した。その後、従来のコラーゲンゲルを低温で十分に乾燥してガラス化（vitrification）し、さらに細胞の培養担体として使用するために再水和（rehydration）した。その結果、コラーゲンゲルの物性を強度と透明性に優れた薄膜状のゲル（「コラーゲンビトリゲル薄膜」と命名）

に再現性良く変換する技術の開発に成功した（図2）¹⁵⁾。

従来の0.25%コラーゲンゲルをコラーゲンビトリゲル薄膜に変換することにより、ガラス化の期間にもよるがゲルの形状は変わらず厚さは100分の1程度になる（厚さ2mmのコラーゲンゲルからは厚さ約20μmのコラーゲンビトリゲル薄膜が作製できる）。言い換えれば、コラーゲンビトリゲル薄膜の線維密度は100倍の25%程度になる。コラーゲンビトリゲル薄膜の走査電子顕微鏡の観察では、およそ67nmの明瞭な縞模様を呈する細線維が配向することなく高い密度でランダムに重なり合っていることが確認できた¹⁸⁾。また、上述のコラーゲンゾルに支持体となる環状ナイロン膜を挿入しておけば、ピンセットで容易に扱える支持体付きコラーゲンビトリゲル薄膜を作製できる。その結果、コラーゲンビトリゲル薄膜の円形状態を維持したまま移動して強度測定器やパームセル（生体膜を装着して薬剤の透過性や代謝を解析する2相性容器）等の固定台への装着が

可能となり、細胞培養担体としての利便性も向上する。コラーゲンビトリゲル薄膜の圧力に対する破断強度測定では、ガラス化の期間が増すほど強くなる傾向を示し、ガラス化工程で約3か月間維持した場合は従来のコラーゲンゲルの15倍以上の強度となつた¹⁵⁾。パームセルを用いた血清タンパク質の透過実験では、コラーゲンビトリゲル薄膜は分子量100 kDa以上の高分子血清タンパク質も透過することが分かった¹⁷⁾。

なお、原著論文では、ハイドロゲルであればコラーゲン以外の成分のゲルでもガラス化した後に再水和することで、ゲルを安定した新しい物性状態に変換することができるので、このガラス化工程を経て作製した新しい物性状態のゲルに対して「ビトリゲル(vitrigel)」という学術用語を設定した¹⁵⁾。

3. 「コラーゲンビトリゲル担体」を利用した細胞培養技術の有用性および先端研究

生体内の細胞の挙動は、2種類以上の細胞の3次元的なパラクライン相互作用によっても大きく制御されている。しかしながら、動物細胞の培養

技術は1種類の細胞による2次元培養系が主流であり、2種類以上の異種細胞を用いた3次元培養系は普及していないのが現状である。その理由は、3次元培養は2次元培養と比較すると培養工程が複雑で操作に熟練を要する、位相差顕微鏡による細胞観察が困難あるいは不可能である、播種した細胞の3次元分布は不均一になり易く再現性に劣る、培養液の交換あるいは共培養する異種細胞の播種に伴う無菌操作が困難であるなど、既存の3次元培養技術には数々の欠点があるためである。「コラーゲンビトリゲル薄膜担体」の開発では、これらの問題点を克服することで、生体内の器官モデルとなる3次元培養を容易に達成できる細胞培養技術を確立した^{15, 16)}。

環状ナイロン膜の支持体付きコラーゲンビトリゲル薄膜担体上に細胞を2次元培養した後にピンセットで担体を裏返して、担体の裏面には異種細胞を2次元培養することで、上皮間充織やがん血管などの3次元培養モデルを容易に作製することができる^{15, 17)}。また、コラーゲンビトリゲル薄膜担体は高分子タンパク質を透過できるので、担体を介したパラクライン作用により標的細胞の分化を誘導することもできる(図3)。具体的には、コ

