

2004000793

厚生労働科学研究研究費補助金

ヒトゲノム・再生医療等研究事業

組織工学技術を用いた骨・軟骨の効果的
効率的再生による臨床研究

平成15～16年度 総合研究報告書

主任研究者 上田 実

平成17(2005)年4月

目 次

I. 総合研究報告	
組織工学技術を用いた骨・軟骨の効果的再生による臨床研究	-----1
上田 実	
II. 分担研究報告	
1. 歯周組織再建のための基礎研究および臨床応用	-----14
各務 秀明	
2. 未分化間葉系細胞を用いた骨再生の臨床研究	-----21
山田 陽一	
3. 軟骨効果的効率的再生に関する研究	-----27
鳥居 修平	
4. 細胞の大量培養システムの確立に関する研究	-----29
本多 裕之	
5. 骨組織マトリックスの作成に関する研究	-----34
高井 治	
6. 培養器の表面性状の改良	-----41
小林 一清	
7. 軟骨再生における至適材料評価に関する研究	-----47
木全 弘治	
8. マトリックスの改良および開発に関する研究	-----55
春日 敏宏	
III. 研究成果の刊行に関する一覧表・別刷	-----71

厚生労働科学研究費補助金（ヒトゲノム・再生医療等研究事業）

総括研究報告書

組織工学技術を用いた骨・軟骨の効果的再生による臨床研究

主任研究者 上田 実 名古屋大学大学院医学研究科頭頸部・感覚器外科学講座 教授

研究要旨

組織工学的手法は、生きた細胞を用いて移植組織が作製できる極めて優れた方法として世界的に注目されている。本研究は、骨、軟骨組織の再生に着目し、これら組織工学の手法を用いた骨系統疾患患者の治療方法を確立しようとするものである。本研究の特徴は、基礎的研究から臨床応用まで一貫して検討することにある。平成 15 年度は、主に骨延長部への注入型人工骨の応用や、新たな骨、軟骨再生用マトリックスの開発につながる研究などを進めた。また、培養骨膜による骨再生を大型動物疾患モデルにて効果を確認した後、臨床応用を開始した。軟骨再生については、関節軟骨再生の動物実験と新たな担体に関する基礎的検討を行い、臨床応用のための技術的課題の克服を目指した。平成 16 年度には、注入型人工骨については物理的性状の検討や臨床応用に際しての安全性確保に関する検討を行った。また、新たな骨、軟骨再生用マトリックスの開発につながる研究を進めている。培養骨膜を用いた骨再生については、重度歯周病患者に関する有用性の検討と、凍結保存法確立のための検討を行った。軟骨再生については、MSC を用いた関節軟骨治療の動物実験を行い、治療効果とともに移植細胞の分化を検討した。さらに新たな担体などの基礎的検討を行い、臨床応用のための技術的課題の克服を目指した。本研究における骨再生の対象患者は、種々の要因にて生じた骨欠損患者で骨移植を必要とするものや、人工関節などの代替物置換を必要としているものである。また軟骨組織再生では、関節軟骨の障害に起因する膝または股関節症患者や、耳介、鼻翼欠損などの審美的問題を有するものが対象となる。本研究が完遂した際には、これらの症例に対し極めて有効な治療方法を提供できるとともに、患者一人あたりの手術回数の減少および治療期間の短縮が見込まれ、医療経済的にも有利となる。

分担研究者

各務 秀明 名古屋大学医学部組織工学講座
助教授

山田 陽一 名古屋大学医学部附属病院遺伝
子・再生医療センター 助手

鳥居修平 名古屋大学医学部形成外科 教授

本多 裕之 名古屋大学大学院工学研究科生
物機能工学専攻生物プロセス工学講座 助
教授

高井 治 名古屋大学理工科学総合研究セン
ター 教授

小林一清 名古屋大学大学院工学研究科生物

機能工学専攻生体材料工学講座 教授

木全弘治 愛知医科大学分子医科学研究所
教授

春日敏宏 名古屋工業大学工学部材料工学科
ハイブリッド機能機構学講座 助教授

A. 研究目的

国民が高度な医療を享受してゆくためには、組織工学（ティッシュエンジニアリング）を基礎としたヒト組織の再生技術とそのための基礎的技術を早急に確立させ、再生医療用製品生産に関わる産業の発展を促進させることが必要不可欠である。本研究開発では、骨、および

軟骨を対象として細胞を生体中にある状態と同様に組織化し、組織・臓器の持つ高次な機能を再現するための技術を確立する。また、新たな担体の開発や再生した細胞組織の輸送、関連する各種生理活性物質の利用など、広範な分野での新規産業の創出に資することを目的としている。具体的には、近年注目されているティッシュエンジニアリング技術を用い、自家あるいは同種の骨移植にかわりうる、新しい人工骨あるいは軟骨材料を開発し臨床応用に至る道筋を拓くことが本研究課題の主眼である。以下、本研究の具体的目標として、骨、軟骨組織に分けて述べる。

骨：本プロジェクトでは、完全生体吸収性の材料による骨、軟骨再生と、細胞の採取から移植まで、低侵襲で患者に負担をかけない再生医療の開発を目的としている。また、骨欠損部に成形することなく使用できる注入型人工骨や、培養骨膜を用いた骨再生治療の開発により、今後は個々の患者の状態や欠損の大きさ、形状に適した治療法が選択可能となることを目指している。いち早く臨床応用を行うことで患者への貢献をし、quality of life (QOL) の向上に寄与することを目的とする。今回、すでに臨床応用されている未分化間葉系幹細胞を用いた骨再生については、その基盤となる基礎的研究にも重点を置くこととし、培養骨膜については臨床応用を開始するなかで、治療方法の開発および最適化を検討していく。

