

先ず基本スキャフォールドとしてのマトリックスを選択するために、ラット軟骨細胞について増殖、継代培養し、その後にスキャフォールドマトリックスに注入し培養した。hybrid-75PLC とコラーゲンゲルに細胞は同程度に良く接着したが、その後の細胞増殖率は 75PLC で最高になった。ヌードマウス皮下に移し、in vivo で 4 週後の軟骨再生の能力を検討したところコラーゲンスキャフォールドではその容積の半分の減少があったが、PLC のものは元の形を保ったままであり、軟骨組織の形成が見られた。これらの基礎データをもとに、グリコサミノグリカン鎖を PLC 担体マトリックスに付加し、BMP-6 や FGF-2 などの細胞増殖因子の分布部位を人工制御し、また活性発現を任意に調節可能にした場合を検討した。より天然に近いという点から生体親和性の高い担体の開発ができると予測した。実際、今回はウシの膝関節軟骨から得た軟骨細胞を用いて、PLC のみの培養基質と BMP-6 の添加 PLC で比較すると後者で数代の細胞分裂後もより高い軟骨分化能を維持できることが分かった。ただし、再現性に問題があった。この時、グリコサミノグリカン鎖としては、ヘパリンがもっとも効果的、ついでサメ軟骨からのコンドロイチン硫酸 C (多硫酸化された部分が多い) が効果的であった。この結果は、in vitro 結合実験でのこれらの細胞増殖因子とグリコサミノグリカンとの結合能力の結果と良い一致を示した。

D. 考察

今回の成果により、生体分解性の人工

コポリマーの整形により、任意の形を持った軟骨が得られる可能性が出てきた。またこれに細胞増殖因子結合性の糖鎖を結合させることにより、効率よい軟骨細胞の増殖と組織形成が可能であることが分かった。また生化学的、細胞生物学的な研究からこれらの増殖因子はグリコサミノグリカンの特異構造を認識して結合すること、しかもその構造は増殖因子により異なること、従って結合グリコサミノグリカン構造を特定のものを結合させればその作用を調整できる可能性があることも分かってきた。また増殖因子の機能的な利用にはグリコサミノグリカンの分解系の関与も必要なこともわかってきた。結果における再現性の問題はこのような様々な要素が総合的に作用していることを示唆するものであり、今後はこのような成果を考慮したグリコサミノグリカンスキャフォールドマトリックスの開発が課題となる。

E. 結論

1. 達成度について

生体分解性の合成コポリマー、PLC に同じく生体成分であるグリコサミノグリカン糖鎖を付加したものが軟骨組織の再生を行う上で組織工学的材料として極めて有効である可能性を示唆する結果が得られ、目標を達成した。

2. 研究成果の学術的・国際的・社会的意義について

グリコサミノグリカンと FGF や BMP などの細胞増殖因子との相互作用を実際に組織の再生の現場に持ち込み、実際に軟骨組織の形成とさらに組織の整形に応

用可能であることを初めて示した。

3. 今後の展望について

今回の成果により軟骨細胞をある形を持つように局所的に増殖させることが可能と思われる。実際の軟骨組織中の細胞は一様ではなく、部位により増殖や合成する細胞外基質分子も異なる（組織分化）。今後は今回開発に成功した系における組織でこのような組織分化現象を解析し、*in vivo* を反映するものに近づける

4. 研究内容の効率性について

グリコサミノグリカンと BMP などの細胞増殖因子との相互作用については、世界で初めてグリコサミノグリカン鎖上の細胞増殖因子の結合に必要な構造を示し、しかもそれらが細胞増殖因子の異なりにより相違するなどの成果を上げたが、この実績が直ぐに今回の軟骨再生の問題に活かされた。

5. 結論

生体分解性の合成コポリマー、PLC に同じく生体成分であるグリコサミノグリカン糖鎖を付加したものが軟骨組織の再生を行う上で有効な組織工学的材料となることを初めて示した。しかし、PLC スキャフォールドへの細胞の埋え込む方法などが、まだ一様ではなく、その後の軟骨再生の大きさや成熟度に問題を引き起こす。また上記した再現性の問題もある。これらの点を考慮し系を改善して、より良好な組織をつくるよう検討する必要がある。

F. 研究発表

1. 論文発表

・ S. Takeo, M. Fujise, T. Akiyama, H.

Habuchi, N. Itano, T. Matsuo, T. Aigaki, K. Kimata, H. Nakato. *In vivo* hyaluronan synthesis upon expression of the mammalian hyaluronan synthase gene in drosophila. *J Biol Chem* 2004;279:18920-18925.

・ Y. Yamada, N. Itano, K. Hata, M. Ueda, K. Kimata. Differential regulation by IL-1 β and EGF of expression of three different hyaluronan synthases in oral mucosal epithelial cells and fibroblasts and dermal fibroblasts: Quantitative analysis using real time RT-PCR. *J Invest Dermatol* 2004;122:631-639.

・ S. Cattaruzza, M. Schiappacassi, K. Kimata, A. Colombatti, R. Perris. The globular domains of PG-M/versican modulate the proliferation-apoptosis equilibrium and invasive capabilities of tumor cells. *FASEB J* 2004;18:779-81.

・ K. Ebisawa, K. Hata, K. Okada, K. Kimata, M. Ueda, S. Torii, H. Watanabe. Ultrasound enhances transforming growth factor beta-mediated chondrocyte differentiation of human mesenchymal stem cells. *Tissue Eng* 2004;10:921-9.

・ I. Kakizaki, K. Kojima, K. Takagaki, M. Endo, R. Kannagi, M. Ito, Y. Maruo, H. Sato, T. Yasuda, S. Mita, K. Kimata, N. Itano. A novel mechanism for the inhibition of hyaluronan biosynthesis by 4-methylumbelliferone. *J Biol Chem* 2004;279:33281-33289.

・ L. Zhuo, V. C. Hascall, K. Kimata. Inter- α -trypsin inhibitor, a covalent protein-glycosaminoglycan-protein complex. *J Biol Chem* 2004;279:38079-38082.

- ・ K. Kamimura, J. M. Rhodes, R. Ueda, M. McNeely, D. Shukla, K. Kimata, P. G. Spear, N. W. Shworak, H. Nakato. Regulation of Notch signaling by *Drosophila* heparan sulfate 3-O sulfotransferase. *J Cell Biol* 2004;166:1069-79.
 - ・ H. Habuchi, O. Habuchi, K. Kimata. Sulfation pattern in glycosaminoglycan: Does it have a code? *Glycoconj J* 2004;21:47-52.
 - ・ M. J. Honda, T. Yada, M. Ueda, K. Kimata. Cartilage formation by serial passaged cultured chondrocytes in a new scaffold: hybrid 75:25 poly (L-lactide-ε-caprolactone) sponge. *J Oral Maxillofac Surg* 2004;62:1510-6.
 - ・ L. Zhuo, N. Itano, L. Shen, J. Wu, H. Watanabe, K. Kimata, T. Nonogaki. Chapter 9 Biological function of SHAP-hyaluronan covalent complex. *Chemistry and Biology of Hyaluronan*. Elsevier Ltd., 2004:205-222.
2. 学会発表
- ・ Structure and function of cumulus HA-rich matrix. Jiwen Wu, Lisheng Zhuo, Fukiko Atsumi, Mayumi Kawano, Koji Kimata. 第 51 回マトリックス研究会大会. 2004.4.9 京都
 - ・ Proteoglycan aggregate of versican / PG-M in cartilage. Hideto Watanabe, Kazu Matsumoto, Nobuhiro Kamiya, Fukiko Atsumi, Yoshihiko Yamada, Koji Kimata. 11th Gordon Research Conference Proteoglycans. 2004.7.11-16 New Hampshire, U.S.A.
 - ・ グリコサミノグリカンは第 3 の生命鎖としての情報を持つか? 木全弘治. 産学連携を指向したタンパク質最前線セミナー

