

(19)日本国特許庁(JP)

(12)特許公報(B2)

(11)特許番号
特許第7385664号
(P7385664)

(45)発行日 令和5年11月22日(2023.11.22)

(24)登録日 令和5年11月14日(2023.11.14)

(51)国際特許分類

F I

A 6 1 K 35/28 (2015.01)
A 6 1 K 35/32 (2015.01)
A 6 1 K 47/42 (2017.01)
A 6 1 K 9/14 (2006.01)
A 6 1 P 19/00 (2006.01)

A 6 1 K 35/28
A 6 1 K 35/32
A 6 1 K 47/42
A 6 1 K 9/14
A 6 1 P 19/00

Z N A

請求項の数 4 (全17頁) 最終頁に続く

(21)出願番号 特願2021-536993(P2021-536993)
(86)(22)出願日 令和2年7月22日(2020.7.22)
(86)国際出願番号 PCT/JP2020/028406
(87)国際公開番号 WO2021/020268
(87)国際公開日 令和3年2月4日(2021.2.4)
審査請求日 令和3年12月16日(2021.12.16)
(31)優先権主張番号 特願2019-137482(P2019-137482)
(32)優先日 令和1年7月26日(2019.7.26)
(33)優先権主張国・地域又は機関
日本国(JP)

(73)特許権者 306037311
富士フイルム株式会社
東京都港区西麻布2丁目26番30号
(74)代理人 110000109
弁理士法人特許事務所サイクス
(72)発明者 平塚 崇浩
神奈川県足柄上郡開成町牛島577番地
富士フイルム株式会社内
(72)発明者 本田 雅規
愛知県名古屋市千種区楠元町1-100
愛知学院大学楠元キャンパス内
(72)発明者 伊東 雅哲
愛知県名古屋市千種区楠元町1-100
愛知学院大学楠元キャンパス内
(72)発明者 秋山 泰範

最終頁に続く

(54)【発明の名称】 生体移植材料

(57)【特許請求の範囲】

【請求項1】

ゼラチン含有顆粒と、幹細胞とを含む、骨再生剤であり、
前記ゼラチン含有顆粒の表面に前記幹細胞が付着しており、
幹細胞が、脂肪由来幹細胞、骨髄由来幹細胞又は歯髄由来幹細胞であり、
ゼラチン含有顆粒1mgあたりの幹細胞の数が 1.0×10^3 個以上であり、
ゼラチン含有顆粒の1つの大きさが $100 \mu\text{m}$ 以上 $2000 \mu\text{m}$ 以下である、
骨再生剤、ただし、リコンビナントゼラチンの花弁状ブロックと間葉系幹細胞とを用いた
モザイク細胞塊を含む軟骨再生材料は除く。

【請求項2】

ゼラチンが、コラーゲンに特徴的なGly-X-Yで示される配列の繰り返しを有し、こ
こで、複数個のGly-X-Yはそれぞれ同一でも異なっていてもよく、式中、X及びY
はそれぞれ独立にアミノ酸の何れかを示し、ゼラチンの分子量が2kDa以上100kDa
以下である、請求項1に記載の骨再生剤。

【請求項3】

幹細胞の70%以上が、ゼラチン含有顆粒の表面又は表面の孔に付着している、請求項1
又は2に記載の骨再生剤。

【請求項4】

顎裂部に用いる、請求項1から3の何れか一項に記載の骨再生剤。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、ゼラチン含有顆粒と、幹細胞とを含む、骨再生剤に関する。

【背景技術】

【0002】

歯科領域、口腔外科領域、整形外科領域等における再生医療用基材として、生体親和性が高いゼラチンを原料とした基材が知られている。

【0003】

特許文献1には、リコンビナントゼラチンを含む骨再生剤及び骨補填製剤が開示されている。特許文献1に記載の骨再生剤及び骨補填製剤においては、補填材担体自体で骨再生を促進することができる。特許文献1の実施例で開示されているゼラチンの形状はゲルであり、骨再生が確認できている部位は、ラット頭頂骨に形成した骨欠損部（実施例4）、及びビーグル犬の口腔内に形成した抜歯部位（実施例7）である。

10

【0004】

特許文献2には、リコンビナントゼラチンの花弁状ブロックと間葉系幹細胞とを用いたモザイク細胞塊を含む軟骨再生材料が開示されている。特許文献2の実施例において軟骨再生が確認できている部位は、ウサギ骨軟骨欠損部位（実施例1）である。

【先行技術文献】

【特許文献】

【0005】

【文献】国際公開WO2011/027850号公報

【文献】国際公開WO2016/148245号公報

20

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0006】

リコンビナントゼラチンを原料とした再生医療用基材は、一定の骨再生効果及び軟骨再生効果を有することが確認されている。しかし、組織の再生が実際に確認できている箇所は、頭頂骨に形成した骨欠損部等、元々、骨組織又は軟骨組織が存在する箇所に限られていた。このような箇所は、骨組織及び軟骨組織の再生が比較的容易であると推測される。

【0007】

一方、顎裂（がくれつ）とは、歯茎に割れ目がある状態であり、先天性異常の一つである。顎裂を埋めるためには、骨組織を補う必要があり、腰骨を自家移植する方法が知られている。しかし、腰骨などからの自家骨移植は患者の負担が大きいことから、代替の治療法が求められている。リコンビナントゼラチンを原料とした再生医療用基材が、口唇口蓋裂の治療における顎裂部再建のように、元々骨がない箇所でも十分な骨再生効果を示せるかについては十分な検討がされていなかった。

30

【0008】

上記の通り、患者負担軽減の観点から、より早く組織再生効果を示す再生医療用基材の開発が求められていた。本発明の課題は、高い骨再生効果を示す骨再生剤を提供することである。

40

【課題を解決するための手段】

【0009】

本発明者らは上記課題を解決するために鋭意検討した結果、ゼラチン含有顆粒と幹細胞とを組み合わせることで、高い骨再生速度を達成できることを見出した。本発明はこれらの知見に基づいて完成したものである。

【0010】

即ち、本発明によれば、以下の発明が提供される。

< 1 > ゼラチン含有顆粒と、幹細胞とを含む、骨再生剤。

< 2 > ゼラチンが、コラーゲンに特徴的なG1y-X-Yで示される配列の繰り返しを有し、ここで、複数個のG1y-X-Yはそれぞれ同一でも異なっていてもよく、式中、