軟骨：新たな関節軟骨用担体の開発により、骨膜による関節面の被覆を必要としない軟骨再生治療を確立する。これにより治療侵襲を軽減できるのみでなく、長期予後の改善にもつながる可能性がある。さらに骨・軟骨複合組織の再生は、より重篤な関節の傷害にも応用可能と考えられ、運動機能の傷害を持つ高齢者に新たな

治療法を提供することが期待される。この目的のために、移植された細胞の軟骨、骨への分化を制御するための基礎的検討も合わせて行う。

B. 研究方法

骨再生に関する研究

注入型培養骨の特徴を、組織学的検討に加えて人工歯根（インプラント）との結合率、骨占有率などにおいても検討を行った。また、これまで行ってきた臨床症例について、臨床的評価に加えて、レントゲンの（CTなどを用いて）評価を行った。注入型培養骨の特徴を、組織学的検討に加えて、組織形態学および物理的強度、人工歯根（インプラント）との結合率、骨占有率などにおいても検討を行った。また、移植細胞の特性、安全性についても検討を行い、より安全性に担保された臨床応用を進めることを計画した。これまで行ってきた臨床応用例について、臨床的評価に加えて、レントゲンの（CTなどを用いて）評価を行った。

骨再生や軟骨再生に用いられる細胞源の多様化と患者負担の軽減のために、Mag-TE (Magnetic force-based tissue engineering)を用いて、磁力で高密度に間葉系幹細胞（MSC）を播種・培養することによって、MSCの増殖を促進させる可能性について検討を行った。

一方、培養骨膜は、そのシート状の構造のため、上記の流動型マトリックスによる骨再生が得られにくい歯周病（歯槽膿漏）患者の歯槽骨欠損への応用が可能である。本研究期間では、骨のみでなく歯根膜など歯周組織の再生についても検討を行うこととした。また、培養骨膜シートの凍結保存法を検討することで、臨床における実用性を高める研究も行うこととした。さらに、これまでの研究成果を生かして臨床応用を加速させていくことに重点をおいた。

さらに、新たな骨再生用の担体として、PLA

と炭酸カルシウムの多形であるバテライトからなる複合体 (CCPC) を用いて、HCA で骨格表面を覆った多孔体の開発を試みた。HCA は焼結アパタイトと同程度の骨芽細胞との親和性を示し、高い生体吸収性も持つことが期待されているため、吸収性でありながら、自由な成形と十分な骨誘導を可能にする新たな担体が開発できる。

軟骨再生に関する研究

MSC から軟骨細胞への分化誘導法は確立しており、臨床の場で使用しやすい再生法の開発を本研究期間の課題とする。

平成 15 年度には、基礎的検討として軟骨組織再生を制御する方法についての検討を行った。特に、移植された細胞の分化に関する検討を開始するとともに、軟骨再生のための新たな担体の検討を行った。具体的には PGA, PLA に糖鎖+BMP や FGF などの細胞増殖因子を付加したものである。これらのマトリックスに軟骨細胞を混ぜヌードマウスの背部皮下に移植を行い、2 週、4 週後の組織をアリューシャンブルー染色、基質アグリカン量を中心とした軟骨マーカーを指標にそれぞれのマトリックスを評価した。

平成 16 年度には、ウサギを用いて関節軟骨欠損モデルを作製し、MSC と担体による治療実験を行い、有用性を確認した。さらに、移植細胞のトラッキングを行うことで、骨、および軟骨細胞への分化と再生組織への貢献について調べた。また、軟骨再生のための新たな担体の検討として、注入型軟骨作製および 3 次元培養におけるマトリックスの至適材料の検討を行った。本年度は特に、天然のマトリックスにより類似し、かつ軟骨再生のキーとなる細胞増殖因子が有効に作用するグリコサミノグリカン鎖結合マトリックススキャフォールドの有効性を組織学的、生化学的に

も確認した。これ以外にも、光リソグラフィーなどの新たな手法を用いた新たな担体表面加工技術として、マイクロパターン化細胞培養表面の創製を試み、組織工学への応用を目指した。

(倫理面への配慮)

本研究におけるヒト組織の取り扱いについては、組織採取を行う場合、手術時に余剰となったものを利用することを原則に、該当患者に書面および口頭で十分に説明し同意を得た。さらにこれら説明文、同意書については名古屋大学倫理委員会にて承認されたものを用いた。また、採取したすべての組織については、患者プライバシーの保護のためドナー情報は秘密にて行うこととした。また、動物実験については名古屋大学動物実験指針に基づき、学内動物実験委員会にて承認された内容を遵守して行った。

C. 研究結果

骨：注入型培養骨の骨再生能力を欠損のみ、自家骨、PRP のみと比較検討した。その結果、再生された骨占有率は、移植後 8 週目においては、 $18.3\pm 4.84\%$ (欠損のみ), $29.2\pm 5.47\%$ (PRP), $61.4\pm 3.38\%$ (自家骨), and $67.3\pm 2.06\%$ (注入型培養骨)であった。また、インプラントとの骨結合率については $26.4\pm 9.5\%$ (欠損のみ), $44.2\pm 10.8\%$ (PRP), $49.9\pm 8.2\%$ (自家骨), $58.6\pm 9.7\%$ (注入型培養骨)であった。さらに、組織学的にも注入型培養骨は十分な層板構造を持った成熟した骨再生が確認された。

注入型培養骨の骨再生能力を非脱灰切片にて、人工材料である BioOss と比較検討を行い、物理的強度を計測した結果、移植後 2 週という初期において $8.40\pm 1.50\%$ (欠損のみ), $9.30\pm 1.64\%$ (PRP), $11.24\pm 1.97\%$ (自家骨), $17.66\pm 2.60\%$ (注入型培養骨)の値を示したのに対し、BioOss では十分な強度を有しておらず、