ー5 疾患グライコプロテオミクス 複合糖質の全体像の中での網羅的糖鎖機能解析. 2004.8.6 東京

・ 第 3 の生命鎖、グリコサミノグリカン. 木全弘治. 糖鎖科学の魅力と広がり. 2004.9.6 名古屋

・ 4-メチルウンベリフェロンによるヒアルロン酸合成阻害の新しい機構. 柿崎育子、児島薫、高垣啓一、遠藤正彦、神奈木玲児、安田忠司、三田知花、木全弘治、板野直樹. 第 77 回日本生化学会大会 2004.10.16 横浜

・ ヘパラン硫酸 6-O-硫酸転移酵素-1 (HS6ST-1) 欠損マウス: ヘパラン硫酸合成の欠陥が発育不良と出生前後の致死になる. 羽淵弘子、永井尚子、藤瀬桃子、渥美ふき子、木全弘治. 第 77 回日本生化学会大会. 2004.10.16 横浜

・ ヘパラン硫酸は骨形成因子シグナルに重要である. 入江敦、羽淵弘子、木全弘治、佐内豊. 第 77 回日本生化学会大会. 2004.10.16 横浜

・ 炎症性サイトカインと成長因子によるヒト歯肉線維芽細胞のヒアルロン酸合成および分解制御. 安田忠司、木全弘治、渋谷俊昭、板野直樹. 第 77 回日本生化学会大会. 2004.10.16 横浜

・ SHAP は CD44-ヒアルロン酸相互作用による細胞接着を増強する. Lisheng Zhuo、金森審子、神奈木玲児、板野直樹、Jiwen Wu、Li Shen、浜口道成、石黒直樹、木全弘治. 第 77 回日本生化学会大会. 2004.10.16 横浜

・ ヘパリンおよび修飾ヘパリンが VEGF 活性に与える影響. 芦刈-羽田智子、羽淵弘子、荻谷豊、木全弘治. 第 77 回日本生

化学会大会. 2004.10.16 横浜

・ヘパラン硫酸 6 硫酸化転移酵素 (HS6ST-2) ノックアウトマウスの解析. 永井尚子、羽淵弘子、渥美ふき子、木全弘治. 第 77 回日本生化学会大会. 2004.10.16 横浜

・軟骨分化におけるコンドロイチン硫酸合成酵素の発現. 坂井顕一郎、木全弘治、成松久、四宮謙一、渡辺秀人. 第 77 回日本生化学会大会. 2004.10.16 横浜

・基底膜蛋白質局在性データベースの作成. 眞鍋理一郎、中野伊津子、筒井仰、下野知性、福田友彦、木村美奈、山田登美子、古谷裕、三千典子、浄住大慈、長田亜紀、福田史朗、河合純、木全弘治、林崎良英、関口清俊. 第 77 回日本生化学会大会. 2004.10.16 横浜

・ Enzymatic synthesis of chondroitin by chondroitin polymerase from *Escherichia coli* strain K4. Nobuo Sugiura, Hideo Mochizuki, Hiroshi Maeda, Koji Kimata. Joint Meeting of the Society for Glycobiology and the Japanese Society of Carbohydrate Research. 2004.11.18 Hawaii, U.S.A.

・ Regulation of Notch signaling by *Drosophila* heparan sulfate 3-O sulfotransferase. Keisuke Kamimura, John M. Rhodes, Melissa McNeely, Deepak Shukla, Koji Kimata, Patricia G. Spear, Nicholas W. Shworak, Hiroshi Nakato. Joint Meeting of the Society for Glycobiology and the Japanese Society of Carbohydrate Research. 2004.11.19 Hawaii, U.S.A.

・ Heparan sulfate 6-O-sulfotransferase-1 (HS6ST-1) deficient mice: defective heparan sulfate biosynthesis caused runting and

perinatal lethality. Hiroko Habuchi, Naoko Nagai, Noriko Sugaya, Fukiko Atsumi, Koji Kimata. Joint Meeting of the Society for Glycobiology and the Japanese Society of Carbohydrate Research. 2004.11.19 Hawaii, U.S.A.

・ Role of chondroitin sulfate chains of versican/PG-M in regulation of chondrogenesis as an essential factor for mesenchymal condensation. Nobuhiro Kamiya, Hideto Watanabe, Hidekazu Takagi, Tamayuki Shinomura, Katsuji Shimizu, Koji Kimata. Joint Meeting of the Society for Glycobiology and the Japanese Society of Carbohydrate Research. 2004.11.19 Hawaii, U.S.A.

・ A novel inhibition mechanism of hyaluronan synthesis by 4-methylumbelliferone. Ikuko Kakizaki, Kaoru Kojima, Keiichi Takagaki, Masahiko Endo, Reiji Kannagi, Tadashi Yasuda, Satoka Mita, Koji Kimata, Naoki Itano. Joint Meeting of the Society for Glycobiology and the Japanese Society of Carbohydrate Research. 2004.11.20 Hawaii, U.S.A.

・ Functional regulation of molecular complexes with glycosylation. Koichi Furukawa, Koji Kimata. Joint Meeting of the Japanese and American Consortia for Glycomics. 2004.11.21 Hawaii, U.S.A.

・ Proteoglycan aggregate of versican/PG-M in cartilage. K. Matsumoto, K. Kamiya, F. Atsumi, K. Shimizu, Y. Yamada, K. Kimata, H. Watanabe. 9th World Congress of the OsteoArthritis Research Society International. 2004.12.2-5 Chicago, U.S.A

・PG-M/パーシカンとヒアルロン酸、リンク蛋白との結合様式の解析（第10回日本軟骨代謝学会賞受賞）。松本和、塩生真史、郷通子、清水克時、篠村多摩之、木全弘治、渡辺秀人。第18回日本軟骨代謝学会。2005.3.18 大阪

・軟骨分化における糖鎖合成酵素の発現。坂井顕一郎、木全弘治、渥美ふき子、成松久、四宮謙一、渡辺秀人。第18回日本軟骨代謝学会。2005.3.18 大阪

・マトリオーム解析：I 新規細胞外マトリックス蛋白質の網羅的探索と基底膜蛋白質ボディーマップデータベースの作成。眞鍋理一郎、筒井仰、福田友彦、中野伊津子、木村美奈、下野知性、小栗康子、嶋本桂子、三千典子、浄住大慈、佐渡義一、佐藤祐哉、河合純、林崎良英、木全弘治、妹尾春樹、関口清俊。第52回マトリックス研究会大会。2005.3.19 大分

・マトリオーム解析：II 細胞外マトリックス蛋白質の腎臓基底膜での空間・時間特異的発現パターン。福田友彦、眞鍋理一郎、筒井仰、中野伊津子、嶋本桂子、木村美奈、下野知性、小栗康子、三千典子、浄住大慈、佐渡義一、佐藤祐哉、河合純、林崎良英、木全弘治、妹尾春樹、関口清俊。第52回マトリックス研究会大会。2005.3.19 大分

・マトリオーム解析：IV 骨格系形成過程における新規細胞外マトリックス因子群の発現パターンの多様性。筒井仰、眞鍋理一郎、中野伊津子、福田友彦、木村美奈、小栗康子、河合純、林崎良英、木全弘治、関口清俊。第52回マトリックス研究会大会。2005.3.19 大分

・マトリオーム解析：III 細胞外マトリックス蛋白質の腸基底膜での空間・時間特異的発現パターン。嶋本桂子、眞鍋理一郎、福田友彦、筒井仰、中野伊津子、木村美奈、下野知性、小栗康子、三千典子、浄住大慈、佐渡義一、佐藤祐哉、河合純、林崎良英、木全弘治、妹尾春樹、関口清俊。第52回マトリックス研究会大会。2005.3.19 大分

G. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得

・ヒアルロナン結合性蛋白質とヒアルロナンとの複合体の形成促進剤 発明者：戸井田敏彦、木全弘治 権利者：生化学工業株式会社 工業所有権の種類、番号：特願 2004-22727 出願年月日：2004.1.30 取得年月日：-