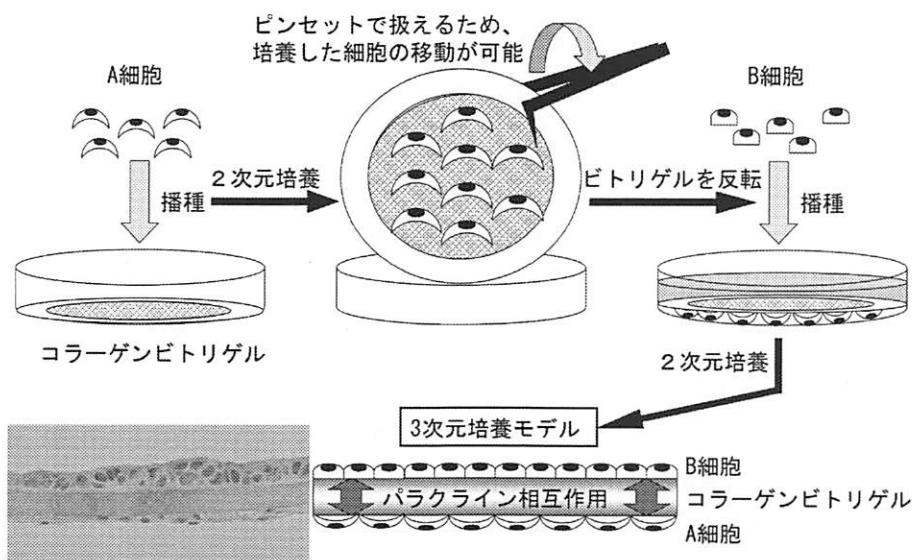


図3 支持体付きコラーゲンビトリゲル薄膜担体を用いた3次元培養モデルの作製とその特徴

ラーゲンビトリゲル薄膜を介して神経成長因子 (NGF) を產生するマウス線維芽細胞株の L929 細胞と NGF に反応して神経様突起を伸長する PC-12 細胞を 3 日間にわたり共培養した。ネガティブコントロール実験としては L929 細胞を培養せずに PC-12 細胞のみを培養した。その結果、ネガティブコントロール実験の PC-12 細胞は丸い形態を呈して抗ニューロフィラメント抗体を用いた染色に擬陽性であったのに対して、コラーゲンビトリゲル薄膜を介して L929 細胞と共に培養した PC-12 紡錐は神経様突起を伸長して抗ニューロフィラメント抗体を用いた染色に陽性となることが分かった。したがって、L929 細胞の產生した NGF はコラーゲンビトリゲル薄膜を介して PC-12 細胞にパラクライイン作用して、PC-12 細胞の分化を誘導したことが示唆された^{13, 18)}。

また、コラーゲンゾルに可溶性物質の血管内皮増殖因子 (VEGF) を混和して作製したコラーゲンビトリゲル薄膜には、VEGF を徐放する活性が認められた。そこで、この VEGF 徐放性コラーゲンビトリゲル薄膜をラットの皮下に移植したところ、周囲組織に毛細血管の新生が誘導されることが分かった。したがって、生理活性物質を混和して作製したコラーゲンビトリゲル薄膜はドリッゲデリバリーシステム (DDS) として活用できることが示唆された^{13, 18)}。さらに、不溶性物質の平面状の繩糸構造体 (平面網) を包埋したコラーゲンビトリゲル薄膜を、線維芽細胞の 3 次元培養担体として利用した結果、強度に優れた結合組織の再構築に成功した¹⁹⁾。

最近の研究では、コラーゲンビトリゲル薄膜上で单層培養した初代肝実質細胞あるいは胚性幹細胞 (ES 細胞) やそのフィーダーの線維芽細胞は、单層状態で液体窒素中に凍結保存しても解凍後には比較的良好に生存細胞を確認できることが分かつた²⁴⁾。また、コラーゲンビトリゲル薄膜上で单層培養した初代肝実質細胞にコラーゲンゾルを重層して作製したコラーゲンビトリゲル・サンドイッチ培養システムでは、良好な肝細胞の形態と機能を維持して長期間培養できることも分

かってきた¹³⁾。さらに、従来のコラーゲンゲルを調製する際の容器の形状を工夫することで薄膜状のみならず糸状や管状など様々な形状のコラーゲンビトリゲルを作製すること、あるいはコラーゲンゾルを調製する際に磁気ビーズを懸濁しておくことで水中でも磁力により移動や固定が可能なコラーゲンビトリゲルを作製することに成功した (2006 年日本再生医療学会で発表)。