計測不可能であった。また、採取しているMSCsはCD105、CD44などの表面抗体を発現しており、造血幹細胞に特異的とされるCD34、CD45などの発現は見られなかった。さらに、細胞の安全性についても検討し、マイコプラズマ感染、エンドトキシンなども検出されなかった。また、染色体においても転座、欠失などの異常は見られなかった。以上の結果をもとに、臨床応用を行った。インプラントとの応用例(13例)、骨延長部への応用例(6例)、歯周病への応用例(3例)に適應され、現在経過は良好である。

MSCの効率的培養法の検討のため、骨髓液にAMLを取り込ませ、磁石を設置して培養を行った。磁石を設置した部分に細胞が集積している様子が観察され、対照群と比べて、明らかに多数の細胞を得ることができた。今後僅から幹細胞分画しか含まない資料や、少量の試料から幹細胞の培養を可能にする方法につながる結果である。

一方、培養した骨膜細胞のシートを用いて、歯周疾患による骨吸収を治療する研究も行ってきた。少量の骨膜細胞を培養すると50~100umの厚みを有するシート状を呈し、これが高い骨形成能を有することにわれわれは注目した。この培養骨膜シートは骨形成能を有する膜であり、人工材料を含まず、細胞と細胞外マトリックスのみより構成される極めて生体親和性の高い移植材料である。現在までにイヌへの移植実験で、歯槽骨のみならず従来の歯周病治療法では困難とされていた、セメント質を含む歯周組織の再生が得られることを確認した。これらの結果をもとに、重症歯周病患者、特にこれまでの治療法では再生が困難であった水平的骨欠損を有する患者への臨床応用を行った。6ヶ月以上の経過観察を行い得た2例については、ポケットの減少とともに歯槽骨の再生を認め、ほぼ正常域までの回復を認めた。一方、

凍結保存方法の最適化の実験からはDMSOを用いて30分から1時間振とう下、37℃でプレインキュベーションした群で60%以上の生存率が得られ、解凍後の培養骨膜をラット頭蓋骨欠損モデルに移植した群では通常の培養骨膜シートと同様に骨欠損の閉鎖が見られた。

軟骨：PCL、PLAなどの様々な担体を用いて*in vivo*での軟骨再生の最適条件の比較検討を行った。また、糖鎖を担体マトリックスに付加することで、BMPやFGFなどの細胞増殖因子の活性発現部位を任意に調節可能で効率よく利用でき、同時により生体親和性の高い担体の開発を行った。実際、ウシ膝関節軟骨から得た細胞は、PCL+PLAのコポリマー培養基質とBMPの添加により高い軟骨分化能をかなりの細胞分裂後も再獲得できることを明らかにした。従って、コポリマーの糖鎖結合部分の整形により、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、この担体への増殖因子の添加により、移植された細胞の分化をコントロールする可能性が示唆された。その他、超音波刺激による間葉系幹細胞からの効率的培養法の確立に成功した。

関節面の治療には、軟骨のみでなく骨・軟骨複合組織が有用である。間葉系幹細胞は、骨芽細胞、軟骨細胞双方へ分化可能だが、この分岐には増殖因子、サイトカイン等の関与が知られている。今回MSCを分化させずに移植に用いても、骨部位では移植した細胞が骨様組織に分化しており、また、軟骨部においては、軟骨様組織を呈していた。未分化なMSCを骨軟骨欠損部に移植することで、低侵襲で骨軟骨様組織が作成可能であり、将来臨床的に応用可能と考えられた。

組織工学的手法の重要要素である担体についても、工学あるいは基礎系研究者との共

同研究により、さまざまな新素材の開発が本プロジェクトを通じて進んでいる。たとえば、フォトカルシネーションによるナノ細孔薄膜、シリカ系のMPS膜などであり、後者は、人工体液中でのアパタイト形成能力が優れていることが判明した。一方生体認識機能を発現する糖鎖を高分子材料に結合させることにより、生体適合性・生分解性に優れた細胞培養足場材料の開発を行い、自己組織化単分子膜で表面改質されたシリコンあるいはガラス基板上に、糖鎖高分子を吸着させることにより、一つの基板に異なる分子シグナルを微細提示技術を開発した。さらに、実際の臨床応用を視野に入れた注入型軟骨作製および3次元培養におけるマトリックスの至適材料の検討として、グリコサミノグリカン鎖結合マトリックススキャフォールドの有効性を組織学的、生化学的にも確認した。また、粒子溶出法とバイオメティック法を組み合わせ、炭酸含有アパタイトがセラミックス/ポリマー複合体 CCPC の骨格表面を覆った新規多孔体を作製した。これらの担体の有効性については、今後動物実験レベル、そして前臨床試験と検証が進むと期待される。

D. 考察

近年組織工学的技術を用いた製品開発が世界的に行われているが、本研究分野の製品は未だ開発途中であり、完成品と言われるような製品は創出されていないのが現状である。今後、1000万人ともいわれる重症骨系統疾患が対象となることを考慮すると、本研究の成果は新たな骨再生治療の創出につながると期待しており、ひいては世界的な製品市場の開拓も見込まれる。

注入型人工骨については、本研究期間で臨床的有用性が確認できる段階に達したと考えている。現在は歯科領域への応用であるが、今後

これまでの臨床応用の結果がさまざまな分野の骨再生治療につながるものと期待される。その一方で、より確実に安全な治療にするための努力も必要である。特に、実際に治療として普及するためには、培養方法や細胞供給システムなどに関しても十分な研究を行うべきであろう。