分担研究者 春日敏宏 名古屋工業大学大学院工学研究科物質工学専攻 教授

研究要旨

シリンジを用いて経皮的に人工骨を患部に注入することができれば、埋入時の外科的侵襲を大きく低減でき、早期回復が期待できる。本分担研究では、生体吸収性を示す炭酸カルシウム（バテライト）と生分解性ポリ乳酸からなる複合体（CCPC）を中空球状粒子に成形する方法を新たに開発した。この中空球に、細胞の進入に適したチャンネルを設けることも可能であった。骨芽様細胞の接着性を調べたところ、細胞は中空球内部に良好に接着した。

A. 研究目的

本分担者は、昨年度までに、マトリックスを目的として、生体吸収性炭酸カルシウム-ポリ乳酸複合材料（CCPC）を新しく開発し、三次元培養を可能とする多孔質材料を作製することに成功した。本年度は、上田が提案する注入型人工骨に適用可能なスキャホールドの開発を進めた。

本分担研究で目指すスキャホールドの形態は、①流動性を高める球形であること、②細胞を球内部に接着させ保護する中空状であること、③細胞が導入でき、栄養分等の補給ができる球表面に外部との連絡通路があること、である。

B. 研究方法

メタノール中で、水酸化カルシウムと炭酸ガスを反応させると、準安定な炭酸カルシウム（バテライト）が生成する。メタノール 180 mL 中に水酸化カルシウム 7 g を入れ、炭酸ガスを 3 h バブリングした懸濁液を 70 °C で乾燥させた。作製した炭酸カルシウムには、バテライトが多く含まれ、一部アラゴナイトやカルサイトが含まれていた。このバテライトは、1 次粒径～100 μm、2 次粒径 0.5～1 μm

であり、比表面積～40 m²/g であった。塩化メチレン 10 mL を攪拌しながら、ポリ乳酸（メディカルグレード、分子量 16 万）を入れて作製した溶液中に、バテライトを加え、スラリー（CPスラリーと呼ぶ）を作製した。このとき、ポリ乳酸:バテライト=2:1（重量比）とした。このスラリーを 1% ポリエチレングリコール（PEG）水溶液に流し出した。スラリーを流し出した後、所定時間攪拌を行うことで小球体を得られた。その後、小球体を取り出し、乾燥した。

作製した球体に骨芽様細胞（MC3T3-E1）を播種し、1 週間培養して、接着性を調べた。

C. 研究結果および考察

球状粒子の生成機構：

小球体の直径は、攪拌 2 h まで小さくなった後、2 h から 3 h で急激に大きくなり、攪拌 8 h 以降は時間を経るごとに徐々に小さくなった。また、球は 24 h 攪拌後、約 60% が破裂していた。

流しだされた CPスラリーは球形となって溶媒中に存在する。溶媒を攪拌している間に、スラリー中の塩化メチレンは溶媒中に抜け出ていくため、ポリ乳酸は小球体の外側から

固化する。塩化メチレンには安定化剤として塩酸が若干含まれており、CPスラリー中の炭酸カルシウムを分解する。これにより発生した炭酸ガスは、球の骨格であるポリ乳酸の間隙間を通過して小球体の外側へと少しずつ抜け出ていく。攪拌時間が2hの場合、一部固化し始めた表面付近のポリ乳酸も、水中に存在する塩化メチレンによって徐々に溶解され、球が小さくなると考えられる。このとき、ポリ乳酸の膜は非常にやわらかい。攪拌3hまでは、発生した炭酸ガスがやわらかいポリ乳酸の膜を押し広げることで、球が急激に大きくなり、中空化しはじめると考えられる。攪拌3h以降は、溶媒からの塩化メチレンの揮発が進み、濃度が下がる。これによりポリ乳酸は固化しはじめ、攪拌3h以降の球の成長が止まる。炭酸カルシウムの溶解によって発生した炭酸ガスが球内部で増加し、それらが会合して球内部に大きな空洞を作ることになる。さらにこのガス量が増加し、その圧力に固化した球の骨格が耐えられなくなると、球は破裂する。PEG溶液に代えて、水を用いると、24h後の破裂球は約15%となった。溶媒に添加されたPEGは、球の骨格を構成している固化したポリ乳酸の間隙を埋めていると考えられ、球内部で増加する炭酸ガス圧を高めると思われる。水の場合にはこの効果が少なく、炭酸ガスがある程度の圧力になったときリークするため、破裂しなくなる反面、内部気孔の大きい中空球が得られにくい。中空体が生成すると、球内部のスラリーはなくなり、炭酸ガスの圧力増加が止まるため、球の成長も止まると考えられた。

開口部の作製：

細胞を中空体の内部に入れるために、外部との連絡通路が必要である。アセトンで50%に希釈した塩化メチレン溶液に中空球状粒

子を入れ、3min攪拌したところ、粒子の壁厚が薄い部分のポリ乳酸が溶解し、図1に示すような、数百 μm の開口部が得られた。これは、中空粒子が攪拌して作られる間に遠心力で内部の気孔が偏心することを利用したものである。

球状粒子のアパタイトコーティング：

材料表面にアパタイトが生成するために必要とされる条件は、アパタイトの核を誘起する化学種が存在することと、試料表面近傍の溶液中でのアパタイトに対する過飽和度が増加することであると提案されている。中空球状粒子にはアパタイト核形成誘起化学種の一つであるカルボキシ基をもつポリ乳酸が存在する。しかし、炭酸カルシウムは中空体が得られる段階で分解して減少しており、 Ca^{2+} イオンを供給して周囲のアパタイトに対する過飽和度を急上昇させるのは容易ではない。そこで、 Ca^{2+} イオンの供給源を増やすため、塩化カルシウム溶液に中空球状粒子を1日浸漬し、その後、擬似体液に3日間浸漬した。外壁表面、内壁表面、膜内において、アパタイト結晶が生成した。塩素は含まれなかった。

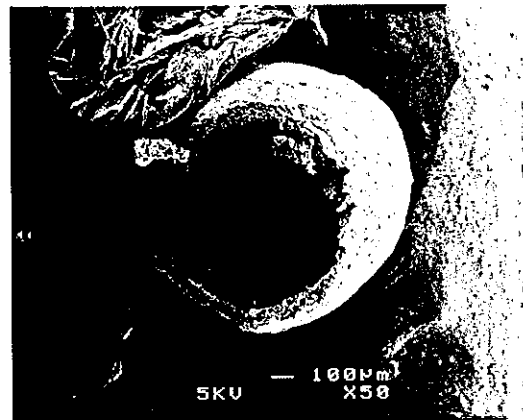


図1. 開口したCCPC球状粒子

図2は、骨芽様細胞を7日間培養した中空球

状粒子（表面をアパタイト化したもの）の内壁面のSEM写真である。良好な細胞接着性が見られる。外壁表面への接着はほとんどみられなかった。注入型人工骨としてのスキャホールドを考えた場合、外壁には注入・流動時に外力がかかり、細胞が付着していたとしてもダメージを受ける可能性が高い。この球体の場合、細胞は球内壁部に付着して保護されており、理想的な状態と想像される。

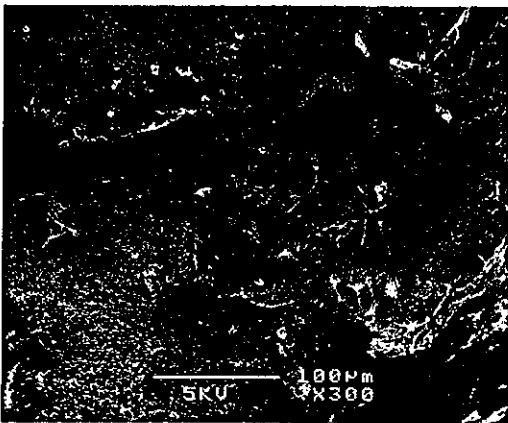


図2. 骨芽様細胞を7日培養後の中空球状粒子の内壁表面

D. 結論

CCPC中空小球体は、専用シリンジの針を通り、複雑な形態に対応できると考えており、体内で再生骨用のスペースを確保するスペーサーとしての役割を担うものと期待される。このCCPC中空体には、一部に細胞が侵入できる程度の穴が確保されており、細胞が中空体の内側に接着し、注入の際、他の球との摩擦に直接さらされずに保護できると考えられる。

E. 研究発表

1. 論文発表

H. Maeda, T. Kasuga, and M. Nogami: Bonelike Apatite Coating on Skeleton of Poly(Lactic Acid) Composite Sponge, Mater. Trans.,

45, 989-993 (2004).

