

201106007A

別添1

厚生労働科学研究費補助金

再生医療実用化研究事業

「3次元再生軟骨・骨組織における安全性と有効性の確立」に関する研究

平成23年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 高戸 毅

平成24（2012）年 5月

目 次

I. 総括研究報告		
「3次元再生軟骨・骨組織における安全性と有効性の確立」に関する研究	-----	3
高戸 毅		
II. 分担研究報告		
1. 「臨床試験の企画・支援」に関する研究	-----	6
荒川 義弘		
2. 「3次元骨の製造およびデータ収集」に関する研究	-----	7
鄭 雄一		
3. 「3次元皮下軟骨の製造およびデータ収集」に関する研究	-----	9
星 和人		
4. 「3次元関節軟骨の臨床支援」に関する研究	-----	12
吉川 秀樹		
5. 「3次元関節軟骨の製造およびデータ収集」に関する研究	-----	14
中村 憲正		
6. 「再生組織の製造管理・支援」に関する研究	-----	16
名井 陽		
III. 研究成果の刊行に関する一覧表	-----	17
IV. 研究成果の刊行物・別刷	-----	20

厚生労働科学研究費補助金（再生医療実用化研究事業）  
 (総括・分担) 研究報告書

「3次元再生軟骨・骨組織における安全性と有効性」に関する研究

研究代表者 高戸 毅 東京大学大学院医学系研究科 教授

研究要旨 本研究は、3次元再生軟骨、TEC再生関節軟骨、PRP複合3次元骨の医師主導治験を実施し、この再生組織を産業化することを最終目標として、治験開始に必要な品質および安全性の確認（厚生労働省への確認申請）を行い、確認申請承認を受けることを目的としている。

3次元再生軟骨では、ヒト幹細胞臨床研究指針に則った「口唇口蓋裂における鼻変形に対するインプラント型再生軟骨の開発」を実施し（平成23年3月15日大臣同意、同18日機関承認）、ヒトPOC取得に目処をつけた。現在、厚労省の指針により、ヒト幹細胞指針に基づく審査承認をもって、治験における確認申請をスキップし、治験届を提出することが可能となっている。したがって、本研究は確認申請承認に資するものと考え、確認申請承認を目標とした本研究の目的は達成されたと考えられる。

TEC再生関節軟骨では、滑膜MSC由来三次元人工組織(TEC)の安全性試験を行い、移植に伴う安全性の担保を得た。また、間葉系幹細胞を用いた軟骨再生治療の臨床応用に向け、ヒト幹細胞を用いる臨床研究に関する指針へのプロトコールの作成を完成、ヒト幹細胞臨床研究に採択された。

PRP複合3次元骨に関しては、企業主導治験を行うために、医薬品医療機器総合機構(PMDA)において医療機器治験相談を実施し、複数の助言を得た。それらを反映させた、治験実施計画書及び治験機器概要書を作成し、現在治験計画届の提出準備中である。さらに、PRP複合3次元骨の性能を調査するために、他の骨分化誘導因子に対する影響と埋入直後の初期強度解析も併せて実施した。

研究分担者氏名・所属研究機関名・職名

荒川 義弘・東京大学・准教授  
 鄭 雄一・東京大学・教授  
 星 和人・東京大学・特任准教授  
 吉川 秀樹・大阪大学・教授  
 中村 憲正・大阪大学・招聘教授  
 名井 陽・大阪大学・准教授

A. 研究目的

本研究は、3次元再生軟骨、TEC再生関節軟骨、PRP複合3次元骨の医師主導治験を実施し、この再生組織を産業化することを最終目標として、治験開始に必要な品質および安全性の確認（厚生労働省への確認申請）を行い、確認申請承認を受けることを目的としている。

B. 研究方法

3次元再生皮下軟骨の自主臨床研究が、ヒト幹細胞指針に基づき厚生労働省で審議され、平成23年3月18日に承認された。そのため同一プロトコールで実施する治験では、確認申請が免除される。

東大病院口腔外科において、口唇口蓋裂患者の鼻変形(唇裂鼻変形)患者に対して3次元再生皮下軟骨を移植し、自主臨床研究を行う。さらに、この実施体制を生かし、再生軟骨製造体制をGCP、GMP準拠で確立する。自主臨床研究により得られたデータを参考にし、治験届に必要な追加項目を検討・実施する。東京大学医学部治験審査委員会での審議を経て提出する治験届作成をはじめとする医師主導治験実施の手続きを行った。

TEC再生関節軟骨では、ヒト滑膜MSC由来三次元人工組織(TEC)に対し、1. 急性毒性試験、2. 発熱性試験、3. 皮内反応試験、4. 埋植試験、5. 造腫瘍性試験(染色体分析、軟寒天培養試験)を実施した。また、ヒト幹細胞臨床研究申請のためのプロトコール作成、および培養に使用する培地、血清、試薬の安全性のためのデータ収集をおこなった。

PRP複合3次元骨では、テトラポッド型顆粒状人工骨(TB: Tetrabone)に5%トレハロースとクエン酸での表面処理を行った。ラット(雄, 11週齢)から血液を採取し定法によってPRP(platelet rich plasma, 血小板濃縮率: 3~4倍)を調製した。同一個体から採取した自己血清を加えて活性化(脱顆粒)させた後、

TBと混合した。37°Cで1時間静置した後、上清を回収しマウス骨芽様細胞 (MC3T3-E1) に添加した後、細胞増殖活性を評価した。さらに、骨形成因子BMP (Bone Morphogenetic proteins) 2と人工骨を混合した後、同様の方法で上清を採取して、MC3T3-E1細胞に添加し培養した。培養3日後もしくは7日後にアルカリフォスファターゼ (ALP) 染色及びAlp mRNA発現を確認し、骨分化能を評価した。イヌ大腿骨に円筒状貫通欠損 (直径1 cm) を作製し、テトラポッド型人工骨、既存β-TCP製顆粒状人工骨 (β-TCP granules) を埋植した。コントロールとして、人工骨を埋植しない個体も準備した。骨欠損部を採材して直方体状 (14 mm x 14 mm x 8 mm) に切断し、インストロン (3365, Instron社) を用いて強度解析を行い、弾性率を求めた。

(倫理面への配慮)

本研究の動物実験プロトコールに関しては、国の「動物の保護及び管理に関する法律」及び東京大学、大阪大学の大学動物実験実施規則、動物実験実施マニュアルに従い、動物愛護の観点に十分留意して行った。