山口大学医学部眼科の西田輝夫教授らとの共同研究では、コラーゲンビトリゲル薄膜を介した角膜実質細胞の作用により角膜上皮細胞のタイトジャンクションタンパク質の発現が上昇することが明らかとなった²⁵⁾。米国 Johns Hopkins University の Jennifer H. Elisseeff 博士らとの共同研究では、角膜を構成する 3 種類の細胞を良好に培養するコラーゲンビトリゲル薄膜を開発して角膜損傷動物へ移植する研究を展開している (Biomedical Engineering Society Annual Fall Meeting, BMES 2007 で発表)。福島県立医科大学耳鼻咽喉科学講座の大森孝一教授らとの共同研究では、内腔の上皮化に優れた人工気管の開発をしてコラーゲンスponジとコラーゲンビトリゲルを組み合わせた Bipotential Collagen Scaffold を開発している (2007 年日本炎症・再生医学会等で発表)。その他、コラーゲンビトリゲル薄膜を用いた広範囲皮膚欠損に対する新規治療法開発、二分脊椎症胎児治療への応用、および 3 次元培養ヒト皮膚モデルの構築とその皮膚感作性試験への応用については、それぞれ本特集の青木茂久先生、絵野沢伸先生、および内野正先生の稿を御参照頂きたい。

4. 「コラーゲンビトリゲル担体」の再生医療あるいは創薬研究への応用構想

コラーゲンビトリゲル担体は、上述してきたように構成成分や形状を改変したり他の機能性材料とハイブリッド化することで新しい機能を伴ったバイオマテリアルに変換することができる。その結果、細胞を伴わないバイオマテリアルとして活用する応用研究と細胞培養担体として利用した培

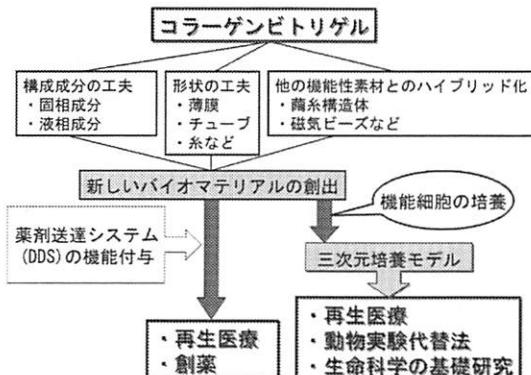


図4 コラーゲンビトリゲルを利用した応用研究の概要

養モデルを活用する応用研究が可能となる(図4)。

したがって、再生医療の分野では、病変部の被覆あるいは結紉に有用であるのみならず DDS 機能も兼ね備えたバイオマテリアルとしての応用、あるいは欠損した組織を再生させる細胞を移植するための培養担体としての応用が期待される。

また、創薬研究の分野では、低分子のみならず高分子の生理活性物質も透過させたり徐放させることができるので、薬効および毒性の評価、そのメカニズム解析、あるいは DDS などへの応用が期待される。さらに、一度に大量に得られる肝実質細胞などの初代細胞は、コラーゲンビトリゲル薄膜担体上で培養した状態で保存することや複数の異なる研究機関に輸送してバリデーションに利用することが可能となるので、動物実験代替法の観点からの期待も大きい^{2,13)}。

5. 生体内の組織や器官の複雑な構造と成分を反映した細胞培養担体の開発

上述したように細胞挙動を制御する様々な培養担体が開発されてきたが、生体組織の複雑な構造と成分の双方を反映した培養担体は未開発であった。そこで、組織病理学の分野では染色による形態観察を目的として日常的に作製される「組織を薄切した切片」に着眼した。何故なら、切片には生体組織の微細構造のみならず抗体や核酸プローブで検出されるように様々な生体分子が部域特異

的に残存しているので、細胞の培養担体に応用することで切片に介在している部域特異的な微細構造や生体分子に依存したシグナルを培養細胞に伝達できるのではないかと考えた。このような観点から、切片を動物細胞の培養担体に活用する培養新技術を開発した¹⁰⁾。

動物組織を薄切した切片担体は、ヒトを含む様々な動物のあらゆる組織より作製できる。具体的には、先ず組織病理学の実験手技に従って凍結組織、パラフィン包埋組織、あるいは樹脂包埋組織をミクロトームで薄切した切片をスライドグラス上に伸展し乾燥する。次に、前二者については凍結包埋剤あるいはパラフィンを除去した後(樹脂切片は脱樹脂できないのでそのまま)、細胞培養に利用するため抗生物質を添加した PBS あるいは 70% エタノール等の処理により滅菌してから細胞培養液で平衡化して培養担体として使用す