・ H. Maeda, T. Kasuga, M. Nogami, and Y. Ota: Preparation of Calcium Carbonate Composites and Their Apatite-Forming Ability in Simulated Body Fluid, J. Ceram. Soc. Japan, 112, S804-S808 (2004).

・ 春日敏宏: 骨再生医療用スキャホールド材料の開発, セラミックデータブック 2004, Vol. 32, 工業製品技術協会編 (テクノプラザ, 東京) pp. 171-174.

・ H. Maeda, N. Miura, T. Kasuga, and M. Nogami: Preparation of poly(lactic acid) composite hollow spheres with an open channel, Key Engng. Mater., 284-286, 301-304 (2005)

・ T. Kasuga, H. Maeda, G. Jell, I. Notingher and L.L. Hench, Preparation of Vaterite/Poly(lactic acid) Composites with Excellent Apatite-Forming Ability, Key Engng. Mater., 284-286, 449-452 (2005).

・ H. Maeda, T. Kasuga and M. Nogami: Formation of Hydroxycarbonate Apatite Layer on Poly(lactic acid) Composites in Simulated Body Fluid, Key Engng. Mater., 284-286, 489-492 (2005)

・ H. Maeda, T. Kasuga, M. Nogami, and M. Ueda: Preparation of Bonelike Apatite Composite for Tissue Engineering Scaffold, Sci. Technol. Adv. Mater., 6, 48-53 (2005).

・ H. Maeda, T. Kasuga, and M. Nogami, Surface Potential of Poly(lactic acid) Composites Containing Calcium Carbonates in Simulated Body Fluid, J. Am. Ceram. Soc., (2005) in press.
2. 口頭発表

・ H. Maeda, N. Miura, T. Kasuga, and M. Nogami: Preparation of poly(lactic acid) composite hollow spheres with an open channel, 17th International Symposium on Ceramics in Medicine, New Orleans, December 8-12 (2004).

・ T. Kasuga, H. Maeda, G. Jell, I. Notingher and L.L. Hench, Preparation of Vaterite/Poly(lactic acid) Composites with Excellent Apatite-Forming Ability, 17th International Symposium on Ceramics in Medicine, New Orleans, December 8-12 (2004).

・ H. Maeda, T. Kasuga and M. Nogami: Formation of Hydroxycarbonate Apatite Layer on Poly(lactic acid) Composites in Simulated Body Fluid, 17th International Symposium on Ceramics in Medicine, New Orleans, December 8-12 (2004).

・ 前田、春日、野上：擬似体液中での炭酸カルシウム／ポリ乳酸複合体の表面電位、粉体粉末冶金協会平成 16 年度秋季大会（広島、2004 年 11 月 9～11 日）

・ 前田、春日、野上：シリカ含有ポリ乳酸複

合膜の作製、第 8 回生体関連セラミックス討論会（東京、2004 年 12 月 2～3 日）

・ 前田、春日、野上、L.L. Hench：シリカ溶出能を持つポリ乳酸複合膜の作製、日本セラミックス協会 2005 年年会（岡山、2005 年 3 月 22～24 日）

・ 春日：生体材料を目的とした中空球状粒子の作製、日本粉体工業技術協会（食品粉体技術、造粒合同分科会）（神奈川、2005 年 3 月 3 日）

F. 健康危険情報

本研究を通じて健康に危険をもたらす事項を認めていない。

G. 知的財産権の出願・登録状況

出願・登録ともなし。

研究成果の刊行に関する一覧表

Ueda M. : Clinical case reports of injectable tissue-engineered bone applied for alveolar augmentation with simultaneous implant placement. *Int. J. Perio. Rest. Dent.* in press 2005.

Miyata Y., Okada K., Fujimoto A., Hata K., Hideaki H., Tomita Y., Ueda M. The effect of the long-term cultivation on telomere length and morphology of cultured epidermis. *J. Derm. sci.* 34, 221-230, 2004

Yamada Y. Itano N. Narimatsu H. Kudo T. Morozumi K. Hirohashi S. Ochiai A. Ueda M. Kimata K. Elevated transcript level of hyaluronan synthase1 gene correlates with poor prognosis of human colon cancer. *Clin. Exp. Meta.* 21(1):57-63, 2004.

Yamada Y., Ueda M., Nakai T., Takahashi M., Hata K., Nagsaka T. Autogenous injectable bone for regeneration with mesenchymal stem cells and platelet-rich plasma. *Tissue Eng.* 10, 5/6, 955-63, 2004.

Ebisawa K., Hata K., Okada K., Kimata K., Ueda M., Torii S., Watanabe H. Ultrasound enhances transforming growth factor β -mediated chondrocyte differentiation of human mesenchymal stem cells. *Tissue Eng.* 10, 5/6, 921-29, 2004.

Yamada, Y., Ueda M, Naiki T and Nagasaka, T. Tissue-engineered injectable bone regeneration for osseointegrated dental implants. *Clin Oral Impl Res*, in press (2004).

(分担研究者)

(各務 秀明)

Narita Y, Hata K, Kagami H, Usui A, Ueda M, Ueda Y. Novel Pulse Duplicating Bioreactor System for Tissue-Engineered Vascular Construct. *Tissue Engineering* 10(7-8): 1224-33, 2004

Sugito T, Kagami H, Hata K, Nishiguchi H, Ueda M. Transplantation of cultured salivary gland cells into an atrophic salivary gland. *Cell Transplantation* 13:691-699, 2004

Miyata Y, Okada K, Fujimoto A, Hata K, Kagami H, Tomita Y, Ueda M:
The effect of the long-term cultivation on telomere length and morphology of cultured epidermis, *Journal of Dermatological Science* 34(3): 221-30, 2004

Ito A, Takizawa Y, Honda H, Hata K, Kagami H, Ueda M and Kobayashi T. Tissue engineering using magnetite nanoparticles and magnetic force: heterotypic layers of cocultured hepatocytes and endothelial cells. *Tissue Engineering* 10(5-6): 833-840, 2004

Ito A, Hayashida M, Honda H, Hata K, Kagami H, Ueda M and Kobayashi T. Construction and harvest of multilayered keratinocyte sheets using magnetite nanoparticles and magnetic force. *Tissue Engineering* 10(5-6): 873-80, 2004

Ito A, Hibino E, Honda H, Hata K, Kagami H, Ueda M and Kobayashi T. A new methodology of mesenchymal stem cell expansion using magnetic nanoparticles. *Biochem Eng J.* 20: 119-125, 2004

Maeda H., Kasuga T, Nogami M, Kagami H, Hata K, Ueda M. Preparation of bonelike apatite composite sponge. *Key Engineering Materials* 254, 497-500, 2004

(山田 陽一)

Yamada, Y., Itano, N, Narimatsu, H., Kudo, T., Hirohashi, S., Ochiai, A., Ueda, M., and Kimata, K. Elevated Expression of Hyaluronan Synthase1 Correlates with Poor Prognosis of Human Colon Cancer, *Clin Exp Metastas*, 21(1), 57-63, 2004.

Yamada, Y., Ueda M, Naiki T and Nagasaka, T. Tissue-engineered injectable bone regeneration for osseointegrated dental implants. *Clin Oral Impl Res*, 15, 589-597, 2004.

Yamada, Y., Itano, N, Hata, K., Ueda, M., and Kimata, K. Differential Regulation by IL-1 β and EGF of Expression of Three Different Hyaluronan Synthases in Oral Mucosal Epithelial Cells and Fibroblasts and Dermal Fibroblasts: Quantitative Analysis using Real Time RT-PCR, *J Invest Dermatol*, 122 (3), 631-639, 2004.