### C. 研究結果

3次元再生皮下軟骨では、ヒト幹細胞臨床研究指針に則った審議を行い、平成22年3月19日に厚生労働大臣の同意をえて、平成23年度は、ヒト幹細胞臨床研究「ヒト幹細胞臨床研究：口唇口蓋裂における鼻変形に対するインプラント型再生軟骨の開発」を実施した。対象患者は、口唇口蓋裂における鼻変形のうち、隆鼻術および鼻尖形成が必要な、高度な変形を有する患者、目標参加者数は3である。主要評価項目は、重大な有害事象の有無を、指標として安全性を確認すること、副次的評価項目は軟骨再生組織の評価指標を探索的に用いて有効性を確認することである。現在、2例の再生軟骨移植を終了しており、これまで明らかな重大有害事象ない。平成24年夏までに全例の移植を終了する予定である。

TEC再生関節軟骨では、ヒト幹細胞臨床研究へのプロトコールは完成、採択された。特にウシ血清成分残留の評価に関しては追加研究を行い、移植組織には問題のないレベルのタンパク成分残留値が確認された。ヒト滑膜MSC由来三次元人工組織 (TEC) の移植に伴う安全が担保された。

PRP複合3次元骨では、本人工骨における企業主導治験を実施するために、医療機器治験相談を医薬品医療機器総合機構 (PMDA) と行った。「治験デザインに関して」「必要症例数に関して」「エンドポイントとその評価基準に関して」「副次評価項目に関して」の各項目について、それぞれ助言を得た。

「治験デザイン」においては、本人工骨の有効性を証明することを目的とすることを確認し、適切なOPC (Objective Performance control) を設定することが推奨された。「必要症例数」に関しては、治験デザインが確定した後に設定する必要があると考えられた。「エンドポイントとその評価基準」においては、人工骨の有効性を、ある時点での骨再生の程度として説明できるのであれば、適切な方法によって測定されたX線撮像を用いて評価することは可能であると助言された。「副次評価項目」に関しては、骨癒合の状態などの項目に関して評価するのは問題無いとの認識が示された。上記の確認事項をさらに明確するために、再度事前面談を行った。それらの指摘事項を踏まえて、治験実施計画書及び治験機器概要書を作成した。

本人工骨には、PRPに含まれる、骨再生にとって有用な因子の過度な吸着の抑制と徐放の促進のために、特殊な表面処理が行われている。この表面処理が、他の骨再生促進因子にとっても有効性を示すのか、BMP2と本人工骨の併用を試した。人工骨の性能を確認するために、初めにPRPを用いた。PRP溶液に人工骨を浸漬した後、1時間後に上清を回収し、それらを培地に加えてMC3T3細胞を培養した。表面処理をしていない人工骨を用いると、細胞増殖活性は低下するが、表面処理をしている人工骨では、低下した増殖活性は有意に回復した。

次にBMP2について検証した。PRPと同様に、人工骨を浸漬させたBMP2溶液の上清を使用した。MC3T3細胞培養中に上清を添加したところ、3日後では表面処理をしていない人工骨を用いた条件だと、ALPの染色性が低下し、Alpの発現も低下していた。7日後では、そのAlp活性と発現の低下は非常に大きくなっていった。一方で、表面処理を行った人工骨では、わずかではあるが、活性及び発現の有意な回復を確認することが出来た。以上により、本人工骨及びその表面処理法はPRPに限らず様々な骨再生因子にとって有用であることが示唆された。

ビーグル犬大腿骨円筒状欠損を作製し、人工骨を埋植して、骨欠損部を含む、直方体状の骨断片を作製した。強度解析を行ったところ、β-TCP granulesやnegative controlと比較して、本人工骨を埋植した骨切片では、弾性率の有意な上昇が確認された。

### D. 考察

再生医療を取り巻く環境の変化としては、ヒト幹細胞指針に基づく審査承認により、治験における確認申請をスキップし、治験届を提出することが可能となった。(薬食発11013号、平成22年11月1日) さらに、PMDA薬事戦略相談を活用し、PMDAから製品化につなげるための品質および安全性に係る相談への助言・指導が得られるようになった。(薬機発0630007号、平成23年6月30日)

これらにより、本研究は確認申請承認に資するものと考えられた。そのため、確認申請承認を目標とした本研究の目的は達成されたと考えられる。平成23年12月12日、すでにPMDA薬事戦略相談を受けており、治験実施に向けた対応を進めている。

TEC再生関節軟骨では、皮内反応試験、埋植試験ではヒト細胞をウサギに移植する(異種移植)ために弱い、中等度の刺激性ありと判定されたが、自己組織を移植するヒト幹細胞臨床研究では問題がないものと考えた。また、ヒト幹細胞を用いる臨床研究に関する指針に準拠した安全性を担保したプロトコルが完成した。今後、臨床応用を進めていく予定である。

PRP複合3次元骨では、BMP2は人工骨表面に吸着しその活性は低下するが、人工骨の表面処理によってその吸着が抑制されることを示唆している。PRPを用いた場合と同様にBMP2を用いても、表面処理の効果が確認されたことから、本人工骨は様々な骨再生因子との併用に用いることができると考えられる。

直方体状に切断した骨断片の強度解析により、骨欠損部の強度を補強する用途において、本人工骨が既存人工骨よりも優れていることが示された。既存人工骨の骨欠損部への埋植による効果は、埋植しない条件と大きな違いはなかった。現在、既存人工骨の適用は、非荷重部に限定されているが、本人工骨はある程度の荷重がかかる部位(例えば下顎など)にも用いることができると推察される。

#### E. 結論

3次元再生皮下軟骨では、ヒト幹細胞指針に基づく承認により、確認申請をスキップすることが可能となったので、確認申請承認を目標とした本研究の目的は達成されたと考えられる。現在、PMDA薬事戦略相談を受けており、治験実施に向けた対応を進めている。

TEC再生関節軟骨では、滑膜MSC由来三次元人工組織(TEC)の移植に伴う安全性が確認され、TECの臨床応用のためのヒト幹細胞臨床研究プロトコル作成が完成した。

PRP複合3次元骨では、PMDAとの医療機器治験相談を行って様々な指摘を受けた。それらの指摘を踏まえて、治験機器概要書及び治験実施計画書を作成し、現在治験計画届を提出する段階にある。本人工骨が、PRPのみならず、他の骨再生促進因子にも使用することができることを確認した。また、本人工骨が骨欠損部の(ある程度の)補強にも使用することができることを確認した。

#### F. 健康危機情報 特記事項なし。

#### G. 研究発表 〈論文発表〉

1. Tanaka Y, Saijo Y, Fujihara Y, Yamaoka H, Nishizawa S, Nagata S, Ogasawara T, Asawa Y, Takato T, Hoshi K. Evaluation of the implant type tissue-engineered cartilage by scanning acoustic microscopy. J Biosci Bioeng. 2012 Feb;113(2):252-7.