50

X及びYはそれぞれ独立にアミノ酸の何れかを示し、ゼラチンの分子量が2 K D a以上1 0 0 K D a以下である、< 1 >に記載の骨再生剤。

< 3 > ゼラチン含有顆粒の1つの大きさが1 0 0 μ m以上2 0 0 0 μ m以下である、< 1 >又は< 2 >に記載の骨再生剤。

< 4 > 幹細胞が、間葉系幹細胞、i P S細胞又はE S細胞である、< 1 >から< 3 >の何れか一に記載の骨再生剤。

< 5 > 幹細胞が、脂肪由来幹細胞、骨髄由来幹細胞又は歯髄由来幹細胞である、< 1 >から< 4 >の何れか一に記載の骨再生剤。

< 6 > ゼラチン含有顆粒1 m gあたりの幹細胞の数が 1.0×10^3 個以上である、< 1 >から< 5 >の何れか一に記載の骨再生剤。

10

< 7 > 幹細胞の7 0 %以上が、ゼラチン含有顆粒の表面又は表面の孔に付着している、< 1 >から< 6 >の何れか一に記載の骨再生剤。

< 8 > 顎裂部に用いる、< 1 >から< 7 >の何れか一に記載の骨再生剤。

【0 0 1 1】

< A > ゼラチン含有顆粒と、幹細胞とを含む、骨再生剤を患者に投与することを含む、骨再生方法。

< B > ゼラチン含有顆粒と、幹細胞とを含む、骨再生の治療において使用するための治療剤。

< C > 骨再生剤の製造のための、ゼラチン含有顆粒と幹細胞との組み合わせの使用。

【発明の効果】

20

【0 0 1 2】

本発明の骨再生剤によれば、高い骨再生効果を発揮することができる。

【図面の簡単な説明】

【0 0 1 3】

【図1】図1は、顆粒+幹細胞(左)と花弁状ブロック+幹細胞(右)のイメージ図を示す。

【図2】図2は、各移植群の骨体積経時変化の測定結果を示す。

【図3】図3は、移植部のイメージ図を示す。

【図4】図4は、各移植群の骨体積経時変化の測定結果を示す。

【図5】図5は、各移植群の患部C T画像(代表例)を示す。

30

【発明を実施するための形態】

【0 0 1 4】

以下、本発明の実施の形態について詳細に説明する。

本発明の骨再生剤は、ゼラチン含有顆粒と、幹細胞とを含む。

本発明の骨再生剤は、後記の実施例におけるラット頭頂骨欠損モデルにおいて実証される通り、骨再生速度を向上することができる。また、本発明の骨再生剤によれば、後記の実施例における顎裂部再建モデルにおいて実証される通り、元々骨がない箇所でも良好な骨再生が可能である。

【0 0 1 5】

本発明においては、ゼラチン含有顆粒を使用することにより、すなわち、ゼラチンを顆粒の形状において使用することにより、顎裂部のように、骨の欠損部に常態的に圧力がかかる部位においても、形態を保持することが可能になる。

40

【0 0 1 6】

< ゼラチン >

ゼラチンとしては、天然由来ゼラチン又はリコンビナントゼラチンの何れでもよいが、リコンビナントゼラチンが好ましい。

リコンビナントゼラチンとは、遺伝子組み換え技術により作られたゼラチン類似のアミノ酸配列を有するポリペプチドもしくは蛋白様物質を意味する。

【0 0 1 7】

本発明で用いるゼラチンは、コラーゲンに特徴的なG l y - X - Y (式中、XおよびY

50

はそれぞれ独立にアミノ酸の何れかを示す)で示される配列の繰り返しを有するものが好ましい。ここで、複数個のGly-X-Yはそれぞれ同一でも異なってもよい。好ましくは、細胞接着シグナルが一分子中に2配列以上含まれている。本発明で用いるゼラチンとしては、コラーゲンの部分アミノ酸配列に由来するアミノ酸配列を有するゼラチンを用いることができる。例えばEP1014176、米国特許第6992172号、国際公開WO2004/85473、国際公開WO2008/103041等に記載のものを用いることができるが、これらに限定されるものではない。本発明で用いるゼラチンとして好ましいものは、以下の態様のゼラチンである。

【0018】

リコンビナントゼラチンは、天然のゼラチン本来の性能から、生体親和性に優れ、且つ天然由来ではないことで牛海綿状脳症(BSE)などの懸念がなく、非感染性に優れている。また、リコンビナントゼラチンは天然ゼラチンと比べて均一であり、配列が決定されているので、強度および分解性においても架橋等によってプレを少なく精密に設計することが可能である。

10

【0019】

ゼラチンの分子量は、特に限定されないが、好ましくは2000以上10000以下(2kDa以上100kDa以下)であり、より好ましくは2500以上95000以下(2.5kDa以上95kDa以下)であり、さらに好ましくは5000以上90000以下(5kDa以上90kDa以下)であり、最も好ましくは10000以上90000以下(10kDa以上90kDa以下)である。

20

【0020】

ゼラチンの分子量分布は特に限定されないが、分子量分布測定における最大の分子量ピークの面積が、全ての分子量ピークの合計面積の70%以上であるゼラチンを含むことが好ましく、90%以上がより好ましく、95%以上が最も好ましい。ゼラチンの分子量分布は、国際公開WO2017/170342に記載の方法で測定することができる。

【0021】

ゼラチンは、コラーゲンに特徴的なGly-X-Yで示される配列の繰り返しを有することが好ましい。ここで、複数個のGly-X-Yはそれぞれ同一でも異なってもよい。Gly-X-Yにおいて、Glyはグリシンを表し、XおよびYは、任意のアミノ酸(好ましくは、グリシン以外の任意のアミノ酸)を表す。コラーゲンに特徴的なGly-X-Yで示される配列とは、ゼラチン・コラーゲンのアミノ酸組成および配列における、他のタンパク質と比較して非常に特異的な部分構造である。この部分においてはグリシンが全体の約3分の1を占め、アミノ酸配列では3個に1個の繰り返しとなっている。グリシンは最も簡単なアミノ酸であり、分子鎖の配置への束縛も少なく、ゲル化に際してのヘリックス構造の再生に大きく寄与している。XおよびYで表されるアミノ酸にはイミノ酸(プロリン、オキシプロリン)が多く含まれ、全体の10%~45%を占めることが好ましい。好ましくは、ゼラチンの配列の80%以上、更に好ましくは95%以上、最も好ましくは99%以上のアミノ酸が、Gly-X-Yの繰り返し構造である。

30

【0022】

一般的なゼラチンは、極性アミノ酸のうち電荷を持つものと無電荷のものが1:1で存在する。ここで、極性アミノ酸とは具体的にシステイン、アスパラギン酸、グルタミン酸、ヒスチジン、リジン、アスパラギン、グルタミン、セリン、スレオニン、チロシンおよびアルギニンを指し、このうち極性無電荷アミノ酸とはシステイン、アスパラギン、グルタミン、セリン、スレオニンおよびチロシンを指す。本発明で用いるゼラチンにおいては、構成する全アミノ酸のうち、極性アミノ酸の割合が10~40%であり、好ましくは20~30%である。且つ上記極性アミノ酸中の無電荷アミノ酸の割合が5%以上20%未満、好ましくは5%以上10%未満であることが好ましい。さらに、セリン、スレオニン、アスパラギン、チロシンおよびシステインのうちいずれか1種のアミノ酸、好ましくは2種以上のアミノ酸を配列上に含まないことが好ましい。