Yamada, Y., Ueda M, Hibi H and Nagasaka, T. Translational research for injectable tissue-engineered bone regeneration using mesenchymal stem cells and platelet -rich plasma-from basic research to clinical case study. *Cell transplantation*, 13, 343-355, 2004.

Yamada, Y., Ueda, M., Naiki, T., Takahashi, M., Hata, K., and Nagasaka, T. Autogenous injectable Bone for Regeneration with Mesenchymal Stem Cells (MSCs) and Platelet-Rich Plasma (PRP) – Tissue-engineered bone regeneration- *Tissue engineering*.10 (5/6), 955-964, 2004.

Takahashi, M., Yamada, Y., Ozawa, R., Ohya, M., Ito, K., and Ueda, M. Expression of Odontoblastic-related Genes in Human Dental Follicle Cells, Dental Pulp Stem Cells, and Oral Mucosal Cells. *Int J Oral-Med Sci*, 3, 41-48, 2004.

Ito, K., Yamada, Y., Nagasaka, T., Baba, H., and Ueda, M. Osteogenic potential of injectable tissue-engineered bone: a comparison among autogenous bone, bone substitute (Bio-Oss®),

platelet-rich plasma (PRP), and tissue engineered bone with respect to their mechanical properties and histological findings. *J. Biomed. Mater. Res. A*, 73, 63-72, 2005.

Ohya, M., Yamada, Y., Ozawa, R., Ito, K., Takahashi, M., and Ueda M. Sinus floor elevation applied for tissue-engineered bone – comparative study between mesenchymal stem cells (MSCs) and platelet-rich plasma (PRP) and autogenous bone with PRP complexes in rabbits -. *Clin Oral Impl Res*, in press.

Ueda, M., Yamada, Y., Ozawa, R., and Okazaki, Y. A clinical report of injectable tissue- engineered bone applied for alveolar augmentation with simultaneous implant placement. *The International Journal of Periodontics and Restorative Dentistry* in press.

Yamada, Y., Ueda, M., Hibi, H., and Baba, S. A novel approach to periodontal tissue regeneration with mesenchymal stem cells (MSCs) and platelet-rich plasma (PRP) using tissue engineering technology – a clinical case report - .*The International Journal of Periodontics and Restorative Dentistry* in press.

(鳥居 修平)

K. Ebisawa, K. Hata, K. Okada, K. Kimata, M. Ueda, S. Torii, H. Watanabe. Ultrasound enhances TGFβ-mediated chondrocyte differentiation of human mesenchymal stem cells. *Tissue Eng* 10, 921-929, 2004

M. Tatebe, R. Nakamura, H. Kagami, K. Okada, M. Ueda. The formation of joint cartilage and bone by fluorescent labeled mesenchymal stem cells without differentiation. (*Clinical Orthopaedics and Related Research*) in preparation

Ikuo Hyodo, Bin Nakayama, Mitsuru Takahashi, Kzuhiro Toriyama, Yuzuru Kamei and Shuhei Torii: The gastrocnemius with soleus bi-muscle flap. *British Journal of Plastic Surgery*, 57: 77-82, 2004.

(本多 裕之)

Akira Ito, Masao Hayashida, Hiroyuki Honda, Ken-ichiro Hata, Hideaki Kagami, Minoru Ueda and Takeshi Kobayashi “Construction and harvest of multilayered keratinocyte sheets using magnetite nanoparticles and magnetic force” *Tissue Engineering*, 10, 873-880, 2004.

Akira Ito, Eri Hibino, Hiroyuki Honda, Ken-ichiro Hata, Hideaki Kagami, Minoru Ueda and Takeshi Kobayashi “A new methodology of mesenchymal stem cell expansion using magnetic nanoparticles” *Biochemical Engineering Journal*, 20, 119-125, 2004.

Akira Ito, Yohei Takizawa, Hiroyuki Honda, Ken-ichiro Hata, Hideaki Kagami, Minoru Ueda and Takeshi Kobayashi "Tissue engineering using magnetite nanoparticles and magnetic force: heterotypic layers of co-cultured hepatocytes and endothelial cells" *Tissue Engineering*, 10(5/6), 833-840, 2004.

Akira Ito, Eri Hibino, Hiroyuki Honda Chiaki Kobayashi, Hiroko Terasaki, Hideaki Kagami, Minoru Ueda and Takeshi Kobayashi "Construction and delivery of tissue-engineering human retinal pigment epithelial cell sheets using magnetite nanoparticles and magnetic force" *Tissue Engineering*, in press, 2005.

Akira Ito, Kousuke Ino, Takeshi Kobayashi and Hiroyuki Honda "The effect of RGD peptide-conjugated magnetite cationic liposomes on cell growth and cell sheet harvesting" *Biomaterials*, in press, 2005.

Akira Ito, Kousuke Ino, Masao Hayashida, Takeshi Kobayashi, Hiroshi Matsunuma, Hideaki Kagami, Minoru Ueda and Hiroyuki Honda "A Novel Methodology for Fabrication of Tissue-Engineered Tubular Constructs Using Magnetite Nanoparticles and Magnetic force" *Tissue Engineering*, in press, 2005.

Akira Ito, Eri Hibino, Kazunori Shimizu, Takeshi Kobayashi, Yoichi Yamada, Hideharu Hibi, Minoru Ueda and Hiroyuki Honda "Magnetic force-based mesenchymal stem cell expansion using antibody-conjugated magnetoliposomes" *Journal of Biomedical Materials Research*, in press, 2005.

(高井 治)

Nae FA, Saito N, Hozumi A, Takai O. High-resolution submicron patterning of self-assembled monolayers using a molecular Fluorine laser at 157nm, *Langmuir*, 21, 1398-1402 (2005)

Saito N, Maeda N, Sugimura H, Takai O. Generation of amino-terminated surfaces by chemical lithography using atomic force microscopy, *Langmuir*, 20, 5182-5184 (2004)

Surface potential microscopy for chemistry of organic self-assembled monolayers in small domains, *Nonotechnol.*, 15, S69-S75 (2004)

(小林 一清)

Miura Y, Ikeda T, Kobayashi K: Chemoenzymatically synthesized glycoconjugate polymers, *Biomacromolecules*, 4, 410-415 (2003).

Miura Y, Ikeda T, Wada N, Sato H, Kobayashi K: Chemoenzymatic Synthesis of Glycoconjugate Polymers: Greening Synthesis of Biomaterials. *Green Chemistry*, 5, 610-614 (2003).

Miura Y, Ikeda T, Wada N, Kobayashi K: Yoshiko Miura, Chemoenzymatic Synthesis of a Multivalent Aminoglycoside, *Macromol. Biosci.*, 3, 662-667 (2003).

Miura, Y.; Sato, H.; Ikeda, T.; Sugimura, H.; Takai, O.; Kobayashi, K. Micro-Patterned Carbohydrate Displays by Self-Assembly of Glyco-conjugate Polymers on Hydrophobic Templates on Si, *Biomacromolecules*, 5, 1708-1703 (2004).

(木全 弘治)

S. Takeo, M. Fujise, T. Akiyama, H. Habuchi, N. Itano, T. Matsuo, T. Aigaki, K. Kimata, H. Nakato. In vivo hyaluronan synthesis upon expression of the mammalian hyaluronan synthase gene in drosophila. *J Biol Chem* 2004;279:18920-18925.

Y. Yamada, N. Itano, K. Hata, M. Ueda, K. Kimata. Differential regulation by IL-1 β and EGF of expression of three different hyaluronan syntases in oral mucosal epithelial cells and fibroblasts and dermal fibroblasts: Quantitative anylysis using real time RT-PCR. *J Invest Dermatol* 2004;122:631-639.

S. Cattaruzza, M. Schiappacassi, K. Kimata, A. Colombatti, R. Perris. The globular domains of PG-M/versican modulate the proliferation-apoptosis equilibrium and invasive capabilities of tumor cells. *FASEB J* 2004;18:779-81.