2. Asawa Y, Sakamoto T, Komura M, Watanabe M, Nishizawa S, Takazawa Y, Takato T, Hoshi K. Early-stage Foreign Body Reaction against Biodegradable Polymer Scaffolds Affects Tissue Regeneration during the Autologous Transplantation of Tissue Engineered Cartilage in the Canine Model. Cell Transplant. 2012 Apr 26.

#### 〈学会発表〉

1. Takato T et al. Implant-type tissue-engineered cartilage applied for the nasal correction of the cleft lip and palate patients. 9th European Craniofacial Congress. 14-17 Sep 2011, Salzburg.

2. 高戸 毅:再生医療と医療連携. 口腔医科学会 第15回 学術大会 2011年10月15日 東京

3. 高戸 毅:骨軟骨再生医療の現状と展望. 第70回日本矯正歯科学会大会&第4回国際会議 日本学術会議歯学委員会シンポジウム 2011年10月18日 名古屋

4. Takato T. Implant-type tissue-engineered cartilage applied for the correction of the cleft lip-nose patients. 69th Annual Conference of the Korean Society of Plastic and Reconstructive Surgeons. 11 Nov 2011, Seoul.

5. 高戸 毅:顎顔面領域における骨軟骨再生医療の現状と展望. 第22回日本頭頸部外科学会総会 2012年1月27日 福島

#### H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得  
特に無し
2. 実用新案登録  
特に無し
3. その他

特に無し

厚生労働科学研究費補助金（再生医療実用化研究事業）  
 （総括・分担）研究報告書

「臨床試験の企画・支援」に関する研究

研究分担者 荒川 義弘 東京大学医学部附属病院准教授

研究要旨 本研究は、3次元再生組織を産業化することを最終目標として、治験開始に必要な品質および安全性の確認（厚生労働省への確認申請）を行い、確認申請承認を受けることを目的としている。現在、3次元再生皮下再軟骨などの各シーズにおいて、ヒト幹指針にもとづいた審議が終了し、臨床研究を実施している。そのため確認申請承認に資するものと考えら、確認申請承認を目標とした本研究の目的は達成されたと考えられる。今後は、PMDA薬事戦略相談とも連携し、臨床試験のモニタリングと監査を引き続き支援し、臨床試験の実施を企画、支援する。

A. 研究目的

本研究は、3次元再生軟骨の医師主導治験を実施し、この再生組織を産業化することを最終目標として、治験開始に必要な品質および安全性の確認（厚生労働省への確認申請）を行い、確認申請承認を受けることを目的としている。

B. 研究方法

3次元再生組織の医師主導治験を実施するにあたり、確認申請準備と医師主導治験実施体制の構築支援を行った。

C. 研究結果

3次元再生皮下再軟骨、TEC再生関節軟骨において、ヒト幹指針にもとづいた自主臨床研究の申請手続きを支援し、いずれもヒト幹細胞を用いた臨床研究に関する指針に則った審議を経て、実施許可が下りた。

現在、臨床研究を実施中である。

D. 考察

再生医療を取り巻く環境としては、ヒト幹細胞指針に基づく審査承認により、ヒト幹細胞臨床研究の実施と平行して、今後実施する治験における確認申請をスキップし、治験届を提出することが可能となった。（薬食発 11013 号、平成 22 年 11 月 1 日）さらに、PMDA薬事戦略相談を活用し、PMDAから製品化につなげるための品質および安全性に係る相談への助言・指導が得られるようになった。（薬機発 0630007 号、平成 23 年 6 月 30 日）

これらにより、ヒト幹細胞指針に基づく承認により、確認申請をスキップすることが可能となったので、確認申請承認を目標とした本研究の目的は達成されたと考えられる。

今後は、PMDA 薬事戦略相談とも連携し、臨床試験のモニタリングと監査を引き続き支援し、臨床試験の実施を企画、支援する。

E. 結論

ヒト幹細胞指針に基づく承認により、確認申請をスキップすることが可能となったので、確認申請承認を目標とした本研究の目的は達成されたと考えられる。

今後は、臨床試験のモニタリングと監査を引き続き支援し、臨床試験の実施を企画、支援する。

F. 健康危機情報

総括研究報告書参照。

G. 研究発表

なし

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得  
特に無し
2. 実用新案登録  
特に無し
3. その他  
特に無し

「3次元骨の製造およびデータ収集」に関する研究

研究分担者 鄭 雄一 東京大学大学院工学系研究科 教授

研究要旨 企業主導治験を行うために、医薬品医療機器総合機構 (PMDA) において医療機器治験相談を実施し、複数の助言を得た。それらを反映させた、治験実施計画書及び治験機器概要書を作成し、現在治験計画届の提出準備中である。さらに、PRP複合3次元骨の性能を調査するために、他の骨分化誘導因子に対する影響と埋入直後の初期強度解析も併せて実施した。

A. 研究目的

PRP3次元骨の有効性・安全性に関するエビデンスを揃え、製造体制を確立することを目的とする。

B. 研究方法

テトラポッド型顆粒状人工骨 (TB: Tetrabone) に5%トレハロースとクエン酸での表面処理を行った。

ラット (雄, 11週齢) から血液を採取し定法によってPRP (platelet rich plasma, 血小板濃縮率: 3~4倍) を調製した。同一個体から採取した自己血清を加えて活性化 (脱顆粒) させた後、TBと混合した。37°Cで1時間静置した後、上清を回収しマウス骨芽様細胞 (MC3T3-E1) に添加した後、細胞増殖活性を評価した。さらに、骨形成因子BMP (Bone Morphogenetic proteins) 2と人工骨を混合した後、同様の方法で上清を採取して、MC3T3-E1細胞に添加し培養した。培養3日後もしくは7日後にアルカリフォスファターゼ (ALP) 染色及びAlp mRNA発現を確認し、骨分化能を評価した。

イヌ大腿骨に円筒状貫通欠損 (直径1 cm) を作製し、テトラポッド型人工骨、既存β-TCP製顆粒状人工骨 (β-TCP granules) を埋植した。コントロールとして、人工骨を埋植しない個体も準備した。骨欠損部を採材して直方体状 (14 mm x 14 mm x 8 mm) に切断し、インストロン (3365, Instron社) を用いて強度解析を行い、弾性率を求めた。

(倫理面への配慮)