40

【0023】

50

一般にポリペプチドにおいて、細胞接着シグナルとして働く最小アミノ酸配列が知られている（例えば、株式会社永井出版発行「病態生理」Vol. 9、No. 7（1990年）527頁）。本発明で用いるゼラチンは、これらの細胞接着シグナルを1分子中に2以上有することが好ましい。具体的な配列としては、接着する細胞の種類が多いという点で、アミノ酸一文字表記で表される、R G D配列、L D V配列、R E D V配列、Y I G S R配列、P D S G R配列、R Y V V L P R配列、L G T I P G配列、R N I A E I I K D I配列、I K V A V配列、L R E配列、D G E A配列、およびH A V配列の配列が好ましい。さらに好ましくはR G D配列、Y I G S R配列、P D S G R配列、L G T I P G配列、I K V A V配列およびH A V配列、特に好ましくはR G D配列である。R G D配列のうち、好ましくはE R G D配列である。細胞接着シグナルを有するゼラチンを用いることにより、細胞の基質産生量を向上させることができる。例えば、細胞として、間葉系幹細胞を用いた軟骨分化の場合には、グリコサミノグリカン（G A G）の産生を向上させることができる。

【0024】

本発明で用いるゼラチンにおけるR G D配列の配置としては、R G D間のアミノ酸数が0～100の間、好ましくは25～60の間で均一でないことが好ましい。

この最小アミノ酸配列の含有量は、細胞接着・増殖性の観点から、タンパク質1分子中3～50個が好ましく、さらに好ましくは4～30個、特に好ましくは5～20個である。最も好ましくは12個である。

【0025】

本発明で用いるゼラチンにおいて、アミノ酸総数に対するR G Dモチーフの割合は少なくとも0.4%であることが好ましい。ゼラチンが350以上のアミノ酸を含む場合、350のアミノ酸の各ストレッチが少なくとも1つのR G Dモチーフを含むことが好ましい。アミノ酸総数に対するR G Dモチーフの割合は、更に好ましくは少なくとも0.6%であり、更に好ましくは少なくとも0.8%であり、更に好ましくは少なくとも1.0%であり、更に好ましくは少なくとも1.2%であり、最も好ましくは少なくとも1.5%である。ペプチド内のR G Dモチーフの数は、250のアミノ酸あたり、好ましくは少なくとも4、更に好ましくは少なくとも6、更に好ましくは少なくとも8、更に好ましくは12以上16以下である。R G Dモチーフの0.4%という割合は、250のアミノ酸あたり、少なくとも1つのR G D配列に対応する。R G Dモチーフの数は整数であるので、少なくとも0.4%の特徴を満たすには、251のアミノ酸からなるゼラチンは、少なくとも2つのR G D配列を含まなければならない。好ましくは、ゼラチンは、250のアミノ酸あたり、少なくとも2つのR G D配列を含み、より好ましくは250のアミノ酸あたり、少なくとも3つのR G D配列を含み、さらに好ましくは250のアミノ酸あたり、少なくとも4つのR G D配列を含む。本発明におけるゼラチンのさらなる態様としては、少なくとも4つのR G Dモチーフ、好ましくは少なくとも6つ、より好ましくは少なくとも8つ、さらに好ましくは12以上16以下のR G Dモチーフを含む。

【0026】

ゼラチンは部分的に加水分解されていてもよい。

【0027】

好ましくは、本発明で用いるゼラチンは、 $A - [(Gly - X - Y)_n]_m - B$ で示されるものである。n個のXはそれぞれ独立にアミノ酸の何れかを示し、n個のYはそれぞれ独立にアミノ酸の何れかを示す。mは好ましくは2～10の整数を示し、より好ましくは3～5の整数を示す。nは3～100の整数が好ましく、15～70の整数がさらに好ましく、50～65の整数が最も好ましい。Aは任意のアミノ酸またはアミノ酸配列を示し、Bは任意のアミノ酸またはアミノ酸配列を示す。なお、n個のGly - X - Yはそれぞれ同一でも異なってもよい。

【0028】

より好ましくは、本発明で用いるゼラチンは、式： $Gly - Ala - Pro - [(Gly - X - Y)_{63}]_3 - Gly$ （式中、63個のXはそれぞれ独立にアミノ酸の何れかを

10

20

30

40

50

示し、63個のYはそれぞれ独立にアミノ酸の何れかを示す。なお、63個のGly-X-Yはそれぞれ同一でも異なってもよい。)で示されるものである。

【0029】

繰り返し単位には天然に存在するコラーゲンの配列単位を複数結合することが好ましい。ここで言う天然に存在するコラーゲンとは天然に存在するものであればいずれでも構わないが、好ましくはI型、II型、III型、IV型、またはV型コラーゲンである。より好ましくは、I型、II型、またはIII型コラーゲンである。別の形態によると、上記コラーゲンの由来は好ましくは、ヒト、ウシ、ブタ、マウスまたはラットであり、より好ましくはヒトである。

【0030】

本発明で用いるゼラチンの等電点は、好ましくは5~10であり、より好ましくは6~10であり、さらに好ましくは7~9.5である。ゼラチンの等電点の測定は、等電電気泳動法(Maxey, C. R. (1976; Phitogr. Gelatin 2, Editor Cox, P. J. Academic, London, Engl. 参照)に従って、1質量%ゼラチン溶液をカチオンおよびアニオン交換樹脂の混晶カラムに通したあとのpHを測定することで実施することができる。

【0031】

好ましくは、ゼラチンは脱アミン化されていない。

好ましくは、ゼラチンはテロペプチドを有さない。

好ましくは、ゼラチンは、アミノ酸配列をコードする核酸により調製された実質的に純粋なポリペプチドである。

【0032】

本発明で用いるゼラチンとして特に好ましくは、

(1) 配列番号1に記載のアミノ酸配列からなるペプチド；

(2) 配列番号1に記載のアミノ酸配列において1若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつ生体親和性を有するペプチド；または

(3) 配列番号1に記載のアミノ酸配列と80%以上(さらに好ましくは90%以上、特に好ましくは95%以上、最も好ましくは98%以上)の配列同一性を有するアミノ酸配列からなり、かつ生体親和性を有するペプチド；

の何れかである

【0033】

「1若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列」における「1若しくは数個」とは、好ましくは1~20個、より好ましくは1~10個、さらに好ましくは1~5個、特に好ましくは1~3個を意味する。