K. Ebisawa, K. Hata, K. Okada, K. Kimata, M. Ueda, S. Torii, H. Watanabe. Ultrasound enhances transforming growth factor beta-mediated chondrocyte differentiation of human mesenchymal stem cells. *Tissue Eng* 2004;10:921-9.

I. Kakizaki, K. Kojima, K. Takagaki, M. Endo, R. Kannagi, M. Ito, Y. Maruo, H. Sato, T. Yasuda, S. Mita, K. Kimata, N. Itano. A novel mechanism for the inhibition of hyaluronan biosynthesis by 4-methylumbelliferone. *J Biol Chem* 2004;279:33281-33289.

L. Zhuo, V. C. Hascall, K. Kimata. Inter- α -trypsin inhibitor, a covalent protein-glycosaminoglycan-protein complex. *J Biol Chem* 2004;279:38079-38082.

K. Kamimura, J. M. Rhodes, R. Ueda, M. McNeely, D. Shukla, K. Kimata, P. G. Spear, N. W. Shworak, H. Nakato. Regulation of Notch signaling by *Drosophila* heparan sulfate 3-O sulfotransferase. *J Cell Biol* 2004;166:1069-79.

H. Habuchi, O. Habuchi, K. Kimata. Sulfation pattern in glycosaminoglycan: Does it have a code? *Glycoconj J* 2004;21:47-52.

M. J. Honda, T. Yada, M. Ueda, K. Kimata. Cartilage formation by serial passaged cultured chondrocytes in a new scaffold: hybrid 75:25 poly (L-lactide- ϵ -caprolactone) sponge. *J Oral Maxillofac Surg* 2004;62:1510-6.

L. Zhuo, N. Itano, L. Shen, J. Wu, H. Watanabe, K. Kimata, T. Nonogaki. Chapter 9 Biological function of SHAP-hyaluronan covalent complex. *Chemistry and Biology of Hyaluronan*. Elsevier Ltd., 2004:205-222.

(春日 敏宏)

Maeda, T. Kasuga, and M. Nogami: Bonelike Apatite Coating on Skeleton of Poly (Lactic Acid) Composite Sponge, Mater. Trans., 45, 989-993 (2004).

Maeda, T. Kasuga, M. Nogami, and Y. Ota: Preparation of Calcium Carbonate Composites and Their Apatite-Forming Ability in Simulated Body Fluid, J. Ceram. Soc. Japan, 112, S804-S808 (2004).

H. Maeda, N. Miura, T. Kasuga, and M. Nogami: Preparation of poly(lactic acid) composite hollow spheres with an open channel, Key Engng. Mater., 284-286, 301-304 (2005)

T. Kasuga, H. Maeda, G. Jell, I. Notinger and L.L. Hench, Preparation of Vaterite/Poly(lactic acid) Composites with Excellent Apatite-Forming Ability, Key Engng. Mater., 284-286, 449-452 (2005).

H. Maeda, T. Kasuga and M. Nogami: Formation of Hydroxycarbonate Apatite Layer on Poly(lactic acid) Composites in Simulated Body Fluid, Key Engng. Mater., 284-286, 489-492 (2005)

H. Maeda, T. Kasuga, M. Nogami, and M. Ueda: Preparation of Bonelike Apatite Composite for Tissue Engineering Scaffold, Sci. Technol. Adv. Mater., 6, 48-53 (2005).

Maeda, T. Kasuga, and M. Nogami, Surface Potential of Poly(lactic acid) Composites Containing Calcium Carbonates in Simulated Body Fluid, J. Am. Ceram. Soc., (2005) in press.

1. 特許取得

- 特願 2002-64235 「骨又は歯周組織形成用の組成物」
- 特願 2002-173937 「骨再生用チタン製足場剤及びその製造方法」
- 特願 2002-215198 「細胞培養装置および細胞培養法」
- 特願 2002-376313 「未分化多能性細胞並びに、それを用いた関連組織又は歯作製方法」
- 特開 2002-320630 「生体組織または器官再生用器材」
- 特願 2003-27710 「細胞培養ディスク及びこれを用いる細胞培養装置」
- 特願 2004-49185 「細胞培養装置および細胞培養方法」
- 特願 2004-97636 「歯周組織再生用材料」
- 特願 2004-183951 「骨髄単核細胞の調整方法」
- 特開 2004-208808 「神経再生誘導管」

European Patent Application EP 1252904A3

Date of Filing 24.04.2002

Precursors for active materials, active materials using such precursors, and method for producing said active materials

Inventors: Sugimura Hiroyuki, Takai Osamu, Gomez-Vega, Jose Manual

Applicant: Nagoya University

Priority 25.04.2001 JP201128093

生体用材料

出願番号 特願 2002-111346

出願日 平成 14 年 3 月 10 日

発明者 三浦佳子、上坊史子、小林一清

出願人 小林一清

公開番号 特開 2003-260125

公開日 平成 15 年 9 月 16 日

酵素触媒による生分解性糖鎖高分子の製造法

出願番号 特願 2002-62899

出願日 平成 14 年 3 月 8 日

発明者 三浦佳子、池田高康、小林一清

出願人 小林一清

公開番号 特開 2003-261621

公開日 平成 15 年 9 月 19 日

Bone regeneration following injection of mesenchymal stem cells and fibrin glue with a biodegradable scaffold

Yoichi Yamada¹, Jae Seong Boo¹, Ryotaro Ozawa¹, Tetsuro Nagasaka², Yasuhiro Okazaki¹, Ken-ichiro Hata³, Minoru Ueda¹

¹ Department of Oral and Maxillofacial Surgery (Head: Prof. Dr. Ueda) Japan; ² Laboratory Medicine (Head: Prof. Dr. Nakashima), Nagoya University, Graduate School of Medicine, Nagoya, Japan;

³ Department of Tissue Engineering (Head: Assistant Prof. Dr. Hata), Nagoya University School of Medicine, Nagoya, Japan

SUMMARY. Aim: The purpose of this study was to determine whether a combination of fibrin glue, β -tricalcium phosphate as a biodegradable (β -TCP) and mesenchymal stem cells would provide three-dimensional templates for bone growth resulting in new bone formation at heterotopic sites in the rat with plasticity. Material and Methods: Growing stem cells and developing matrices, explanted from the rat femur, were fragmented and mixed with fibrin glue in a syringe. The cells/ β -TCP fibrin glue admixtures were injected into the subcutaneous space on the dorsum of the rat. Results: Eight weeks after implantation, gross morphology revealed a pearly opalescence and firm consistency. Histological inspections showed newly formed bone structures in all admixtures, but none in the control groups when only fibrin glue and β -TCP were injected. Osteopontin, a protein important in bone development, was identified by using antibodies in all cells/ β -TCP fibrin glue admixtures. Conclusion: Mesenchymal stem cells/ β -TCP fibrin glue admixtures can result in successful bone formation. This technique holds the promise of a minimally invasive means of generating autogenous bone to correct or reconstruct bony defects. © 2003 European Association for Cranio-Maxillofacial Surgery.

INTRODUCTION

Tissue engineering of bone regeneration by autogenous cell transplantation is one of the most promising treatment concepts being developed, as it eliminates the problems of donor site morbidity for autologous grafts, the immunogenicity of allogenic grafts, and loosening of alloplastic implants (Vacanti et al., 1988, 1998). Langer and Vacanti (1993) have called it *tissue engineering*, involving the morphogenesis of new tissues formed from isolated cells and biocompatible polymers. In *tissue engineering*, man-made polymers are utilized such as hydroxyapatite (HA), polyglycolide (PGA), polylactides (PLLA, PDLA), and polycaprolactone (PCL) as scaffolds because they had enough biocompatibility and biodegradability to fabricate artificial cartilage or bone. On the other hand, mesenchymal stem cells are thought to be multipotent cells that can replicate as undifferentiated cells, and have the potential to differentiate and produce mesenchymal tissues like bone, cartilage, fat, tendon, muscle, and marrow stroma (Pittenger et al., 1999). They have received widespread attention because of their potential in tissue engineering.