本研究の動物実験プロトコールに関しては、国の「動物の保護及び管理に関する法律」及び東京大学動物実験実施規則、東京大学動物実験実施マニュアルに従い、動物愛護の観点に十分留意して行った。

C. 研究結果

本人工骨における企業主導治験を実施するために、医療機器治験相談を医薬品医療機器総合機構 (PMDA) と行った。「治験デザインに関して」「必要症例数に関して」「エンドポイントとその評価基準に関して」「副次評価項目に関して」の各項目について、それぞれ助言を得た。

「治験デザイン」においては、本人工骨の有効性を証明することを目的とすることを確認し、適切なOPC (Objective Performance control) を設定することが推奨された。「必要症例数」に関しては、治験デザインが確定した後に設定する必要があると考えられた。

「エンドポイントとその評価基準」においては、人工骨の有用性を、ある時点での骨再生の程度として説明できるのであれば、適切な方法によって測定されたX線撮像を用いて評価することは可能であると助言された。「副次評価項目」に関しては、骨癒合の状態などの項目に関して評価するのは問題無いとの認識が示された。上記の確認事項をさらに明確するために、再度事前面談を行った。それらの指摘事項を踏まえて、治験実施計画書及び治験機器概要書を作成した。

本人工骨には、PRPに含まれる、骨再生にとって有用な因子の過度な吸着の抑制と徐放の促進のために、特殊な表面処理が行われている。この表面処理が、他の骨再生促進因子にとっても有効性を示すのか、BMP2と本人工骨の併用を試した。人工骨の性能を確認するために、初めにPRPを用いた。PRP溶液に人工骨を浸漬した後、1時間後に上清を回収し、それらを培地に加えてMC3T3細胞を培養した。表面処理をしてない人工骨を用いると、細胞増殖活性は低下するが、表面処理をしている人工骨では、低下した増殖活性は有意に回復した (図1)。

次にBMP2について検証した。PRPと同様に、人工骨を浸漬させたBMP2溶液の上清を使用した。MC3T3細胞培養中に上清を添加したところ、3日後では表面処理をしていない人工骨を用いた条件だと、ALPの染色性が低下し、Alpの発現も低下していた(図2)。7日後では、そのAlp活性と発現の低下は非常に大きくなっていた(図2)。一方で、表面処理を行った人工骨では、わずかではあるが、活性及び発現の有意な回復を確認することが出来た(図2)。以上により、本人工骨及びその表面処理法はPRPに限らず様々な骨再生因子にとって有用であることが示唆された。ビーグル犬大腿骨円筒状欠損を作製し、人工骨を埋植して、骨欠損部を含む、直方体状の骨断片を作製した。強度解析を行ったところ、 $\beta$ -TCP granulesやnegative controlと比較して、本人工骨を埋植した骨切片では、弾性率の有意な上昇が確認された(図3)。

#### D. 考察

本研究においては、BMP2は人工骨表面に吸着しその活性は低下するが、人工骨の表面処理によってその吸着が抑制されることを示唆している。PRPを用いた場合と同様にBMP2を用いても、表面処理の効果が確認されたことから、本人工骨は様々な骨再生因子との併用に用いることができると思われる。

直方体状に切断した骨断片の強度解析により、骨欠損部の強度を補強する用途において、本人工骨が既存人工骨よりも優れていることが示された。既存人工骨の骨欠損部への埋植による効果は、埋植しない条件と大きな違いは無かった。現在、既存人工骨の適用は、非荷重部に限定されているが、本人工骨はある程度の荷重がかかる部位(例えば下顎など)にも用いることができると推察される。

#### E. 結論

PMDAとの医療機器治験相談を行って様々な指摘を受けた。それらの指摘を踏まえて、治験機器概要書及び治験実施計画書を作成し、現在治験計画届を提出する段階にある。本人工骨が、PRPのみならず、他の骨再生促進因子にも使用することができることを確認した。また、本人工骨が骨欠損部の(ある程度の)補強にも使用することができることを確認した。

#### F. 健康危機情報

総括研究報告書参照。

#### G. 研究発表

1. Choi S, Liu I-l, Yamamoto K, Igawa K, Mochizuki M, Sakai T, Echigo R, Honnami M, Suzuki S, Chung UI, and Sasaki N, Development and evaluation of tetrapod-shaped granular artificial bones. *Acta Biomater*, 2012, 8:2340-2347.

2. Choi S, Lee J, Igawa K, Suzuki S, Mochizuki M, Nishimura R, Chung UI, Sasaki N. Effect of trehalose coating on basic

fibroblast growth factor release from tailor-made artificial bone implant. *J Vet Med Sci*, 2011, 73:1547-1552.

3. Yonezawa T, Lee J, Hibino A, Asai M, Hojo H, Ha B, Teruya T, Nagai K, Chung U, Yagasaki K, Woo J. Harmine promotes osteoblast differentiation through bone morphogenetic protein signaling. *Biochem Biophys Res Commun*, 2011, 409:260-265.

#### H. 知的財産権の出願・登録状況 特に無し

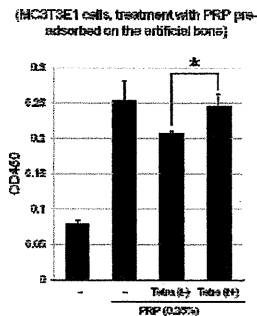


図1 PRPによる細胞増殖活性の増加

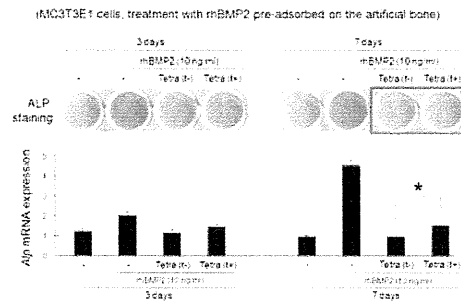


図2 ALP染色及びAlp発現

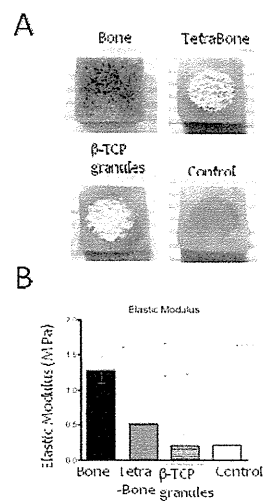


図3 直方体骨断片の弾性率  
(A) 骨欠損部と骨断片 (B) 弾性率



「3次元皮下軟骨の製造およびデータ収集」に関する研究

研究分担者 星 和人 東京大学大学院医学系研究科 特任准教授

研究要旨 本研究は、3次元再生軟骨を産業化することを最終目標として、治験開始に必要な品質および安全性の確認（厚生労働省への確認申請）を行い、確認申請承認を受けることを目的としている。最終年度である本年度は、ヒト幹細胞臨床研究指針に則った「口唇口蓋裂における鼻変形に対するインプラント型再生軟骨の開発」を実施し（平成23年3月15日大臣同意、同18日機関承認）、ヒトPOC取得に目処をつけた。現在、厚労省の指針により、ヒト幹細胞指針に基づく審査承認をもって、治験における確認申請をスキップし、治験届を提出することが可能となっている。したがって、本研究は確認申請承認に資するものと考えら、確認申請承認を目標とした本研究の目的は達成されたと考えられる。