【0034】

本発明で用いるゼラチンの親水性値「1/IOB」値は、0から1.0が好ましい。より好ましくは、0から0.6であり、さらに好ましくは0から0.4である。IOBとは、藤田穆により提案された有機化合物の極性/非極性を表す有機概念図に基づく、親疎水性の指標であり、その詳細は、例えば、「Pharmaceutical Bulletin», vol.2, 2, pp.163-173 (1954)、「化学の領域」vol.11, 10, pp.719-725 (1957)、「フレグランスジャーナル」, vol.50, pp.79-82 (1981)等で説明されている。簡潔に言えば、全ての有機化合物の根源をメタン(CH₄)とし、他の化合物はすべてメタンの誘導体とみなして、その炭素数、置換基、変態部、環等にそれぞれ一定の数値を設定し、そのスコアを加算して有機性値(OV)、無機性値(IV)を求め、この値を、有機性値をX軸、無機性値をY軸にとった図上にプロットしていくものである。有機概念図におけるIOBとは、有機概念図における有機性値(OV)に対する無機性値(IV)の比、すなわち「無機性値(IV)/有機性値(OV)」をいう。有機概念図の詳細については、「新版有機概念図-基礎と応用-」(甲田善生等著、三共出版、2008)を参照されたい。本明細書中では、IOBの逆数をとった「1/IOB」値で親疎水性を表している。「1/IOB」値が小さい(0に近づく)程、親水性であることを表す表記である。

10

20

30

40

50

【0035】

本発明で用いるゼラチンの「1 / I O B」値を上記範囲とすることにより、親水性が高く、かつ、吸水性が高くなる。

【0036】

本発明で用いるゼラチンは、Grand average of hydropathicity (GRAVY) 値で表される親疎水性指標において、0.3以下、マイナス9.0以上であることが好ましく、0.0以下、マイナス7.0以上であることがさらに好ましい。Grand average of hydrophobicity (GRAVY) 値は、『Gasteiger E., Hoogland C., Gattiker A., Duvaud S., Wilkins M.R., Appel R.D., Bairoch A.; Protein Identification and Analysis Tools on the ExPASy Server; (In) John M. Walker (ed): The Proteomics Protocols Handbook, Humana Press (2005). pp. 571-607』および『Gasteiger E., Gattiker A., Hoogland C., Ivanyi I., Appel R.D., Bairoch A.; ExPASy: the proteomics server for in-depth protein knowledge and analysis.; Nucleic Acids Res. 31:3784-3788(2003).』に記載された方法により得ることができる。

10

本発明で用いるゼラチンのGRAVY値を上記範囲とすることにより、親水性が高く、かつ、吸水性が高くなる。

【0037】

本発明で用いるリコンビナントゼラチンは、当業者に公知の遺伝子組み換え技術によって製造することができ、例えばEP1014176A2号公報、米国特許第6992172号公報、国際公開WO2004/85473号、国際公開WO2008/103041号等に記載の方法に準じて製造することができる。具体的には、所定のリコンビナントゼラチンのアミノ酸配列をコードする遺伝子を取得し、これを発現ベクターに組み込んで、組み換え発現ベクターを作製し、これを適当な宿主に導入して形質転換体を作製する。得られた形質転換体を適当な培地で培養することにより、リコンビナントゼラチンが産生されるので、培養物から産生されたリコンビナントゼラチンを回収することにより、本発明で用いるゼラチンを調製することができる。

20

【0038】

<ゼラチン含有顆粒>

本発明におけるゼラチン含有顆粒とは、その成分の全部又は一部がゼラチンである顆粒を意味する。ゼラチン含有顆粒としては、例えば、ゼラチンのみからなる顆粒、無機成分にゼラチンをコーティングした顆粒などが挙げられる。二種以上のゼラチン含有顆粒を混合して用いてもよい。ゼラチン含有顆粒としては、ゼラチンのみからなる顆粒が好ましい。また、無機成分とは、1族のアルカリ金属、2族のアルカリ土類金属、3～12族の遷移金属、13～15族の典型金属、および、ホウ素、ケイ素、ゲルマニウム等の半金属の元素を含む成分をいう。無機成分は、セラミックス、チタン、ステンレス、ヒドロキシアパタイト、リン酸三カルシウムなど、生体適合性が高いものが好ましい。

30

【0039】

ゼラチンのみからなる顆粒は、例えば、ゼラチンを含有する水溶液を凍結乾燥することによってゼラチン多孔質体(ゼラチンブロック)を製造し、このゼラチン多孔質体を粉砕機により粉砕することにより、製造することができる。

40

無機成分にゼラチンをコーティングした顆粒は、例えば、無機成分の顆粒をゼラチン水溶液に浸漬させ、風乾または凍結乾燥によって無機成分の顆粒にゼラチンをコーティングすることにより、製造することができる。

【0040】

ゼラチン含有顆粒におけるゼラチンは、架橋されているものでもよいし、架橋されていないものでもよいが、架橋されているものが好ましい。一般的な架橋方法としては、熱架橋、アルデヒド類(例えば、ホルムアルデヒド、グルタルアルデヒドなど)による架橋、縮合剤(カルボジイミド、シアナミドなど)による架橋、酵素架橋、光架橋、紫外線架橋、疎水性相互作用、水素結合、イオン性相互作用などが知られており、本発明においても上記の架橋方法を使用することができる。本発明で使用する架橋方法としては、さらに好

50

ましくは熱架橋、紫外線架橋、又は酵素架橋であり、特に好ましくは熱架橋である。

【0041】

酵素による架橋を行う場合、酵素としては、高分子材料間の架橋作用を有するものであれば特に限定されないが、好ましくはトランスグルタミナーゼ及びラッカーゼ、最も好ましくはトランスグルタミナーゼを用いて架橋を行うことができる。トランスグルタミナーゼで酵素架橋するタンパク質の具体例としては、リジン残基及びグルタミン残基を有するタンパク質であれば特に制限されない。トランスグルタミナーゼは、哺乳類由来のものであっても、微生物由来のものであってもよく、具体的には、味の素(株)製アクティバシリーズ、試薬として発売されている哺乳類由来のトランスグルタミナーゼ、例えば、オリエンタル酵母工業(株)製、Upstate USA Inc.製、Biodesign International製などの

10

【0042】

架橋(例えば、熱架橋)を行う際の反応温度は、架橋ができる限り特に限定されないが、好ましくは、-100 ~ 500 であり、より好ましくは0 ~ 300 であり、更に好ましくは50 ~ 300 であり、更に好ましくは100 ~ 250 であり、更に好ましくは120 ~ 200 である。

【0043】

本発明におけるゼラチン含有顆粒の架橋度は、特に限定されないが、好ましくは0.4

20

【0044】

ゼラチン含有顆粒の架橋度(1分子当たりの架橋数)の測定方法は、特に限定されないが、例えば、TNBS(2,4,6-トリニトロベンゼンスルホン酸)法で測定することができる。具体的には、ゼラチン含有顆粒、NaHCO₃水溶液及びTNBS水溶液を混合して37 で3時間反応させた後に反応停止したサンプルと、ゼラチン含有顆粒、NaHCO₃水溶液及びTNBS水溶液を混合した直後に反応停止させたブランクとをそれぞれ調製し、純水で希釈したサンプル及びブランクの吸光度(345nm)を測定し、以下の(式2)、及び(式3)から架橋度(1分子当たりの架橋数)を算出することができる。