本研究期間中、培養骨膜を用いた骨再生治療についても、一定の有効性が確認された。治療として確立するためには、さらに症例を重ねる必要がある。しかしながら、近年骨膜や滑膜由来細胞の骨形成能の高さが報告されている。骨膜は口腔内からも比較的簡単に採取することが可能で、歯科以外にも応用範囲は広い。様々な細胞源が利用可能になることで、より広い患者が再生治療の恩恵にあずかることができるようになるであろう。

軟骨の再生については、MSCを用いることで骨軟骨欠損の修復が可能であること、さらに移植された細胞が軟骨再生の主役となることが明らかとなった。しかしながら、移植細胞の分化制御や一定の組織厚を維持することなど課題も多い。今後細胞分化に関するさらなる研究と新たな担体との組み合わせで、新規の軟骨再生法の創出が期待される。

E. 結論

本研究課題では、自家あるいは同種の移植に代わりうる、新たな骨、軟骨の再生医療の実用化について研究成果が得られた。幹細胞を応用したトランスレーショナルリサーチは良好な結果を得ており、本研究成果から骨再生については実用化が加速されるものと考えられる。一方、臨床経験や動物実験から新たに見いだされた課題もある。これらの課題については基礎的検討を行い、本研究の目的である組織工学の手法を用いた骨系統疾患患者の治療方法の確立につなげたい。

F. 健康危険情報

本研究において国民の生命、健康に重大な影響を及ぼす事項は発生していない。

G. 研究発表

1. 論文発表

論文発表

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., Nagasaka 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, Boo J.S, Ozawa R, Nagasaka T, Okazaki Y, Hata K, Ueda M. Bone regeneration following injection of mesenchymal stem cells and fibrin glue with a biodegradable scaffold. *J. Cranio-fac. Surg.* 31, 27-33, 2003

H. Maeda, T. Kasuga, M. Nogami, H. Kagami, K. Hata, and M. Ueda: Preparation of Bonelike Apatite Composite Sponge, *Key Engng. Mater.*, 254-256, 497-500 (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., Boo, J.S., Ozawa, R., Nagasaka, T., Okazaki, Y., Hata, K., and Ueda, M. Bone regeneration following injection of mesenchymal stem cells and fibrin glue with a biodegradable scaffold. *J. Cranio-maxillofac. surg.* 31, 27-33, 2003.

Yamada, Y., Itano, N, Narimatsu, H., Kudo, T., Hirohashi, S., Ochiai, A., Iwai, T., Ueda, M., and Kimata, K. CD44 variant exon6 expressions in colon cancer assessed by quantitative analysis using real time reverse transcriptase-polymerase chain reaction. *Oncology Reports*, 10 (6), 1919-1924, 2003.

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.

Ozawa, R., Yamada, Y., Nagasaka, T., and Ueda M.,

A comparison of osteogenesis-related gene expression of mesenchymal stem cells during the osteoblastic differentiation induced Type-I collagen and/or fibronectin, *Int J Oral-Med Sci*, 1, 148-155, 2003.

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, Kzuihiro 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, 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)

Mechanical durability of ultra-water-repellent thin film by microwave plasma-enhanced CVD, *Thin Solid Films*, 457, 122-127 (2004)

UV Raman spectroscopic probing into nitrogen-doped hydrogenated amorphous carbon, *Thin Solid Films*, 457, 128-132 (2004)

Dependence of hybridizations analyzed by XPS and visible Raman spectroscopy on nanohardness and wear resistance of amorphous carbon carbon nitride films, *Diamond Related Mater.*, 13, 507-512 (2004)

(小林 一清)

Yoshihiro Nishida, Hirofumi Dohi, Kazukiyo Kobayashi, "Facile access to cell surface oligosaccharide mimics: Carbohydrate Module Approach", *TIGG* 2004 (in press).

Kazunori Matsuura and Kazukiyo Kobayashi,

"Analysis of GM3-Gg3 Interaction Using Clustered Glycoconjugate Models Constructed from Glycolipid Monolayers and Artificial Glycoconjugate Polymers" *Glycoconjugate J.*, 21, 139-148 (2004).

(木全 弘治)

K. Nogami, H. Suzuki, H. Habuchi, N. Ishiguro, H. Iwata, K. Kimata. Distinctive expression patterns of heparan sulfate O-sulfotransferases and regional differences in heparan sulfate structure in chick limb buds. *J Biol Chem* 2004;279:8219-8229.

S. Ashikari-Hada, H. Habuchi, Y. Kariya, N. Itoh, A. H. Reddi, K. Kimata. Characterization of Growth Factor-binding Structures in Heparin/Heparan Sulfate Using an Octasaccharide Library. *J Biol Chem* 2004;279:12346-54.

• 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, MSChiappacassi, 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.

(春日 敏宏)

H. Maeda, T. Kasuga, M. Nogami, H. Kagami, K. Hata, and M. Ueda: Preparation of Bonelike Apatite Composite Sponge, *Key Engng. Mater.*, 254-256, 497-500 (2004).

H. Maeda, T. Kasuga, and M. Nogami: Vaterite / Poly(lactic acid) Composite Biomaterials, *Arch. Biocer. Res.*, 3, 110-113 (2003).

H. Maeda, T. Kasuga, M. Nogami: Preparation of Calcium Carbonate / Poly(lactic acid) Composite (CCPC) Hollow Spheres, *Key Engng. Mater.*, 254-256, 533-536 (2004).

H. Maeda, T. Kasuga, and M. Nogami: Apatite formation on titania-vaterite powders in simulated body fluid, *J. Eur. Ceram. Soc.*, 24, 2125-2130 (2004).

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).

2. 学会発表

Mizuno H., Hata K-I., Wada K., Kogami, H., SOjo K., Ueda M.

82nd General session and exhibition of the IADR
March 10-13, 2004, Hawaii, USA.