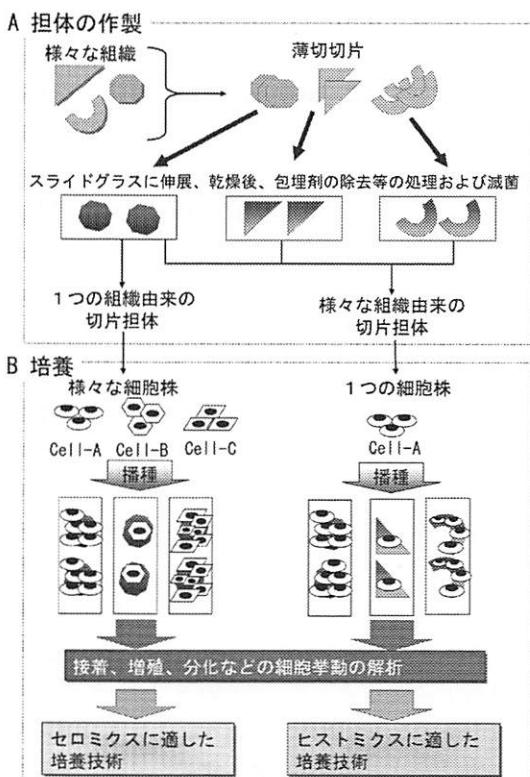


図5 動物組織を薄切した切片担体の作製(A)と担体を利用した培養技術の特徴(B)

る（図5 A）。以上が切片担体を作製する概略であるが、生体組織由来の構造や成分を切片担体にどのように取り入れるかは目的次第で如何様にも工夫できる。例えば、新鮮な組織は未固定のまま凍結するのかホルマリン等で固定するのか、あるいは培養担体として使用する組織切片に対してタンパク変性を目的として熱や紫外線などで物理的処理を施すのか、脱細胞化や脱脂を目的として界面活性剤や有機溶媒などで化学的処理を施すのか、または特定の抗原の露出やブロッキングを目的として酵素や抗体などで生物学的処理を施すのか、等々である。このようにして作製した切片担体上に細胞を播種すると、培養細胞は組織切片に介在する部域特異的なシグナルを認識して経時に細胞挙動を決定することが分かってきた¹¹⁾。

6. 「動物組織を薄切した切片担体」を利用した細胞培養技術の有用性および先端研究

当初の研究では、ウシ胎盤の凍結組織より作製した切片担体上で、異なる4種類の細胞（ヒト絨毛がん細胞株であるBeWo細胞、ウシ肺動脈血管内皮細胞株であるCPAE細胞、正常ヒト新生児包皮皮膚線維芽細胞であるNHDF細胞、およびラット褐色細胞腫であるPC-12細胞）を培養した。その結果、胎児側胎盤領域ではBeWo細胞のスフェロイド（多細胞性球状凝集塊）、CPAE細胞の毛細血管網様構造、およびPC-12細胞の神経網様構造を形成する細胞の分化誘導が観察された。また切片担体には、無血清培養で誘導されるPC-12細胞のアポトーシスを阻害して細胞生存率を維持する活性があった。さらに、ドデシル硫酸ナトリウム（SDS）で脱細胞化処理した切片担体上にNHDF細胞を培養して、担体由来の細胞外マトリックス成分を巻き込んだ3次元組織を再構築する技術を確立した^{10,13)}。以上の結果は、1つの組織に由来する切片担体上で様々な細胞株の挙動を網羅的に解析するセロミクス研究が展開できることを示唆する（図5 B）¹²⁾。