30

【0045】

(式2) $(As - Ab) / 14600 \times V / w$

(式2)は、ゼラチン含有顆粒1g当たりのリジン量(モル等量)を示す。

(式中、Asはサンプル吸光度、Abはブランク吸光度、Vは反応液量(g)、wはゼラチン含有顆粒質量(mg)を示す。)

【0046】

(式3) $1 - (\text{サンプル(式2)}/\text{未架橋の高分子(式2)}) \times 34$

(式3)は、1分子あたりの架橋数を示す。

【0047】

ゼラチン含有顆粒の顆粒一つ当たりの大きさは、特に限定されないが、好ましくは100 μm以上2000 μm以下であり、より好ましくは200 μm以上1800 μm以下であり、さらに好ましくは300 μm以上1700 μm以下であり、特に好ましくは500 μm以上1500 μm以下である。ゼラチン含有顆粒の顆粒一つ当たりの大きさを上記の範囲内にすることにより、良好な骨再生効果を発揮することができる。

40

【0048】

顆粒一つの大きさは、顆粒を分ける際に用いたふるいの大きさで定義することができる。例えば、2000 μmのふるいにかけて、通過した顆粒を500 μmのふるいにかけて際にふるいの上に残る顆粒を、500 ~ 2000 μmの大きさの顆粒とすることができる。

【0049】

<幹細胞>

50

本発明では幹細胞を使用する。

幹細胞とは、自ら増殖する能力（自己複製能）と、特定の細胞に分化する能力（多分化能）とを有する細胞である。

【0050】

幹細胞としては、例えば、間葉系幹細胞（MSC）、人工多能性幹（iPS）細胞、胚性幹（ES）細胞、生殖幹（GS）細胞、造血幹細胞、羊膜細胞、臍帯血細胞、脂肪由来幹細胞、骨髄由来幹細胞、歯髄由来幹細胞、心筋幹細胞、滑膜由来幹細胞又は神経幹細胞などを使用することができる。幹細胞としては、間葉系幹細胞（MSC）、人工多能性幹（iPS）細胞、又は胚性幹（ES）細胞が好ましく、さらに脂肪由来幹細胞、骨髄由来幹細胞、又は歯髄由来幹細胞も好ましい。

10

【0051】

使用する幹細胞は1種でもよいし、複数種の細胞を組み合わせて用いてもよい。また、使用する細胞として、好ましくは、動物細胞であり、より好ましくは脊椎動物由来細胞、特に好ましくはヒト由来細胞である。また、細胞の由来は、自家細胞または他家細胞の何れでも構わない。使用する幹細胞は、幹細胞以外の細胞を含んでもよい。

【0052】

幹細胞の数は、ゼラチン含有顆粒1mg当たり、 1.0×10^3 個以上であることが好ましく、 2.5×10^3 個以上であることがより好ましく、 1.0×10^4 個以上であることがさらに好ましく、 2.5×10^4 個以上であることがよりさらに好ましく、上限は特に限定されないが、一般的には 1.0×10^6 個以下であり、 1.0×10^5 個以下でもよい。

20

幹細胞の数は、ゼラチン含有顆粒1個当たり、 2.0×10^2 個以上であることが好ましく、 5.0×10^2 個以上であることがより好ましく、 2.0×10^3 個以上であることがさらに好ましく、 5.0×10^3 個以上であることがよりさらに好ましく、上限は特に限定されないが、一般的には 2.0×10^5 個以下であり、 2.0×10^4 個以下でもよい。

【0053】

<骨再生剤>

本発明の骨再生剤は、ゼラチン含有顆粒と幹細胞とを一緒に混合することによって製造することができる。例えば、96ウエルプレート等のプレート上においてゼラチン含有顆粒に、幹細胞を含む細胞懸濁液を浸潤させて、所定の時間培養する。その後、適当な培地を含む培養容器中に上記の細胞を浸潤させたゼラチン含有顆粒を入れ、振動を与えることによって、本発明の骨再生剤を製造することができる。

30

【0054】

ゼラチン含有顆粒+幹細胞（左）と花弁状ブロック+幹細胞（右）のイメージ図を図1に示す。ゼラチン含有顆粒+幹細胞（左）が、本発明の骨再生剤のイメージ図である。図1から分かるように、楕円形で示す細胞は、ゼラチン含有顆粒を使用する場合の方が少ない。

具体的には、ゼラチン含有顆粒+幹細胞の場合、上記の通り、ゼラチン含有顆粒1mg当たりの細胞数は、 1.0×10^3 個以上であることが好ましく、一般的には 2.0×10^5 個以下である。一方、花弁状ブロック+幹細胞の場合、例えば特許文献2では、花弁状ブロック1mg当たり、 1.0×10^6 個（=細胞1個当たり $0.001 \mu\text{g}$ のブロック）であり、顆粒またはブロック当たりの細胞数に、数十～数千倍の差がある。

40

【0055】

本発明によるゼラチン含有顆粒と幹細胞とを含む骨再生剤においては、ゼラチン含有顆粒の表面に幹細胞が付着していることが好ましい。具体的には、幹細胞の70%以上（好ましくは80%以上、より好ましくは90%以上）が、ゼラチン含有顆粒の表面又は表面の孔に付着していることが好ましい。幹細胞が、ゼラチン含有顆粒の表面又は表面の孔に付着していることは、写真により確認及び測定することができる。具体的には、骨再生剤の凍結切片を作製した後、ヘマトキシリン・エオジン（HE）染色にて染色を行うことに

50

より、観察できる幹細胞の70%以上が、ゼラチン含有顆粒の表面又は表面の孔に付着していることを確認することができる。上記のように、幹細胞をゼラチン含有顆粒の表面又は表面の孔に付着させることにより、同じスペースの骨欠損部位に骨再生剤を充填する場合、使用する幹細胞数が少量で済むという利点がある。

【0056】

本発明の骨再生剤は、骨再生を必要とする対象者（例えば、ヒトなどの哺乳動物）に投与することによって、骨再生を促進、誘導することができる。好ましくは、本発明の骨再生剤は、生体中の骨が欠損した部位へ直接投与することができる。

【0057】

本発明の骨再生剤は、その使用目的に合わせて用量、用法、剤型を適宜決定することが可能である。例えば、本発明の骨再生剤は、生体内の目的部位に直接投与してもよいし、あるいは注射用蒸留水、注射用生理食塩水、pH5～8の緩衝液（リン酸系、クエン酸系等）等の水性溶媒等の液状賦形剤に懸濁して、例えば注射、塗布等により投与してもよい。また、適当な賦形剤と混合し、軟膏状、ゲル状、クリーム状等にしてから塗布してもよい。