A novel approach to regenerating periodontal tissue by cultured periosteum. Mizuno H., Hata K-I., Wada K., Kogami, H., Ueda M.

各務秀明, 本田雅規, 安藤由典, 上田実

歯および歯胚由来細胞を用いた再生医療とその可能性

シンポジウムー7ー1

歯, 歯周組織, 顎骨の再生に向けて

第3回日本再生医療学会総会 2004.3.23-25
千葉 幕張メッセ

Hideaki Kagami

Symposium III 「Tissue Engineering」 6th Asian Congress on Oral and maxillofacial Surgery
10/20-23/2004 Chiba, Japan

Kagami H

Tissue engineering as a tool to regenerate oral and maxillofacial tissues

Joint Meeting of the Tissue Engineering Society International and the European Tissue Engineering Society 10/10-13,2004 Lausanne, Switzerland

Yamada, Y., Fujimoto, A., Ozawa, R., Ito, K., and Ueda, M. Cluster analysis and gene expression profile between mesenchymal stem cells (MSCs) and Dentin pulp stem cells (DPSCs). International Association for Dental Research (82nd General session & Exhibition of IADR), Honolulu, America, 2004. 3.10-13

Ito, K., Yamada, Y., Baba, H., Hibi, H., Ozawa, R., Takahashi, M., Ohya, M., Sojo, K., Kinoshita, K., and Ueda, M. Mechanical properties of tissue-engineered bone using MSCs and PRP. International Association for Dental Research (82nd General session & Exhibition of IADR), Honolulu, America, 2004. 3.10-13

日比英晴, 木下一彦, 菱田純代, 西口浩明, 山田陽一, 上田 実. 創内型多方向性骨延長装置の下顎骨区域欠損への適応. 第58回日本口腔科学会総会. 横浜, 2004.5.7-8.

山田陽一, 古市保志, 伊藤憲治, 山本松男, 馬場俊輔, 日比英晴, 和泉雄一, 上田実. 未分化間葉系幹細胞、多血小板血漿を応用した注入型

による歯周組織再生療法：一基礎研究から臨床応用へのトランスレーショナルリサーチ，第 47 回日本歯周病学会春季学術大会。鹿児島，2004.5.21-22.

山田陽一，上田 実。間葉系幹細胞を応用した骨、歯周組織再生医療－基礎研究から臨床応用へのトランスレーショナルリサーチ，第 7 回日本組織工学会，シンポジウム；皮膚・眼・歯周，東京，2004.7.2

Ohya, M., Yamada, Y., Ozawa, R., Ito, K., Takahashi, M., Kagami, H., Hibi, H., Hata, K-I and Ueda M. Maxillary sinus augmentation in rabbits: A comparative histologic-histomorphometric study between mesenchymal stem cells and autogenous bone. 13th annual scientific meeting of European association for osseointegration, Paris, France, 2004, 9.16-18.

山田陽一，上田 実，小澤亮太郎，伊藤憲治，大屋盛道，高橋 誠，日比英晴，馬場俊輔。トランスレーショナルリサーチの概念による基礎研究に基づいた注入型培養骨の臨床応用とその特徴，第 34 回日本口腔インプラント学会総会。大阪，2004.9.24-26.

日比英晴，山田陽一，木下一彦，小澤亮太郎，大屋盛道，伊藤憲治，高橋 誠，各務秀明，上田 実。

骨延長法への間葉系幹細胞移植の応用。第 34 回日本口腔インプラント学会総会。大阪，2004.9.24-26

Yamada, Y., Hibi, H., Ozawa, R., Ito, K., Ohya, M., Takahashi, M., Kagami, H., and Ueda, M. The various possibilities of injectable tissue-engineered bone (the application for dental implants, periodontitis, distraction osteogenesis, and residual alveolar cleft. 6th Asian Congress on Oral and Maxillofacial Surgery. 49th Annual Meeting of Japanese Society of Oral and Maxillofacial Surgeons,

Tokyo, Japan, 2004. 10.20-23.

Hibi, H., Yamamoto, N., Oda, T., Yamada, Y., Kagami, H., Tohnai, I., and Ueda, M. Mandibular reconstruction using multidirectional internal distraction device. 6th Asian Congress on Oral and Maxillofacial Surgery. 49th Annual Meeting of Japanese Society of Oral and Maxillofacial Surgeons, Tokyo, Japan, 2004. 10.20-23.

山田陽一，上田 実，日比英晴，各務 秀明。注入型培養骨を用いた顎顔面領域再生への挑戦：インプラント、歯周病、骨延長、顎裂部骨移植への応用，第 4 回日本再生医療学会総会。大阪，2005.3.10-12.

山田陽一、上田 実。ティッシュエンジニアリングコンセプトに基づいた歯槽骨と歯周組織の再生，第 52 回国際歯科研究学会日本部会（JADR）総会・学術大会，シンポジウム；歯科領域における再生医療の最近の進歩，東京，2004.11.27-28.

Yamada, Y., Hibi, H., Yajima, A., Ito, K., Ohya, M., Ozawa, R., Takahashi, M., Nagasaka, T., and Ueda, M. The clinical application of tissue-engineered bone using mesenchymal stem cells (MSCs) and platelet-rich plasma (PRP) on basis of basic experimental research. Academy of osseointegration, Orland, FL, USA, 2005. 3.10-12.

Hibi, H., Yamada, Y., Kinishita, K., Ozawa, R., Ohya, M., Ito, K., Takahashi, M., Kagami, H., and Ueda, M. Distraction osteogenesis assisted with injection of tissue-engineered osteogenic material. Academy of osseointegration, Orland, FL, USA, 2005. 3.10-12.