A. 研究目的

本研究は、3次元再生軟骨の医師主導治験を実施し、この再生組織を産業化することを最終目標として、治験開始に必要な品質および安全性の確認（厚生労働省への確認申請）を行い、確認申請承認を受けることを目的としている。

B. 研究方法

3次元再生皮下軟骨の自主臨床研究が、ヒト幹指針に基づき厚生労働省で審議され、平成23年3月18日に承認された。そのため同一プロトコルで実施する治験では、確認申請が免除される。東大病院口腔外科において、口唇口蓋裂患者の鼻変形（唇裂鼻変形）患者に対して3次元再生皮下軟骨を移植し、自主臨床研究を行う。さらに、この実施体制を生かし、再生軟骨製造体制をGCP、GMP準拠で確立する。自主臨床研究により得られたデータを参考にし、治験届に必要な追加項目を検討・実施する。東京大学医学部治験審査委員会での審議を経て提出する治験届作成をはじめとする医師主導治験実施の手続きを行う。

（倫理面への配慮）

動物実験は、国の「動物の保護及び管理に関する法律」及び東京大学動物実験実施規則、東京大学動物実験実施マニュアルに従い、動物愛護の観点に十分留意して行った

C. 研究結果

ヒト幹細胞臨床研究指針に則った審議を行い、平成23年3月19日に厚生労働大臣の同意をえて、平成24年度は、ヒト幹細胞臨床研究「ヒト幹細胞臨床研究：口唇口蓋裂における鼻変形に対するインプラント型再生軟骨の開発」を実施した。対象患者は、口唇口蓋裂における鼻変形のうち、隆鼻術および鼻尖形成が必要な、高度な変形を有する患者、目標参加者数は3である。主要評価項目は、重大な有害事象の有無を、指標として安全性を確認すること、副次的評価項目は軟骨再生組織の評価指標を探索的に用いて有効性を確認することである。

現在、2例の再生軟骨移植を終了しており、これまで明らかな重大有害事象ない。平成24年夏までに全例の移植を終了する予定である。

D. 考察

再生医療を取り巻く環境の変化としては、ヒト幹細胞指針に基づく審査承認により、治験における確認申請をスキップし、治験届を提出することが可能となった。（薬食発11013号、平成22年11月1日）さらに、PMDA薬事戦略相談を活用し、PMDAから製品化につなげるための品質および安全性に係る相談への助言・指導が得られるようになった。（薬機発0630007号、平成23年6月30日）

これらにより、本研究は確認申請承認に資するものと考えられた。そのため、確認申請承認を目標とした本研究の目的は達成されたと考えられる。平成23年12月12日、すでにPMDA薬事戦略相談を受けており、治験実施に向けた対応を進めている。

E. 結論

ヒト幹細胞指針に基づく承認により、確認申請をスキップすることが可能となったので、確認申請承認を目標とした本研究の目的は達成されたと考えられる。現在、PMDA薬事戦略相談を受けており、治験実施に向けた対応を進めている。

F. 健康危機情報

総括研究報告書参照。

G. 研究発表

<論文発表>

1. Tanaka Y, Saijo Y, Fujihara Y, Yamaoka H, Nishizawa S, Nagata S, Ogasawara T, Asawa Y, Takato T, Hoshi K. Evaluation of the implant type tissue-engineered cartilage by scanning acoustic microscopy. *J Biosci Bioeng.* 2012 Feb;113(2):252-7.
2. Asawa Y, Sakamoto T, Komura M, Watanabe M, Nishizawa S, Takazawa Y, Takato T, Hoshi K. Early-stage Foreign Body Reaction against Biodegradable Polymer Scaffolds Affects Tissue Regeneration during the Autologous Transplantation of Tissue Engineered Cartilage in the Canine Model. *Cell Transplant.* 2012 Apr 26.
3. Ikegami D, Akiyama H, Suzuki A, Nakamura T, Nakano T, Yoshikawa H, Tsumaki N. Sox9 sustains chondrocyte survival and hypertrophy in part through Pik3ca-Akt pathways. *Development.* 2011 Apr;138(8):1507-19.
4. Nakura A, Higuchi C, Yoshida K, Yoshikawa H. PKC $\alpha$  suppresses osteoblastic differentiation. *Bone.* 2011 Mar 1;48(3):476-84.
5. Outani H, Okada M, Hiramatsu K, Yoshikawa H, Tsumaki N. Induction of chondrogenic cells from dermal fibroblast culture by defined factors does not involve a pluripotent state. *Biochem Biophys Res Commun.* 2011 Aug 5;411(3):607-12.
6. Sugita A, Kawai S, Hayashibara T, Amano A, Ooshima T, Michigami T, Yoshikawa H, Yoneda T. Cellular ATP synthesis mediated by type III sodium-dependent phosphate transporter Pit-1 is critical to chondrogenesis. *J Biol Chem.* 2011 Jan 28;286(4):3094-103.
7. Tao H, Okamoto M, Nishikawa M, Yoshikawa H, Myoui A. P38 mitogen-activated protein kinase inhibitor, FR167653, inhibits parathyroid hormone related protein-induced osteoclastogenesis and bone resorption. *PLoS One.* 2011;6(8):e23199.