10

【0058】

本発明の骨再生剤の製剤化は、当業者に公知の方法に従って行うことができる。例えば、製剤用担体が液体の場合は、溶解又は分散させ、また、製剤用担体が粉末の場合は、混合又は吸着させることができる。さらに必要に応じて、薬学的に許容される添加物（例えば、保存剤、安定化剤、抗酸化剤、賦形剤、結合剤、崩壊剤、湿潤剤、滑沢剤、着色剤、芳香剤、矯味剤、剤皮、懸濁化剤、乳化剤、溶解補助剤、緩衝剤、等張化剤、塑性剤、界面活性剤又は無痛化剤等）を含有させることもできる。

20

【0059】

ゼラチンの投与量は、特に限定されないが、例えば、投与される生体の表面積1cm²当たり1～100mgであり、好ましくは1～50mgである。

【0060】

本発明の骨再生剤の対象としては例えば、外傷などによる骨欠損や骨折、口腔外科疾患やその治療法（歯槽骨欠損、口唇口蓋裂、顎裂、歯周病、歯周病骨欠損など）、骨粗鬆症、関節症、および脊椎固定術（脊椎分離症、脊椎すべり症、および脊椎骨折などに施すもの）などが挙げられる。特に好ましくは、本発明の骨再生剤は、顎裂部に用いることができる。

30

【0061】

以下の実施例により本発明をさらに具体的に説明するが、本発明は実施例によって限定されるものではない。

【実施例】

【0062】

[ゼラチン含有顆粒の調製]

<1>リコンビナントペプチド（リコンビナントゼラチン）

リコンビナントペプチド（リコンビナントゼラチン）として以下のCBE3を用意した（国際公開WO2008/103041号公報に記載）。

40

CBE3：

分子量：51.6kD

構造：GAP[(GXY)₆₃]₃G

アミノ酸数：571個

RGD配列：12個

イミノ酸含量：33%

ほぼ100%のアミノ酸がGXYの繰り返し構造である。CBE3のアミノ酸配列には、セリン、スレオニン、アスパラギン、チロシンおよびシステインは含まれていない。CBE3はERGD配列を有している。

等電点：9.34

50

G R A V Y 値 : - 0 . 6 8 2

1 / I O B 値 : 0 . 3 2 3

アミノ酸配列 (配列表の配列番号 1) (国際公開 WO 2008 / 103041 号公報の配列番号 3 と同じ。但し末尾の X は「P」に修正)

GAP(GAPGLQGAPGLQGMPGERGAAGLPGPKGERGDAGPKGADGAPGAPGLQGMPGERGAAGLPGPKGERGDAGPKGDGVRGLAGPIGPPGERGAAGLPGPKGERGDAGPKGADGAPGKDGVRGLAGPIGPPGPAGAPGAPGLQGMPGERGAAGLPGPKGERGDAGPKGADGAPGKDGVRGLAGPP)₃G

【 0 0 6 3 】

< 2 > リコンビナントゼラチン多孔質体の顆粒の作製

厚さ 5 mm、直径 9.8 mm のアルミ製円筒カップ状容器を用意した。円筒カップは曲面を側面としたとき、側面は 1 mm のアルミで閉鎖されており、底面 (平板の円形状) も 5 mm のアルミで閉鎖されている。一方、上面は開放された形をしている。また、側面の内部にのみ、肉厚 3 mm のテフロン (登録商標) を均一に敷き詰め、結果として円筒カップの内径は 9.0 mm になっている。以後、この容器のことを円筒形容器と呼称する。

【 0 0 6 4 】

リコンビナントゼラチンを 7.5 質量% で含むゼラチン水溶液を、円筒形容器に約 18 ml 流し込んだ後、-50 の冷凍庫 (日立、超低温フリーザー RS-U30T) に 1 時間以上静置することによって、凍結したゼラチンブロックを得た。このゼラチンブロックを凍結乾燥 (タカラ、TF5-85ATNNN) し、粉碎機 (クワトロ、コーミル U10) にて孔径約 1 mm のスクリーンにて粉碎し、目開き 1.4 mm のふるい下の画分を回収した。得られたゼラチン含有顆粒を、窒素雰囲気下 135 (ヤマト科学、DP-43) で 4.75 時間処理し、ゼラチン多孔質体の顆粒 (以下、ゼラチン顆粒とも言う) を得た。熱架橋による顆粒の架橋度は、1.4 であった。

【 0 0 6 5 】

[歯髄由来幹細胞の調製]

愛知学院大学歯学部附属病院・口腔外科の外来にて、患者とその保証人において、抜去乳歯及び歯髄の提供・研究への使用についての同意書に署名頂いた後、抜去歯から歯髄摘出した。

【 0 0 6 6 】

抜歯前に口腔内を消毒し、右側上顎乳切歯の抜歯 (5 歳児) を施行した。抜去後すぐに抜去した歯を MEM (Wako) 10 ml に (FBS (gibco) 20% + Penicillin - Streptomycin (Wako) 1% (以下 P/S)) が入った 15 ml の遠沈管に入れた後に、4 のクーラーボックス内に保管して、附属病院から愛知学院大学歯学部楠元キャンパスにある口腔解剖学の研究室へ運んだ。細胞の処理まで冷蔵庫 (4 下) にて保存した。MEM は、Minimum Essential Medium を意味し、FBS は、ウシ胎児血清 (Fetal Bovine Serum) を意味する。

【 0 0 6 7 】

歯髄からの細胞の単離は、口腔解剖学の研究室にあるクリーンベンチ内にて作業した。具体的には、抜去した乳歯 (歯根吸収しており髄腔は開放されていたため分割などはしていない) から歯科用 K ファイル (販売会社: マニー 販売名: マニー K ファイル サイズ 15 先端径 0.15 mm) を用いて乳歯の歯冠部と歯根部から歯髄を摘出した。摘出した歯髄は、事前に用意した 15 ml 遠沈管に D-PBS (Wako) 4 ml (FBS 2% P/S 1%) を入れて、血液などを洗い流すために、攪拌した。次に、歯髄が沈殿したら上澄みのみをピペットで除去した。この操作を 5 回行った。D-PBS は、ダルベッコリン酸緩衝生理食塩水を示す。

【 0 0 6 8 】

洗浄後に、歯髄から酵素処理にて細胞を単離する。15 ml の遠沈管に洗浄後の歯髄と細胞剥離用酵素 Accutase 3 ml (Innovative Cell Technologies) を加えて、Bio shaker (TAITEC Bio Shaker