Yamada, Y., Ueda, M., Naiki, T., Ito, K., Ozawa, R., Hibi, H., Kagami H, and Baba, S. Injectable tissue-engineered bone regeneration for osseointegrated dental implants: clinical and basic

approach. European association for osseointegration 12th annual scientific congress, Vienna, Austria, 2003. 10.9-11

Ozawa, R., Yamada, Y., Nagasaka, T., Baba, S., Hata, K-I, and Ueda, M. Injectable bone regeneration with mesenchymal stem cells and fibrin glue with a biodegradable scaffold. European association for osseointegration 12th annual scientific congress, Vienna, Austria, 2003. 10.9-11

山田陽一, 日比英晴, 小澤亮太郎, 伊藤憲治, 大屋盛道, 高橋 誠, 木下一彦, 長坂徹郎, 各務秀明, 岡崎恭宏, 畠賢一郎, 馬場俊輔, 上田実. 注入型培養骨による骨再生医療—基礎研究から臨床応用に関するトランスレーショナルリサーチ—, 第48回日本口腔外科学会総会. 富山, 2003.10.23-24.

Yamada, Y., Ueda, M., Naiki, T., Ito, K., Hibi, H., and Baba, S. Translational research as for injectable tissue-engineered bone regeneration: from basic research to clinical approach. The 6th Conference of Asia-Pacific International Molecular Biology Network (A-IMBN) 2003, Tokyo, Japan, 2003. 11.12-13

Hibi, H., Kinoshita, K., Hishida, S., Nishiguchi, H., Yamada, Y., and Ueda. New internal and multidirectional distractor for the treatment of mandibular segmental defect. 7th European craniofacial congress, Italy, 2003.11.19-22

Yamada, Y., Fujimoto, A., Ozawa, R., Ito, K., and Ueda, M. Cluster analysis and gene expression profile between mesenchymal stem cells (MSCs) and Dentin pulp stem cells (DPSCs). International Association for Dental Research (82nd General session & Exhibition of IADR), Honolulu, America, 2004. 3.10-13

Ito, K., Yamada, Y., Baba, H., Hibi, H., Ozawa, R., Takahashi, M., Ohya, M., Sojo, K., Kinoshita, K.,

and Ueda, M. Mechanical properties of tissue-engineered bone using MSCs and PRP. International Association for Dental Research (82nd General session & Exhibition of IADR), Honolulu, America, 2004. 3.10-13

G. 知的財産権の出願・登録状況(予定を含む。)

特許出願

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」

特願 2003-98989 人工軟骨

特願 2003-291078 硬組織の再生

特願 2004-097644 「組織または器官再生用材料」

特願 2004-317241 「骨又は歯周組織形成用組成物」

特願 2003-346976 培養骨膜パッケージ、及びその調製方法

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

(1) 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

(2) 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

特願 2003-046060 号

「細胞培養方法」

特願 2003-78964 号

「医用材料」

特願 2003-73808 号

「細胞培養方法及び細胞シート」

特願 2003-136336 号

「細胞培養方法及び培養組織」

2. 実用新案登録

なし

3. その他

特になし

厚生科学研究費補助金（ヒトゲノム・再生医療等研究事業）

分担研究報告書

歯周組織再建のための基礎研究および臨床応用

分担研究者 各務 秀明 名古屋大学医学部組織工学講座 助教授

研究要旨

われわれは、重度歯周疾患に対する治療法の開発を中心に、新たな骨再生のための手段として培養骨膜による骨再生研究を行っている。これまでの結果から、ヒト、イヌおよびウシの骨膜より作成した培養骨膜シートは、nativeな骨膜と同様の形態学的、生化学的性状を示し、高い骨形成能を持つことを報告してきた。また、*in vivo*においてはイヌ歯周組織に形成された欠損に対し、3ヶ月で歯槽骨および歯周組織の再生が認められる。本研究期間中は、基礎的検討として非脱灰標本を用いて歯周組織の再生についての検討を行った。また、臨床症例として、口唇口蓋裂の術後に起こった口腔鼻腔漏孔の閉鎖術および歯周疾患への応用を開始し、培養骨膜シートの臨床的有用性を検討した。さらに、培養骨膜シートの臨床的有用性を高めるために、凍結保存条件の検討と最適化に関する研究を行った。

A.研究目的

骨膜組織片を適当な条件下において培養すると膜状の構造物を形成することが知られている。一方骨が新生する際には、骨髄中の骨芽細胞のみでなく、骨膜からも骨形成が起こることが知られている。これまでの骨再生研究は、主として骨髄中に存在する骨芽細胞あるいは幹細胞由来の骨芽細胞をターゲットとした研究が行われており、骨膜由来の細胞を用いた骨の再生については十分検討されてこなかった。

一方歯科において歯周疾患（歯槽膿漏）は重要な課題であり、中、高齢者において歯牙を失う主たる原因となっている。しかしながら、重度の歯周疾患に対して、失われた歯周組織を再生する効果的な方法はないのが現状である。近年軽度あるいは中重度の歯周組織を再生する方法として、ゴアテックスなどの人工物の膜を利用する方法が

行われている（GTR法）。これは歯周組織の欠損部に膜を置くことで、上皮の侵入を抑制し、骨の自発的な再生を期待する治療法である。しかしながら、膜の除去が必要であることや、人工物であるために感染などの問題を起こすことも少なくない。また、当然のことながら膜自体に骨形成能はない。われわれのプロジェクトでは、この培養骨膜を用いて、歯槽骨を中心とした骨再生研究を行い、その有用性を報告してきた。これまでの研究で歯槽骨の再生については明らかになっているが、脱灰標本やX線を用いた解析では、歯と歯槽骨を連結している歯根膜をはじめとした歯周組織の再生については十分明らかではなかった。本研究期間では、まず基礎的検討として、培養骨膜によって再生された歯根膜組織について非脱灰標本を用いて解析した。一方、本治療法についてはすでに名古屋大学医学部の倫