8. Yoshida K, Higuchi C, Nakura A, Yoshikawa H. Spleen tyrosine kinase suppresses osteoblastic differentiation through MAPK and PKC $\alpha$ . *Biochem Biophys Res Commun.* 2011 Aug 12;411(4):774-9.
9. Tanaka Y, Shino K, Horibe S, Nakamura N, Nakagawa S, Mae T, Otsubo H, Suzuki T, Nakata K. Triple-bundle ACL grafts evaluated by second-look arthroscopy. *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc.* 2012 Jan;20(1):95-101.
10. Gobbi A, Mahajan V, Karnatzikos G, Nakamura N. Single- versus double-bundle ACL reconstruction: is there any difference in stability and function at 3-year followup? *Clin Orthop Relat Res.* 2012 Mar;470(3):824-34.
11. Shino K, Mae T, Nakamura N. Surgical technique: revision ACL reconstruction with a rectangular tunnel technique. *Clin Orthop Relat Res.* 2012 Mar;470(3):843-52.
12. Nakamura N, Takeuchi R, Sawaguchi T, Ishikawa H, Saito T, Goldhahn S. Cross-cultural adaptation and validation of the Japanese Knee Injury and Osteoarthritis Outcome Score (KOOS). *J Orthop Sci.* 2011 Sep;16(5):516-23.
13. Kita K, Horibe S, Toritsuka Y, Nakamura N, Tanaka Y, Yonetani Y, Mae T, Nakata K, Yoshikawa H, Shino K. Effects of medial patellofemoral ligament reconstruction on patellar tracking. *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc.* 2012 May;20(5):829-37.

<学会発表>

1. Takato T et al. Implant-type tissue-engineered cartilage applied for the nasal correction of the cleft lip and palate patients. 9th European Craniofacial Congress. 14-17 Sep 2011, Salzburg.
2. Hoshi et al. DEVELOPMENT OF IMPLANT-TYPE TISSUE-ENGINEERED CARTILAGE APPLIED FOR THE CORRECTION OF THE CLEFT LIP-NOSE PATIENTS. TERMIS-AP 2011 3-5 Aug 2011. Singapore.
3. Hoshi et al. Development of implant-type tissue-engineered cartilage applied for the nasal correction of the cleft lip and palate patients. 9th European Craniofacial Congress. 14-17 Sep 2011, Salzburg.
4. 星 和人:足場素材導入による軟骨再生医療の新展開—唇裂鼻変形に対するインプラント型再生軟骨による治療 第56回日本口腔外科学会総会「最新の臨床研究」 2011年10月22日 大阪

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

特に無し

2. 実用新案登録

特に無し

3. その他

特に無し

「3次元関節軟骨の臨床支援」に関する研究

研究分担者 吉川 秀樹 大阪大学大学院医学系研究科 教授

研究要旨 間葉系幹細胞を用いた軟骨再生治療の臨床応用に向け、ヒト幹細胞を用いる臨床研究に関する指針へのプロトコールの作成を完成、ヒト幹細胞臨床研究に採択された。

A. 研究目的

滑膜間葉系幹細胞由来人工組織(TEC)の臨床応用へ向け、ヒト幹細胞を用いる臨床研究に関する指針へのプロトコールを完成させることである。

B. 研究方法

ヒト幹細胞臨床研究申請のためのプロトコール作成、および培養に使用する培地、血清、試薬の安全性のためのデータ収集をおこなった。

(倫理面への配慮)

ヘルシンキ宣言に基づく倫理的原則に留意、「ヒト幹細胞を用いる臨床研究に関する指針」を遵守

C. 研究結果

ヒト幹細胞臨床研究へのプロトコールは完成、採択された。特にウシ血清成分残留の評価に関しては追加研究を行い、移植組織には問題のないレベルのタンパク成分残留値が確認された。

D. 考察

ヒト幹細胞を用いる臨床研究に関する指針に準拠した安全性を担保したプロトコールが完成した。今後、臨床応用を進めていく予定である。

E. 結論

TECの臨床応用のためのヒト幹細胞臨床研究プロトコール作成が完成した。

F. 健康危機情報

総括研究報告書参照。

G. 研究発表

<論文発表>

1. Ikegami D, Akiyama H, Suzuki A, Nakamura T, Nakano T, Yoshikawa H, Tsumaki N. Sox9 sustains chondrocyte survival and hypertrophy in part through Pik3ca-Akt pathways. *Development*. 2011 Apr;138(8):1507-19.
2. Nakura A, Higuchi C, Yoshida K, Yoshikawa H. PKC $\alpha$  suppresses osteoblastic differentiation. *Bone*. 2011 Mar 1;48(3):476-84.
3. Outani H, Okada M, Hiramatsu K, Yoshikawa H, Tsumaki N. Induction of chondrogenic cells from dermal fibroblast culture by defined factors does not involve a pluripotent state. *Biochem Biophys Res Commun*. 2011 Aug 5;411(3):607-12.
4. Sugita A, Kawai S, Hayashibara T, Amano A, Ooshima T, Michigami T, Yoshikawa H, Yoneda T. Cellular ATP synthesis mediated by type III sodium-dependent phosphate transporter Pit-1 is critical to chondrogenesis. *J Biol Chem*. 2011 Jan 28;286(4):3094-103.
5. Tao H, Okamoto M, Nishikawa M, Yoshikawa H, Myoui A. P38 mitogen-activated protein kinase inhibitor, FR167653, inhibits parathyroid hormone related protein-induced osteoclastogenesis and bone resorption. *PLoS One*. 2011;6(8):e23199.
6. Yoshida K, Higuchi C, Nakura A, Yoshikawa H. Spleen tyrosine kinase suppresses osteoblastic differentiation through MAPK and PKC $\alpha$ . *Biochem Biophys Res Commun*. 2011 Aug 12;411(4):774-9.

<学会発表>

Ortopaedic research society (1月)

International Cartilage Repair

Society (9月)

日本整形外科基礎学術集会 (10月)

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

特に無し

2. 実用新案登録

特に無し

3. その他

特に無し

「3次元関節軟骨の製造およびデータ収集」に関する研究

研究分担者 中村 憲正 大阪大学床医工学融合研究教育センター 招聘教授

研究要旨 滑膜MSC由来三次元人工組織 (TEC) の安全性試験を行い。移植に伴う安全性の担保を得た。

A. 研究目的  
滑膜MSC由来三次元人工組織 (TEC) の移植に伴う安全性を検討する。

B. 研究方法  
ヒト滑膜MSC由来三次元人工組織 (TEC) に対し、  
1. 急性毒性試験、2. 発熱性試験、3. 皮内反応試験、4. 埋植試験、5. 造腫瘍性試験 (染色体分析、軟寒天培養試験) を実施した。  
(倫理面への配慮)  
ヘルシンキ宣言に基づく倫理的原則に留意、「ヒト幹細胞を用いる臨床研究に関する指針」を遵守