10

20

30

40

50

V・BR-36:)にて37 環境下にて振動数118rpm/minにて30分撹拌させた。30分撹拌後にAccutase 3mlに、PRIME-XV(登録商標)MCS X SFM 7ml(37 環境下)(Irvine Scientific)を加えて、酵素反応を停止させながら、ピペティングを20回行い、歯髄から細胞を単離する操作を行う。ピペティング後に、遠心分離機(100G、5分)で遠心分離後に上澄み液のみ除去しPRIME-XV(登録商標)MCS X SFM 5.7ml(P/S1%(Irvine Scientific))を加えピペティングを行い6well-plate(PRIME-XV(登録商標)Human Fibronectin(Irvine Scientific) 2.5µg/mlにて12時間コーティング済み)の3-wellにそれぞれ1.9 mlずつ細胞懸濁液を添加することで、細胞を播種した。播種後1週間

10

【0069】

1週間後に、細胞の生着とその後の増殖を確認後、80%コンフルエント状態になったら、細胞をディッシュから回収し、再度6-well-plate(PRIME-XV(登録商標)Human Fibronectin(Irvine Scientific) 2.5µg/mlにて12時間コーティング済み)に 1.0×10^4 cells播種して、培地PRIME-XV(登録商標)MCS X SFM培地を3ml(P/S1%含有)添加した。この細胞群を1継代目として3継代目の細胞を今回の実験に用いることとした。上記で得られた細胞は、歯髄由来幹細胞を含む細胞である。

【0070】

[ゼラチン含有顆粒と幹細胞を含む骨再生剤の調製]

3継代目まで培養した乳歯歯髄由来幹細胞(以下、DDPSCs)を含む細胞を回収し、 1.0×10^5 cells/18µl、 5.0×10^4 cells/18µl、 1.0×10^4 cells/18µlの細胞懸濁液を作製した。窒素雰囲気下で135、4.75時間処理した熱架橋体Fuji Bone Graft(ゼラチン顆粒)を3mg用意し、96well plate上で、先程準備した細胞懸濁液を浸潤させ、37 環境下の炭酸ガスインキュベータ(SANYO MCO-18AIC(UV))(37 環境下CO₂:5%)内にて10分間培養した。その後、Cell reactor 15ml(Greiner bio-one)に、PRIME-XV(登録商標)MCS X SFM(P/S1%)10mlと、先ほど浸潤させたゼラチン顆粒3mgを入れ、Bio shaker(37 環境下)にて24時間振動(振動数118rpm/min)を与えて移植体(ゼラチン顆粒+細胞)の調製を行った。

20

30

【0071】

顆粒3mg当たりの顆粒の数は、平均13個(n=3)であった。 1×10^5 cellsの場合、顆粒1個あたり、約 7.7×10^3 個の細胞となる。

【0072】

ゼラチン顆粒への歯髄由来幹細胞の定着率を測定するために、あらかじめ、ゼラチン顆粒に細胞を浸潤させた後に、ゼラチン顆粒を96well-plateから移動させて、その底面と培地に残っている細胞数を計測した。次に、24時間Bio shakerを与えた後に、Cell reactor内のゼラチン顆粒を移動させて、PRIME-XV(登録商標)MCS X SFMの培地に残存する細胞を回収し細胞数を計測した。これらの計測値からゼラチン顆粒に定着できなかった細胞数を計算して、細胞定着率を検討した。

40

【0073】

上記の検討からゼラチン顆粒への細胞の定着率として、 1.0×10^5 cellsを播種した時の定着率は85.5%、 5.0×10^4 cellsを播種した時の定着率は85.0%、 1.0×10^4 cellsを播種した時の定着率は83.3%の結果を得ることができた。

【0074】

また、細胞を定着させたゼラチン顆粒の切片を作製した場合、ヘマトキシリン・エオジ

50

ン (H E) 染色にて染色を行うことにより、染色像にて確認できる歯髓由来幹細胞の 70 % 以上が、ゼラチン含有顆粒の表面又は表面の孔に付着していることを確認できる。

【 0 0 7 5 】

[ラット頭頂骨欠損モデルでの評価] (W O 1 1 / 0 2 7 8 5 0 の実施例 1 参照)

移植用の動物として、17匹の nude ラット (F 3 4 4 / N J c L - r n u / r n u nude rat、雄、10週齢、0.3~0.5 kg) を用いた。ラットの麻酔には、マウス・ラット等小動物実験用簡易吸入麻酔装置 N A R C O B I T - E (2 型) を用いて、麻酔薬として、イソフルラン吸入麻酔液 (ファイザー) を用い、吸入麻酔により麻酔した (導入が 4.5 %、維持が 3.5 % の濃度)。No 15 メスにてラットの頭蓋皮膚及び骨膜を切開し、剥離して頭蓋骨を露出させた。一定の骨欠損を作製するために、トレフインバー 4.0 mm / 5.0 mm (H a n g e r & M e i s i n g e r) にて、頭蓋骨の中央の縫合部を避けるようにして、頭頂骨の左側の中央に位置するように、直径 5 mm の円形の骨欠損を作成した。

【 0 0 7 6 】

次に、作製した骨欠損部に移植するためのサンプルを準備した。第 1 群は D D P S C s (1.0×10^5 cells / 18 μ l、n = 6) を含むゼラチン顆粒 3 mg、第 2 群として D D P S C s (5.0×10^4 cells / 18 μ l、n = 6) を含むゼラチン顆粒 3 mg、第 3 群として、D D P S C s (1.0×10^4 cells / 18 μ l、n = 5) を含むゼラチン顆粒 3 mg を骨欠損部に移植した。移植後に骨膜を元の位置に戻して、皮膚を絹糸にて縫合した。

【 0 0 7 7 】

移植後、小型実験動物用 3 D マイクログラフ C T C o s m o S c a n G X (R i g a k u) (管電圧 : 9 0 k V 管電流 : 8 8 μ A F O V [m m] : 3 0 x H 3 0 撮影時間 : 1 8 秒 ボクセルサイズ [μ m] : 9 0 x 9 0 x 9 0) による撮影を移植後 4 週目まで各週にて行い、そのイメージ像を基にして、骨形成量の比較を by 4 v i e w e r 2 0 1 1 (k i t a s e n n j u R a d i s t D e n t a l C l i n i c I - V i e w I m a g e C e n t e r , T o k y o , J a p a n) のソフトを用いて行った。

【 0 0 7 8 】

各移植群の骨体積経時変化の測定結果を表 1 及び図 2 に示す。

表 1 及び図 2 に示す結果から、各移植群において骨形成量の増加が認められた。また、D D P C s 1×10^5 cells 移植ラットにおいては、D D P C s 1×10^4 cells 移植ラットに比べ移植後 1 週における骨形成量に有意に高い値が認められた (t 値 = 0.038)。

【 0 0 7 9 】

また、D D P C s 1×10^5 cells 移植ラットと D D P C s 5×10^4 cells 移植ラットの移植後 1 週における骨形成量には優位な差は認められなかった (t 値 = 0.173)。2 週目以降も骨形成量に差は認められたが優位な差は認められなかった。