Fibrin glue, a composite of fibrinogen and thrombin, is a physiologically relevant matrix whose principal component, fibrin, has fundamental roles in the process of blood clotting and wound healing. It is a potentially suitable biological vehicle for cell

transplantation since it has proven biocompatibility, biodegradability, and binding capacity to cells (Keller et al., 1985). Fibrin-stabilizing factor XIII, contained in fibrin glue, favours migration of undifferentiated mesenchymal stem cells (MSCs) on the highly cross-linked structure of the glue, and it enhances proliferation of these cells (Marktl and Rudas, 1974; Kasai et al., 1983).

In conventional procedures, the transplantation of bone requires invasive procedures such as skin or mucosal incisions and reflection of the periosteum. An injection, leading to additions of autogenous cartilage or bone to the craniofacial skeleton would minimize surgical trauma and eliminate the need for allografts or alloplastic prostheses. If one could transplant by means of injection and onlay of large numbers of isolated cells by adapting the techniques described by Vacanti and coworkers (Vacanti et al., 1988, 1990; Langer and Vacanti, 1993), one could augment the craniofacial osseocartilaginous skeleton with autogenous tissue without extensive surgery. Furthermore, successfully implanting isolated cells would create the potential for tissue culture augmentation of osteoblasts. Unlike the porous ceramics currently used to create a cell-ceramics construct, a liquid support matrix that polymerizes to a gel would be shaped more easily and moulded for custom reconstruction or augmentation. In addition, an injection would be much less invasive than open implantation. For all these reasons, fibrin glue plus

β -tricalcium phosphate (β -TCP) were investigated as a means of delivering large numbers of isolated stem cells to promote bone formation.

The aim of this study was to determine whether a combination of fibrin glue plus β -TCP and MSCs could act as an injectable osteogenic bone substitute leading to new bone formation.

MATERIAL AND METHODS

Material

The β -TCP was supplied by NGK SPARK PLUG CO., LTD., Nagoya, Japan. The solid and porous components of the microstructure were completely interconnected. The average pore diameter was 200–400 μ m the interconnection average was 60 μ m and the average void volume was 90%. These ceramics were disc-shaped blocks, 5 mm in diameter and 4 mm thick.

Cell isolation, cultivation and matrix loading

MSCs' isolation and culture expansion was performed according to previously published methods (Maniatopoulos et al., 1988; Dennis et al., 1992;

Yoshikawa et al., 1996). Briefly, two male 7-week-old Fisher F344 rats were sacrificed by pentobarbital overdose. Both ends of the femurs of each rat were removed at the level of the epiphysis, and marrow plugs were flushed out from the epiphysis using 10 ml of a culture medium expelled from a syringe through a 23-gauge needle (Fig. 1). The culture medium consisted of a minimum essential medium (MEM) containing 15% fetal bovine serum and antibiotics (100 U/ml penicillin, 100 μ g/ml streptomycin, and 0.25 μ g/ml amphotericin B, Sigma-Aldrich, Poole, UK). The released cells were collected in two tissue culture flasks (7.5×10 cm²) containing 15 ml medium. The medium was changed after the first 24 h to remove non-adherent cells. Subsequently, the medium was removed 3 times a week. Cultures were maintained in a humidified atmosphere of 95% air with 5% CO₂ at 37°C.

After 10 days in primary culture, bone-marrow-derived MSCs were released from their culture substratum using 0.05% trypsin-EDTA. The cells were concentrated by a centrifuge at 900 rpm for 5 min at room temperature, resulting in 10×10^6 cells/ml. The β -TCP blocks were soaked in a cell suspension (10×10^6 cells/ml) for 2 h in a CO₂ incubator. After 2 h of incubation, each block was transferred into a 24-well plate for subcultures. One block was subcultured in one well with 1 ml of the

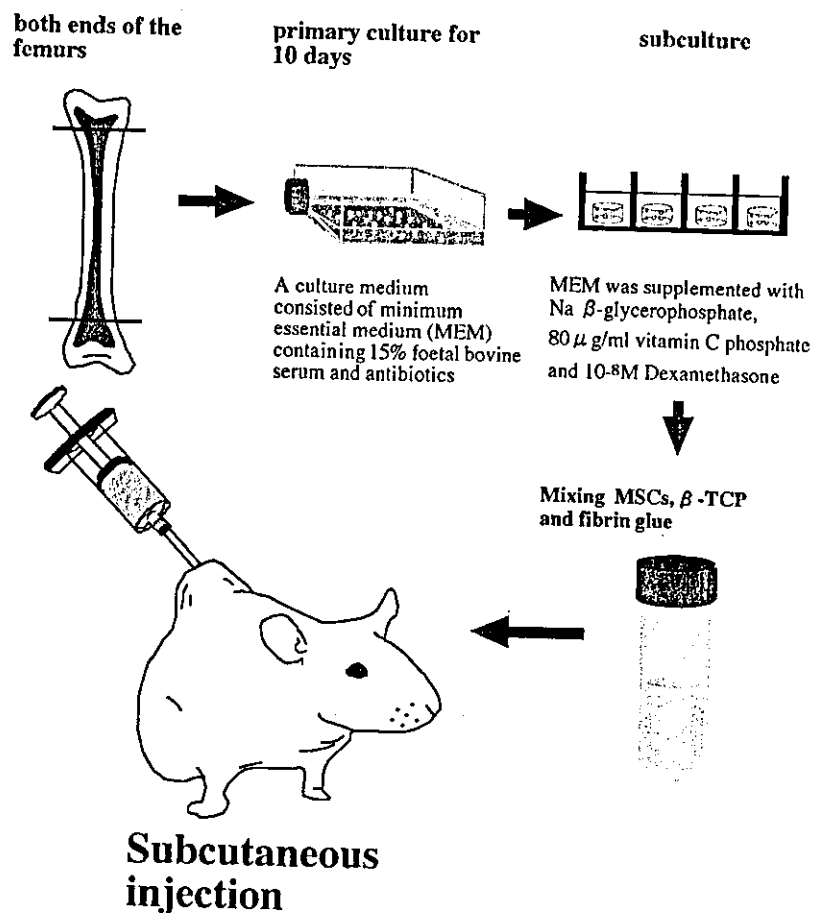


Fig. 1 – Schema of experimental protocol using MSCs/ β -TCP-fibrin glue admixtures.

culture medium supplemented with 10 mmol Na β -glycerophosphate, 80 μ g/ml vitamin C phosphate (L-ascorbic acid phosphate magnesium salt *n*-hydrate, C₆H₆O₆) and 10⁻⁸ mol dexamethason (Sigma-Aldrich, Poole, UK). The subcultures were maintained for 20 days.

Preparation of fibrin glue and coagulation time

Pasteurized fibrin glue (Bolheal, the ChemoSero-Therapeutic Research Institute, Kumamoto, Japan) was formed by mixing two separate solutions, A and B. Solution A consisted of fibrinogen (80 mg/ml) and fibrin-stabilizing factor XIII (75 units/ml) dissolved in 1 ml of plasmin inhibitor aprotinin (1000 kIE/ml). Solution B contained thrombin (250 units) dissolved in 1 ml of 40 μ M CaCl₂. Solutions A and B were mixed in a 1:1 (vol/vol) ratio. The clotting reaction between A and B produced a semirigid three-dimensional gel at room temperature. We also investigated the correlation between coagulation time and thrombin dilution by checking the time required to confirm 'white muddiness' by mixing fibrinogen with thrombin on a glass plate (Table 1).

Injection of MSCs/ β -TCP fibrin glue admixtures and harvesting

The β -TCP loaded with MSCs after 20 days of subculture (MSCs/ β -TCP composite) was reduced to small lumps in a sterilized 5 ml syringe and resuspended in solution A. Solution A containing MSCs/ β -TCP composite and solution B [1:1 (vol/vol) ratio] were placed in the barrel of the 5 ml sterilized syringe and mixed by inverting the syringe repeatedly.