理委員会にて承認を受けている。これまでの臨床応用とその経過についても検討を行った。培養骨膜シートを作製する場合には、通常下顎骨臼歯部歯槽部から採取する。採取された細胞を培養後に患部に使用するが、複数の歯周疾患を有する患者では一度にすべての部位に使用することができない。したがって、培養骨膜シートを凍結保存することができれば、採取回数を増やすことなく必要な時に利用できる。しかしながら、培養骨膜シートは約20層の細胞からなる比較的厚い構造であり、培養表皮シートや表皮、角膜などのすでに確立された凍結保存方法が適当であるか検討されたことはない。本研究では、培養骨膜シートの凍結保存の可能性、および至適凍結保存条件についても検討を加えることとした。

B. 研究方法

ヒト、イヌ、ウシそれぞれの骨膜組織片より培養骨膜（CP）を作製した（図1）。完成したCPのアルカリフォスファターゼ活性、オステオカルシン、オステオポンチン、オステオネクチンなどの各種分化マーカーを指標として、CPの骨形成能を評価した。



図1 培養骨膜

次にイヌを用いて、歯槽骨の再生実験を行った。まず、歯周病による歯槽骨欠損に見

立てた骨欠損を下顎臼歯部に作製し、内部に血漿中の platelet rich plasma (PRP) を充填したのち、ここにCPを従来のGTR法による歯槽骨欠損に準じて膜状のまま移植した。コントロールとしては、PRPのみを移植した群と、PRPおよび従来GTR法に用いられてきたコラーゲン膜を用いた。約3ヶ月の後、標本採取を行い、軟エックス線、マイクロCTによる評価を行った。特に今回は非脱灰切片を作製し、歯根膜を中心とした歯周組織の再生を評価した。

臨床症例については、第1例目では口唇口蓋裂術後に生じた顎裂部の骨欠損を対象とした。また、これまでの方法では治療が困難であった水平的骨欠損を有する重度の歯周疾患2例を対象として臨床効果を調べた。それぞれ名古屋大学医学部の倫理委員会にて承認を得た治療プロトコールに基づいて治療を開始し、経過観察を行った。

凍結保存方法の確立のために、前述のウシ脛骨由来の培養骨膜シートを使用した。凍結保護剤（クライオプロテクタント）としては、DMSO、グリセリン、およびエチレングリコールを用いて、比較検討した。また、厚みのあるシートであることを意識し、凍結保護剤のプレインキュベーション時間、温度、振とうの有無について上記3種類の凍結保護材それぞれとの組み合わせで、凍結融解後の細胞の生存率を調べた。さらに、凍結融解後の培養骨膜シートの機能を確認するために、ラット頭蓋骨欠損モデルを用いて、培養骨膜シートの骨形成能について、それぞれ凍結融解後、およびコントロールとして未凍結シート、シートなしの3群において比較を行った。

（倫理面への配慮）

ヒトの組織採取を行う場合、手術時に余剰となったものを利用することを原則に、該当患者に書面および口頭で十分に説明し同意を得た。さらにこれら説明文、同意書については名古屋大学倫理委員会にて承認されたものを用いた。また、採取したすべての組織については、プライバシーの保護のためドナー情報は秘密にて行うこととした。

C. 研究結果

組織標本および免疫組織化学染色により、CPは性状の骨膜に近い性質を有していることが明らかになった。さらに酵素活性やウエスタンブロットィングによる発現タンパクの解析から、培養骨膜は正常骨膜を超える骨形成能を持つ可能性が示唆された。イヌ歯周組織欠損に対する実験からは約3ヶ月にてCP移植群では歯槽骨の再生が認められた(図2)。

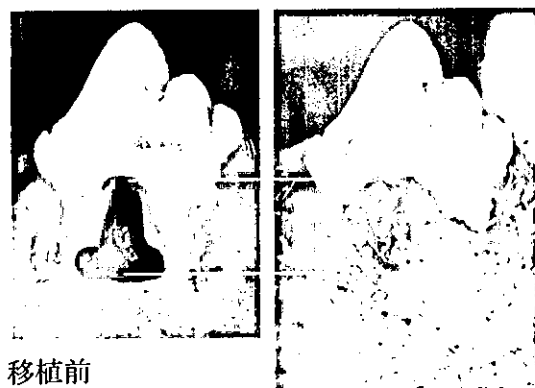


図2 培養骨膜による歯周組織の再生

再生骨は、根分岐部のみではなく、側面の露出した根の表面まで完全に被覆していた。また、マイクロCTでは歯根と歯槽骨間には一層の軟組織が介在していることが明らかであったが、非脱灰組織標本により、再生骨と根表面の間には歯周靱帯様の構造の

再生が確認できる箇所も存在した。分岐部では、歯槽骨と新生セメント質との間にシャープー線維が入り込んでおり、骨と歯根とは一定の間隔に保たれていた。これは正常の歯根と歯周組織との関係とほぼ同様であった。



図3 非脱灰標本による評価

臨床応用の経過では、顎裂部の骨欠損に対しては十分な骨再生を認めなかった。これは、欠損部に挿入された β -TCPに対する感染か、あるいは移植された骨膜への栄養供給の問題の可能性が考えられた。

歯周組織への症例については、2例に移植を行った。第1例は43歳女性であり、上顎2-2に水平性の骨吸収、右下7の遠心に垂直性の骨吸収を認めた(図3)。特に上顎前歯部は歯根の2分の1を越える吸収であり、ポケットも10mm以上と重度の歯周疾患であった。