C. 研究結果  
移植に伴う安全が担保された。

D. 考察  
皮内反応試験、埋植試験ではヒト細胞をウサギに移植する (異種移植) ために弱い、中等度の刺激性ありと判定されたが、自己組織を移植するヒト幹細胞臨床研究では問題がないものと考えた。

E. 結論  
滑膜MSC由来三次元人工組織 (TEC) の移植に伴う安全性が確認された。

F. 健康危機情報  
総括研究報告書参照。

G. 研究発表

<論文発表>

1. Tanaka Y, Shino K, Horibe S, Nakamura N, Nakagawa S, Mae T, Otsubo H, Suzuki T, Nakata K. Triple-bundle ACL grafts evaluated by second-look arthroscopy. Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc. 2012 Jan;20(1):95-101.
2. Gobbi A, Mahajan V, Karnatzikos G, Nakamura N. Single- versus double-bundle ACL reconstruction: is there any difference in stability and function at 3-year followup? Clin Orthop Relat Res. 2012 Mar;470(3):824-34.
3. Shino K, Mae T, Nakamura N. Surgical technique: revision ACL reconstruction with a rectangular tunnel technique. Clin Orthop Relat Res. 2012 Mar;470(3):843-52.
4. Nakamura N, Takeuchi R, Sawaguchi T, Ishikawa H, Saito T, Goldhahn S. Cross-cultural adaptation and validation of the Japanese Knee Injury and Osteoarthritis Outcome Score (KOOS). J Orthop Sci. 2011 Sep;16(5):516-23.
5. Kita K, Horibe S, Toritsuka Y, Nakamura N, Tanaka Y, Yonetani Y, Mae T, Nakata K, Yoshikawa H, Shino K. Effects of medial patellofemoral ligament reconstruction on patellar tracking. Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc. 2012 May;20(5):829-37.

<学会発表>

International Cartilage Repair Society (9月)

日本整形外科基礎学術集会 (10月)

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

特に無し

2. 実用新案登録

特に無し

3. その他

特に無し

厚生労働科学研究費補助金（再生医療実用化研究事業）  
（総括・分担）研究報告書

「再生組織の製造管理・支援」に関する研究

名井 陽 大阪大学医学部附属病院未来医療センター 准教授

研究要旨 間葉系幹細胞を用いた軟骨再生治療の臨床応用に向け、標準業務手順書(SOP)、コンピューター支援システムの修正をおこなった。

A. 研究目的

滑膜間葉系幹細胞由来人工組織(TEC)の臨床応用へ向け、大阪大学病院附属未来医療センター内細胞培養センター(CPC)で使用する標準業務手順書(SOP)、コンピューター支援システムを完成させることである。

B. 研究方法

プロトコールの修正に伴いSOPの改良を実施、さらにコンピューター支援システムの修正をおこなった。

C. 研究結果

修正したシステムによりCPC内での細胞培養、TECの作成は、問題なく施行できた。ヒト幹細胞臨床研究実施に必要な基盤整備が完了した。

D. 考察

今回臨床応用へ向けた、システム修正により、TEC作成における安全性担保の基盤が完成された。今後の臨床応用が期待出来る。

E. 結論

TECの臨床応用のためのSOP、コンピューター支援システムの修正をおこなった。

F. 健康危機情報

総括研究報告書参照。

G. 研究発表

<論文発表>

<学会発表>

International Cartilage Repair Society  
(9月)

日本整形外科基礎学術集会(10月)

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

特に無し

2. 実用新案登録

特に無し

3. その他

特に無し



## 研究成果の刊行に関する一覧表

## 書籍

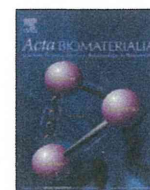
著者氏名	論文タイトル名	書籍全体の 編集者名	書 籍 名	出版社名	出版地	出版年	ページ
なし							

## 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
Choi S, Liu I-l, Yamamoto K, Igawa K, Mochizuki M, Sakai T, Echigo R, Honnami M, Suzuki S, Chung UI, Sasaki N.	Development and evaluation of tetrapod-shaped granular artificial bones.	Acta Biomater	8	2340-2347	2012
Choi S, Lee J, Igawa K, Suzuki S, Mochizuki M, Nishimura R, Chung UI, Sasaki N.	Effect of trehalose coating on basic fibroblast growth factor release from tailor-made artificial bone implant.	J Vet Med Sci	73	1547-1552	2011
Yonezawa T, Lee J, Hibino A, Asai M, Hojo H, Ha B, Teruya T, Nagai K, Chung U, Yagasaki K, Woo J.	Harmine promotes osteoblast differentiation through bone morphogenetic protein signaling.	Biochem Biophys Res Commun	409	633	2011
Tanaka Y, Saijo Y, Fujihara Y, Yamaoka H, Nishizawa S, Nagata S, Ogasawara T, Asawa Y, Takato T, Hoshi K.	Evaluation of the implant type tissue-engineered cartilage by scanning acoustic microscopy.	J Biosci Bioeng	113	252-7	2012
Asawa Y, Sakamoto T, Komura M, Watanabe M, Nishizawa S, Takazawa Y, Takato T, Hoshi K.	Early-stage Foreign Body Reaction against Biodegradable Polymer Scaffolds Affects Tissue Regeneration during the Autologous Transplantation of Tissue Engineered Cartilage in the Canine Model.	Cell Transplant	In press		2012

Ikegami D, Akiyama H, Suzuki A, Nakamura T, Nakano T, Yoshikawa H, Tsumaki N.	Sox9 sustains chondrocyte survival and hypertrophy in part through Pik3ca-Aktpathways.	Development	138	1507-19	2011
Nakura A, Higuchi C, Yoshida K, Yoshikawa H.	PKC $\alpha$ suppresses osteoblastic differentiation.	Bone	48	476-84	2011
Outani H, Okada M, Hiramatsu K, Yoshikawa H, Tsumaki N.	Induction of chondrogenic cells from dermal fibroblast culture by defined factors does not involve a pluripotent state.	Biochem Biophys Res Commun	411	607-12	2011
Sugita A, Kawai S, Hayashibara T, Amano A, Ooshima T, Michigami T, Yoshikawa H, Yoneda T.	Cellular ATP synthesis mediated by type III sodium-dependent phosphate transporter Pit-1 is critical to chondrogenesis.	J Biol Chem	286	3094-103	2011
Tao H, Okamoto M, Nishikawa M, Yoshikawa H, Myoui A.	P38 mitogen-activated protein kinase inhibitor, FR167653, inhibits parathyroid hormone related protein-induced osteoclastogenesis and bone resorption.	PLoS One	6	e23199	2011
Yoshida K, Higuchi C, Nakura A, Yoshikawa H.	Spleen tyrosine kinase suppresses osteoblastic differentiation through MAPK and PKC $\alpha$ .	Biochem Biophys Res Commun	12	774-9	2011
Tanaka Y, Shino K, Horibe S, Nakamura N, Nakagawa S, Mae T, Otsubo H, Suzuki T, Nakata K.	Triple-bundle ACL grafts evaluated by second-look arthroscopy.	Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc	20	95-101	2012
Gobbi A, Mahajan V, Karnatzikos G, Nakamura N.	Single- versus double-bundle ACL reconstruction: is there any difference in stability and function at 3-year followup?	Clin Orthop Relat Res	470	824-34	2012
Shino K, Mae T, Nakamura N.	Surgical technique: revision ACL reconstruction with a rectangular tunnel technique.	Clin Orthop Relat Res	470	843-52	2012