Syngeneic 7-week-old male Fischer rats were anaesthetized by intramuscular injection of pentobarbital (nembutal 3.5 mg/100 g body weight) following light ether inhalation. The skin was prepared with povidone-iodine. An 18 gauge needle was inserted into the loose connective space between the panniculus carnosus and the muscle fascia. A total of 0.5 ml of the MSCs/ β -TCP fibrin glue admixture was injected into the subcutaneous space (Fig. 1).

From preliminary studies (Boo et al., 2002), injection of $\sim 10 \times 10^6$ pure cells/ml in culture medium, or MSCs plus β -TCP (not subculture) produced no response over 8 weeks. These experimental groups were excluded from further study. On

this basis, the matrix alone was supposed to fail to produce tissue development and this protocol was likewise excluded from additional investigations. The animals were assigned into one experimental group (injected with MSCs/ β -TCP fibrin glue admixtures) and one control group (injected with the fibrin glue β -TCP admixture). All animals received humane care in compliance with the 'Guidelines for the Care and Use of Laboratory Animals' published by the National Institutes of Health (NIH Publication no. 85-23, revised 1985). They were analysed 2 ($n=5$), 4 ($n=5$), and 8 ($n=5$) weeks after injection. Sacrifice was by an overdose of ether inhalation.

Histologic analysis and mineral detection

Each implant was excised 2, 4 or 8 weeks after injection, photographed and assessed for opacity and formation of any bone-like tissues radiographically. The specimens were fixed in 10% buffered formalin, decalcified (K-CX, Falma Co., Tokyo), and stained with hematoxylin and eosin. These specimens were examined under a light microscope and analysed by a pathologist blinded to the identity of each specimen. He was asked to determine the presence or absence of bone formation. All sections were reviewed by one of the authors (YY), who agreed with the pathologist in all cases.

Immunohistochemistry was performed on 4 μ m sections of formalin-fixed, paraffin-embedded specimens using a streptavidin technique (HISTOFINE SAB-PO (M) kit, Nichirei, Tokyo, Japan). The primary antibody was a murine monoclonal antibody raised against rat osteopontin.

Biochemical analysis

The implants were harvested and used for biochemical analysis after 2, 4 or 8 weeks. The osteocalcin content was determined as reported previously (Yoshikawa et al., 1992). Briefly, each composite was immediately crushed, homogenized with 0.5 ml of 0.2% Nonidet P40 containing 1 mM MgCl₂, and centrifuged at 13 000 rpm for 10 min at 4°C. Osteocalcin was extracted from the sediment after extraction of 0.2% Nonidet P40 in 10 ml of 20% formic acid for 2 weeks at 4°C. An aliquot (2 ml) of the formic acid extract was then applied to an Ampure™ SA column (Amersham, Japan) and eluted with 10% formic acid. Protein fractions were collected, lyophilized, and prepared for an osteocalcin radioimmunoassay as previously described (Yoshikawa et al., 1992; Dohi et al., 1992).

Statistical analysis

Statistical analysis was performed by paired Student's *t*-test. Significantly different findings were indicated at $p < 0.05$.

Table 1 - Correlation between coagulation time and thrombin dilution

Dilution multiple	(activity (U/ml))	Coagulation time
1	(250)	10
2	(125)	15
5	(50)	25
10	(25)	40
20	(12.5)	60
50	(5.0)	120
100	(2.5)	210

RESULTS**Macroscopic observations of the injected implants**

After injection of MSCs/ β -TCP fibrin glue admixtures into rats, subcutaneous nodules formed by 8 weeks and these were hard and resisted compression. The admixture nodules had well-defined margins upon dissection from subcutaneous tissue (Fig. 2). Injection of only fibrin glue β -TCP failed to form nodules. Implants after 8 weeks were well vascularized, more so than at earlier times (4 weeks). At no time was evidence of malignant growth found in any of the specimens. On the other hand, control implants of injected fibrin glue β -TCP admixtures had only a shiny appearance and an elastic consistency at 2 weeks, which continued until 8 weeks. The implant margin was not detectable at 8 weeks and the nodules remained flat (Fig. 2).

Mineral detection of the implants

Determination of mineral formation was made by using radiographs of the implant and an assay for osteocalcin content. Radiographic surveys of the implants showed that calcification occurred in the MSCs/ β -TCP fibrin glue admixtures 8 weeks after implantation. Only a few of the control implants of injected fibrin glue β -TCP admixtures demonstrated mineral deposition at any time (Fig. 3).

The radiographic appearance of the implants was consistent with the osteocalcin content findings. The mean calcium content *in vivo* increased with the duration of implantation up to 8 weeks. The differences between these specimens when compared with only fibrin glue β -TCP admixture controls were statistically significant (Fig. 4).

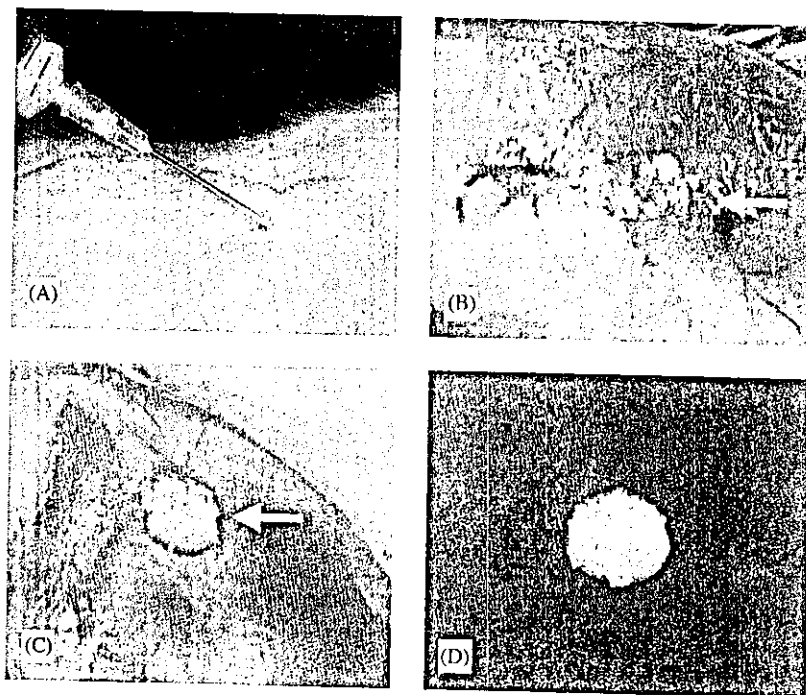


Fig. 2 – Macroscopic observations of injected material. (A) MSCs/ β -TCP fibrin glue admixture injected from an 18 gauge needle. (B) Site of injection of only fibrin glue β -TCP after 8 weeks. Note some residual material that could not be distinguished from the subcutaneous layer. (C) Implant 8 weeks after injection of the MSCs/ β -TCP fibrin glue admixture. A well-defined nodule is present. (D) Specimen after removal of a thin soft-tissue capsule.

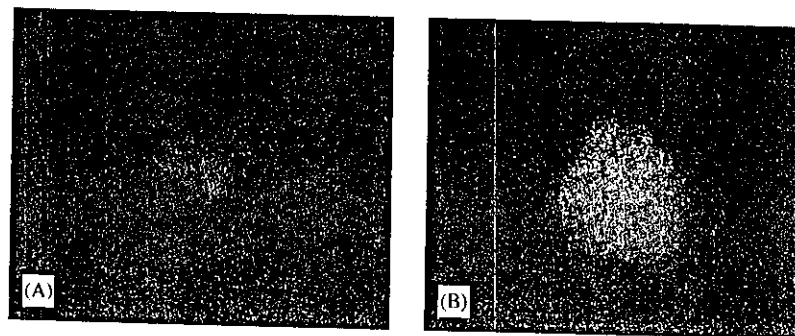


Fig. 3 – Radiography of representative implants at 8 weeks. (A) Little evidence of the presence of minerals in fibrin glue β -TCP admixture in 8 weeks control animal. (B) Radiograph of an experimental sample with mineralized material.