一方、四塩化炭素で軽度の肝障害を惹起した後

の肝再生状態にあるマウスに、尾静脈よりマウス胚性幹細胞（以下、ES細胞）を投与すると、ES細胞は肝臓に移行した後に生着して肝細胞に分化することが報告されている²⁶⁾。そこで、この四塩化炭素を投与した後の障害あるいは再生の様々なステージにある肝組織より切片担体を作製した後、各切片担体上でES細胞を培養して接着、増殖および肝細胞への分化に関する細胞挙動を解析した。その結果、ES細胞の経時的な挙動は、切片担体に用いた肝組織の状態により異なることが分かった。具体的には、障害進行過程の肝組織より作製した切片担体上で培養したES細胞は丸い形態を示し、接着率と分化効率は共に低かった。これに対して、再生進行過程の肝組織より作製した切片担体上で培養したES細胞は敷石状に伸展し、接着率が高かった。特に、再生活性の強い四塩化炭素投与後4日目の切片担体上では、培養24時間目までに約4倍に増殖する細胞集団が認められ、索状構造を形成した細胞集団や二核細胞も存在した。また、この4日目の切片担体上では、培養24時間目までに約70%の接着細胞がアルブミンを発現し、培養48時間目には培養液中のアルブミン分泌、さらに培養62時間目にはCYP1A1活性も確認された。つまり、再生過程の肝組織より作製した切片担体を利用してすることで、ES細胞を短時間で効率よく肝細胞様細胞へ分化誘導できることが明らかとなった^{13,14)}。以上の結果は、様々な組織に由来する切片担体上で1つの細胞株の挙動を網羅的に解析するヒストミクス研究が展開できることを示唆する（図5 B）¹²⁾。

上述の研究成果をもとに、切片担体と培養細胞の組み合わせは多種多様であるので、将来的には相互作用の解析結果を集積したデータベースを構築することが重要になるとを考えた¹²⁾。そこで、最近の研究では、切片-細胞間の相互作用データベースを構築する第一段階として、数種類の臓器より作製した切片担体上で異なる2種類の細胞の挙動を解析した後に、解析データの数理モデル化を試みた。具体的には、ラットより摘出した各臓器（大脳、胸腺、心臓、腎臓、精巣、肝臓、など）

より切片担体を作製した後、ラットインスリノーマ細胞株である RIN5F 細胞およびヒト肝がん細胞株である HepG2 細胞を培養した。それぞれの切片担体と培養細胞の組み合わせごとに経時的な細胞増殖および分化機能（培養液中に分泌されるインスリンまたはアルブミン量）を解析し、得られたデータを 3 次元グラフとして表記した。その結果、数理モデル化した細胞挙動のプロファイルは、細胞が同じでも切片に用いた組織に依存して異なること、また切片に用いた組織が同じでも細胞に依存して異なることを実証した²⁷⁾。このことは、1つの組織に由来する切片担体を利用して異なる多数の細胞株を網羅的に解析したセロミクスデータと、1つの細胞株を利用して異なる多数の組織に由来する切片担体を網羅的に解析したヒストミクスデータの数理モデル化が可能であることを示唆する。今後、組織切片と細胞の相互作用プロファイルを集積したデータベースが構築できれば、「特性を診断したい細胞と特性既知の組織切片」または「特性を診断したい組織切片と特性既知の細胞」を組み合せた培養から得られる細胞挙動プロファイルをデータベースへフィードバックすることで新しい診断システムが創出できると考えている^{12, 13)}。

7. 「動物組織を薄切した切片担体」の再生医療あるいは創薬研究への応用構想

「動物組織を薄切した切片担体」は、培養細胞と切片担体の組み合わせ方を工夫することで、生命科学の基盤研究のみならず再生医療や創薬への応用研究、さらには新しい診断技術や動物実験代替技術の開発研究を展開できると考えている（図 6）。つまり、生命科学の基盤研究としては、細胞挙動の制御機構を解明する研究、あるいは遺伝子導入の前後で変化する細胞挙動から導入遺伝子の機能を予測する研究などが展開できる。また、再生医療や創薬への応用研究としては、患者のバイオプシー組織から調製した切片と細胞より自家移植用の組織を再構築する研究や患者の幹細胞を成熟細胞に分化誘導する研究、および切片に介在す