Nakamura N, Takeuchi R, Sawaguchi T, Ishikawa H, Saito T, Goldhahn S.	Cross-cultural adaptation and validation of the Japanese Knee Injury and Osteoarthritis Outcome Score (KOOS).	J Orthop Sci	16	516-23	2011
Kita K, Horibe S; Toritsuka Y, Nakamura N, Tanaka Y, Yonetani Y, Mae T, Nakata K, Yoshikawa H; Shino K.	Effects of medial patellofemoral ligament reconstruction on patellar tracking.	Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc	20	829-37	2012



## Development and evaluation of tetrapod-shaped granular artificial bones

Sungjin Choi<sup>a,b,\*</sup>, I-li Liu<sup>b,1</sup>, Kenichi Yamamoto<sup>a</sup>, Kazuyo Igawa<sup>c</sup>, Manabu Mochizuki<sup>b</sup>, Takamasa Sakai<sup>c</sup>, Ryosuke Echigo<sup>b</sup>, Muneki Honnami<sup>b</sup>, Shigeki Suzuki<sup>d</sup>, Ung-il Chung<sup>a,c</sup>, Nobuo Sasaki<sup>b</sup>

<sup>a</sup> Center for Disease Biology and Integrative Medicine, Graduate School of Medicine, The University of Tokyo, 7-3-1 Hongo, Bunkyo-ku, Tokyo 113-0033, Japan

<sup>b</sup> Laboratory of Veterinary Surgery, Graduate School of Agricultural and Life Sciences, The University of Tokyo, 1-1-1 Yayoi, Bunkyo-ku, Tokyo 113-8657, Japan

<sup>c</sup> Department of Bioengineering, School of Engineering, The University of Tokyo, 7-3-1 Hongo, Bunkyo-ku, Tokyo 113-0033, Japan

<sup>d</sup> NEXT21 K.K., 3-38-1 Hongo, Bunkyo-ku, Tokyo 113-0033, Japan

### ARTICLE INFO

#### Article history:

Received 30 September 2011

Received in revised form 20 February 2012

Accepted 23 February 2012

Available online 2 March 2012

#### Keywords:

Bone graft

Calcium phosphate

Intergranular pores

Mechanical properties

Tetrapod

### ABSTRACT

We have developed a novel form of granular artificial bone “Tetrabones” with a homogeneous tetrapod shape and uniform size. Tetrabones are four armed structures that accumulate to form the intergranular pores that allow invasion of cells and blood vessels. In this study we evaluated the physicochemical characteristics of Tetrabones *in vitro*, and compared their biological and biomechanical properties *in vivo* to those of conventional  $\beta$ -tricalcium phosphate ( $\beta$ -TCP) granule artificial bone. Both the rupture strength and elastic modulus of Tetrabone particles were higher than those of  $\beta$ -TCP granules *in vitro*. The connectivity of intergranular pores 100, 300, and 400  $\mu\text{m}$  in size were higher in Tetrabones than in the  $\beta$ -TCP granules. Tetrabones showed similar osteoconductivity and biomechanical stiffness to  $\beta$ -TCP at 2 months after implantation in an *in vivo* study of canine bone defects. These results suggest that Tetrabones may be a good bone graft material in bone reconstruction.

© 2012 Acta Materialia Inc. Published by Elsevier Ltd. All rights reserved.

### 1. Introduction

Trauma, disease, and developmental abnormalities resulting in skeletal defects often incur considerable morbidity. Although the use of autogenous bone, as blocks or in granular form, has long been considered the gold standard in terms of grafting material, this approach has several disadvantages, including donor site morbidity and the restricted quantity and shape of the tissue [1,2]. For these reasons calcium phosphate-based artificial bone materials such as hydroxyapatite and tricalcium phosphate (TCP) have been widely used in clinical practice [3–6]. These materials are used in various forms, including blocks, pastes, and granules, depending on the indication and type of bone defect.

The ideal granular artificial bone should be biocompatible and biodegradable, and exhibit controlled porosity, good pore interconnectivity, and biomechanical strength [7]. However, it has not yet been established which type of granular calcium phosphate-based artificial bone materials possess the best osteoconductive potential and biomechanical properties [8]. One problem with conventional granular calcium phosphate-based artificial bones is that they have irregular shapes and sizes, which may compromise their

performance. To circumvent this problem we have designed and fabricated a novel granular artificial bone taking advantage of its tetrapod shape.

In the field of civil engineering tetrapods are used to protect harbors against the force of the ocean and the consequent erosion, capitalizing on their high mechanical strength, low center of gravity, and stability to external forces [9]. These advantages led us to hypothesize that tetrapods could be scaled down for application as artificial bone. We expected that their structural characteristics would provide better mechanical stability and control over intergranular pores.

In this study we fabricated novel tetrapod shaped granular artificial bone (hereafter referred to as “Tetrabones”) by injection molding using microparticles of  $\alpha$ -tricalcium phosphate ( $\alpha$ -TCP). We first studied the physicochemical characteristics of Tetrabones *in vitro*, and then evaluated its biological and biomechanical properties in a canine model *in vivo* in comparison with  $\beta$ -TCP granules, which are widely used in clinical practice.

### 2. Materials and methods

#### 2.1. Fabrication of Tetrabones

##### 2.1.1. Materials

A mix of 60/40 wt.%  $\alpha$ -TCP powder (Taihei Chemical Industrial Co., Tokyo, Japan) and binder (composed of 55% olefin resin, 30%

\* Corresponding author at: Laboratory of Veterinary Surgery, Graduate School of Agricultural and Life Sciences, The University of Tokyo, 1-1-1 Yayoi, Bunkyo-ku, Tokyo 113-8657, Japan. Tel.: +81 3 5841 5405; fax: 81 3 5841 8996.

E-mail address: [tjdws1101@hotmail.com](mailto:tjdws1101@hotmail.com) (S. Choi).

<sup>1</sup> These authors should be regarded as joint first authors.