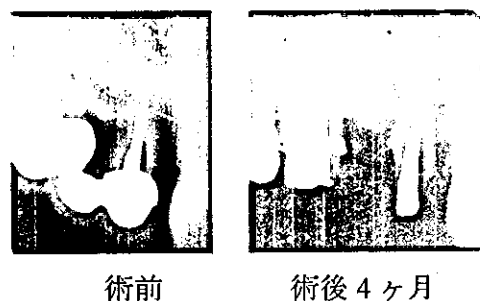


図3 培養骨膜移植症例 x-p

粘膜を剥離し、歯根の清掃を行った後、骨欠損部の歯根表面に培養骨膜を移植した。また、右下7の遠心も骨欠損部の上方に培

養骨膜を置いて、それぞれ粘膜を縫合した。その他の処置は、通常の歯肉剥離搔爬術の処置にしたがった。術後4ヶ月にてx-pにて歯槽骨の再生を認め、ポケットも1mmと大きく改善した。現在術後12ヶ月が経過しているが、再燃は認めていない。また、右下7についても骨の再生を認めている(図4)。



図4 培養骨膜移植症例 x-p (垂直性骨欠損)

第2例は53歳女性であり、上顎前歯部に水平性の骨吸収を認めた。特に骨吸収は唇側で大きく、根尖付近まで欠損を認めた(図5)。

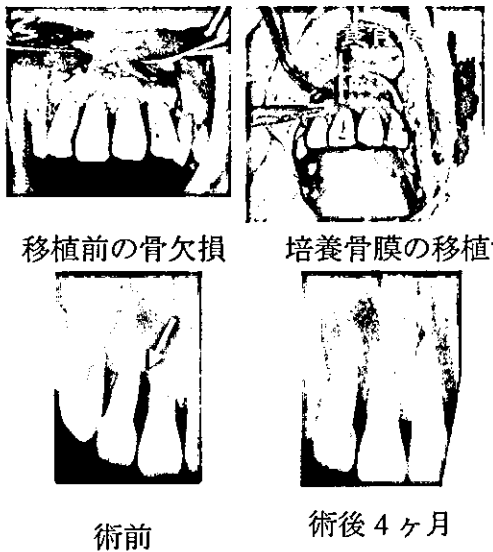


図5 培養骨膜移植症例 水平型骨欠損

歯肉を剥離し、歯根面の清掃後PRPを骨

欠損部に挿入した。次に歯根表面に培養骨膜を置いて粘膜を縫合した。術後4ヶ月のx-pにて歯槽骨の増成を認め、ポケットも消失した(図5)。術後6ヶ月が経過しているが、症状の再燃は認めておらず、経過良好である。

培養骨膜シートの凍結保存方法を、さまざまな条件にて検討した。最適な保存条件は使用する保存剤にて異なるが、DMSOを用いて30分から1時間振とう下、37℃でプレインキュベーションした群でもっとも高い細胞の生存率が得られ、60%以上であった(図6)。一方振とうしない群、長時間インキュベーションした群では生存率は低下した。使用した凍結保存剤間での差は各条件によりことなつたため一定しなかつたが、少なくともグリセロール群では、どの条件においても30%以上の生存率を得ることが困難であった。

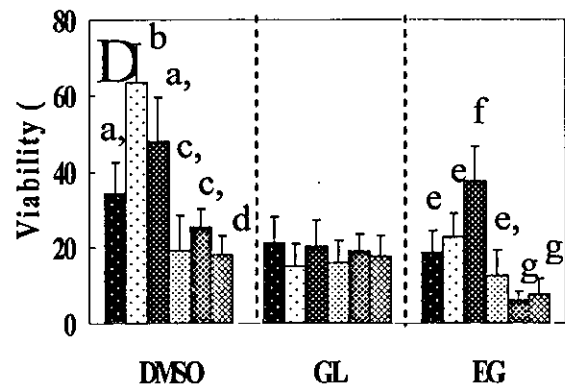


図6 凍結乾燥後の生存率(37℃) 各群左側より10分,30分,1h,3h,6h or 12h(振とう)

解凍後の培養骨膜をラット頭蓋骨欠損モデルに移植した。通常の培養骨膜シートでは、術後6週にて頭蓋骨の閉鎖を認め、何も置かないコントロール群では閉鎖は見られな

かった。凍結融解後の培養骨膜シートを置いた群でも、通常の培養骨膜シートと同様に骨欠損の閉鎖が見られ、凍結保存後も十分な骨形成能をもっていることが明らかになった(図7)。



凍結解凍後 骨欠損のみ
培養骨膜移植 (コントロール群)

図7 ラット頭蓋骨欠損モデル
への培養骨膜移植実験

D. 考察

培養骨膜 (CP) は、これまで用いられてきた間葉系幹細胞と同様に、高い骨形成能を有することが明らかになった。また、歯周組織に応用した場合には、骨形成能を持った生体吸収性GTR膜としての利用が可能と考えられる。臨床的には、従来の再生治療では治癒の得られない水平性の骨欠損を有する歯周病症例など、これまで治療が困難であった症例に対する有効性が示された。今後症例を増やしてデータの蓄積を行うことが必要と考えている。さらに、培養骨膜シートの凍結保存方法を確立したことで、培養骨膜シートの臨床的有用性が高まったと考えている。

E. 結論

培養骨膜 (CP) は骨形成能を有する膜であり、人工材料を含まず、細胞と細胞外マトリックスのみより構成される極めて生体親和性の高い移植材料である。また、本研究により、このCPが歯周病の有効な治療

手段の一つとなりうることが示唆された。臨床応用についても一定の有効性が確認されており、今後有効症例の検討や長期経過について観察を行うことで、歯周病など骨欠損を認める疾患の新たな治療法として確立できるものと期待している。

F. 健康危険情報

本研究において国民の生命、健康に重大な影響を及ぼす事項は発生していません。

G. 研究発表

1. 論文発表

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