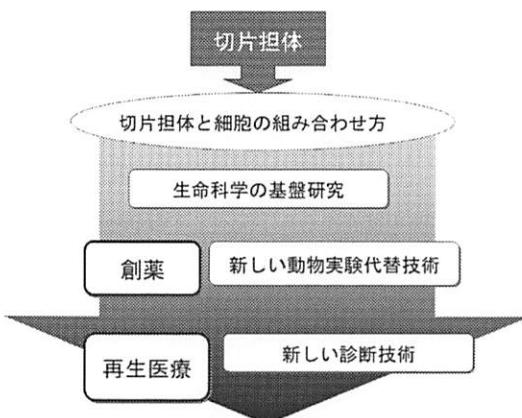


図 6 動物組織を薄切した切片担体を利用した応用研究の概要

る有用生理活性物質を探索する研究や後述の動物実験代替法を活用した薬効あるいは毒性を評価する研究などが展開できる。さらに、新しい診断技術の開発研究としては、上述のセロミクスおよびヒストミクスのデータベースの構築が焦点となる。新しい動物実験代替技術の開発研究としては、実験動物一個体に化学物質を投与すれば、化学物質の薬効あるいは毒性を反映した切片担体が標的器官のみならず全身の諸器官からも多数作製できるので、切片担体に介在する薬効あるいは毒性を様々な培養細胞の挙動で解析する培養システムの構築が焦点となる^{2, 13)}。

8. おわりに

本稿では、培養細胞に生体内環境を付与することを目指して近年開発した「コラーゲンビトリゲル担体」と「組織を薄切した切片担体」について作製法および特徴を解説すると共に、担体を利用した細胞培養技術の有用性および先端研究を紹介した。さらに、各々の担体の特徴を活かして、再生医療あるいは創薬研究へ応用していく将来展望について述べた。今後、これらの将来展望を実現していくためには、関連諸分野の研究者との共同研究や企業との共同開発が益々重要になってくると考えられる（このような観点から御興味を抱かれた読者がいらっしゃれば連絡下されば誠に幸い

である）。また、生体内環境モデルとなる新たな培養担体を開発していくためには、生体内の細胞挙動を制御している環境の役割を様々な視点から捉えることが重要な課題となる。

[謝辞] 本稿の図表作成を手伝って下さった島田康子さんに、心より感謝いたします。

文 献

- 1) 竹澤俊明, 再生医療のための細胞生物学 (関口清俊編), p.183, コロナ社 (2007)
- 2) 竹澤俊明, 動物実験代替のためのバイオマテリアル・デバイス (監修: 酒井康行, 民谷栄一), p.174, シーエムシー出版 (2007)
- 3) T. Takezawa, *Biomaterials*, **24**, 2267 (2003)
- 4) 竹澤俊明, バイオサイエンスとインダストリー, **62**, 375 (2004)
- 5) T. Takezawa *et al.*, *Biotechnology (NY)*, **8**, 854 (1990)
- 6) T. Takezawa *et al.*, *J. Cell Sci.*, **101**, 495 (1992)
- 7) T. Takezawa *et al.*, *Exp. Cell Res.*, **208**, 430 (1993)
- 8) T. Takezawa, K. Yoshizato, *Tissue Eng.*, **3**, 329 (1997)
- 9) T. Takezawa *et al.*, *Tissue Eng.*, **6**, 641 (2000)
- 10) T. Takezawa *et al.*, *FASEB J.*, **16**, 1847 (2002)
- 11) 竹澤俊明, 再生医療, **4**, 39 (2005)
- 12) 竹澤俊明, バイオテクノロジーニューラル, **5**, 197 (2005)
- 13) 竹澤俊明ほか, 薬学雑誌, in press
- 14) T. Takeuchi *et al.*, in *Tissue Eng.*, in press
- 15) T. Takezawa *et al.*, *Cell Transplant.*, **13**, 463 (2004)
- 16) 竹澤俊明, 二谷綾, 化学と生物, **42**, 713 (2004)
- 17) T. Takezawa *et al.*, *Cells Tissues Organs*, **185**, 237 (2007)
- 18) T. Takezawa *et al.*, *J. Biotechnol.*, **131**, 76 (2007)
- 19) T. Takezawa *et al.*, *Tissue Eng.*, **13**, 1357 (2007)
- 20) 藤本大三郎, コラーゲン物語, p.8, 東京化学同人 (1999)
- 21) S. T. Li, "Biomedical Engineering Fundamentals (Ed. J. D. Bronzino)", p.43-47, CRC Press (2006)
- 22) 水野一乘, 林利彦, 細胞外マトリックス研究法 [1] (畠隆一郎ほか編), p.7, コラーゲン技術研修会 (1998)
- 23) E. Takushi *et al.*, *Nature*, **345**, 298 (1990)
- 24) 竹澤俊明ほか, 特願 2006-139442
- 25) J. A. Ko *et al.*, *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, in press
- 26) H. Yamamoto *et al.*, *Hepatology*, **37**, 983 (2003)
- 27) K. Yanagihara *et al.*, in preparation