【 0 0 8 0 】

【 表 1 】

表 1 : 各期間におけるゼラチン顆粒+歯髓由来幹細胞移植群の骨体積 (mm³)

	nude ラットあたり 1×10^5 cells	nude ラットあたり 5×10^4 cells	nude ラットあたり 1×10^4 cells
0 週	0	0	0
1 週	4565.5	2749	929.4
2 週	13912.83333	8432.333333	7269.4
3 週	23677.33333	14759.16667	16488.6
4 週	29372	23045	24771.2

10

20

30

40

50

【0081】

[顎裂部再建モデルでの評価]

3種混合麻酔0.5ml/100g(0.3mg/kgのDOMITOR(登録商標)(Nippon Zenyaku Kogyo Co., Ltd, Japan), 4.0mg/kgのmidazolam(SANDOZ, Japan)、5.0mg/kgのVetorphale(登録商標)(Meiji Seika Pharma Co., Ltd, Japan)及び2.9ml/kgのOtsuka Normal Saline(Otsuka Pharmaceutical Co., Ltd, Japan)を用いて腹腔内麻酔を行う。次に、移植体を移植する空洞を作成する(図3)。まずは、移植部位を作成する側の頬粘膜に絹糸をかけ、モスキートにて伸展し、口蓋部となる術野の視野を確保する。口蓋部の口蓋粘膜の切開にはNo.15のメスをもちいる。切開は、切歯から第一大臼歯方向にむけて、切歯骨体上に骨膜下の骨までの深さで長さ10mmの切開を加える(図3A)。切歯骨から粘膜骨膜弁を剥離すると切歯骨体の皮質骨の表面が観察できる。骨膜まで剥離ができていないと骨が観察できない。切開部の骨膜に沿って、粘膜骨膜を切歯骨側から口蓋骨に沿って、鼻腔方向に向けて剥離を続けると、陥入している口蓋裂が観察できる。この陥入している口蓋裂部に、移植体を移植することになる。次に、鼻中隔側の骨膜を鼻腔側に向けて剥離を続ける。次に、口蓋裂を覆っていた口蓋部の粘膜を粘膜と骨膜に分離する(図3B)。剥離した切歯骨・口蓋骨側の骨膜と鼻中隔側の骨膜を、鼻腔側に滅菌綿球を用いて押し込む(図3C)。メジャーにて口蓋裂部の深さを計測し、口腔粘膜から5mm程度の深さが得られたところで、骨膜を鼻腔側に陥入させることを停める。ここに、インプラント体を移植する部位ができるので、ここに移植体を移植する。

10

20

【0082】

上記で作成した移植体は、2群用意した。第一の群は、ゼラチン顆粒2mgのみを移植する群で、この場合には、SDラット(雄、11週齢、5匹)を用いた。移植体の移植時はラット口蓋裂部からの出血を利用し、血液でなじませてから移植した。この群をコントロール群とした。第二の群は、ゼラチン顆粒2mgに 1×10^5 個の乳歯歯髓由来間葉系幹細胞を播種させた群である。移植には免疫不全のヌードラット(雄、11週齢、5匹)を用いた。細胞の混合体の作製については、前日にゼラチン顆粒(2mg)に 1×10^5 個の乳歯歯髓由来間葉系幹細胞を播種させた。

【0083】

両群のそれぞれの移植終了後に、切歯骨体側(外側)の骨膜に減張切開を行い、ラット口蓋裂上面が骨膜で覆われることを確認し、粘膜骨膜弁を4-0絹糸にて縫合し創を閉鎖した。この縫合により、移植物は移植部位に留まることができた。移植手術が終了した後は、粉餌を与えた。

30

【0084】

移植後の骨の再生程度の評価は移植前と移植後4週においてマイクロCT撮影による観察を行った。撮影条件は、The exposure parameters: 18s, 90kV, and 88 μ A. voxel size: 45 μ m. CT解析ソフトウェア: 3 by 4 viewer 2011(Kitasenju Radist Dental Clinic I-View Image Center, Tokyo, Japan). ROI size: 1.8 \times 2.7 \times 0.9mmとした。

40

【0085】

2群間の新生骨体積量をCT解析により比較した結果を表2及び図4に示す。各移植群の患部CT画像(代表例)を図5に示す。

【0086】

ゼラチン顆粒+乳歯歯髓由来間葉系幹細胞を投与した群、及びゼラチン顆粒を投与した群において、新生骨体積量の増加が認められた。また、移植後4および8週においてゼラチン顆粒+乳歯歯髓由来間葉系幹細胞群の新生骨体積量はゼラチン顆粒のみを移植した群の新生骨体積量と比較して、有意な差をもって高い結果となった。

【0087】

50

【表 2】

各期間におけるゼラチン顆粒移植群の骨体積 (mm³)

	個体 1	個体 2	個体 3	個体 4	個体 5	平均
4 週	0.15066	0.434484	0.395604	0.223074	0.278001	0.2963646
8 週	0.487458	0.591948	0.479682	0.592434	0.71331	0.5729664

各期間におけるゼラチン顆粒+歯髄由来幹細胞移植群の骨体積 (mm³)

	個体 1	個体 2	個体 3	個体 4	個体 5	平均
4 週	0.332424	0.479682	0.58563	0.486486	0.302778	0.4374
8 週	0.603126	0.79947	1.025946	0.885006	0.693036	0.8013168

10

20

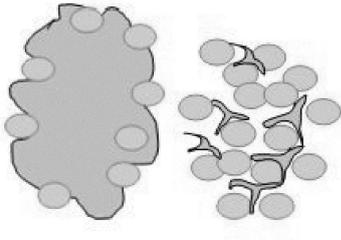
30

40

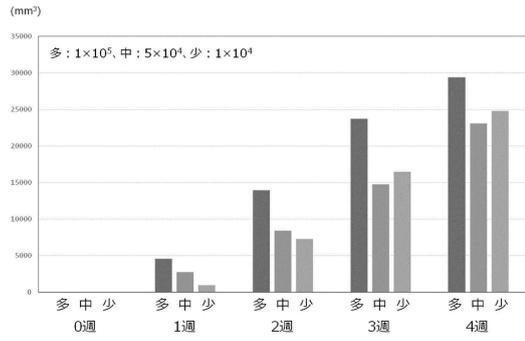
50

【図面】

【図 1】

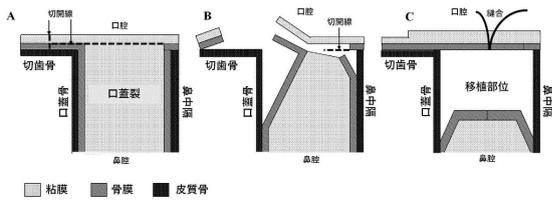


【図 2】

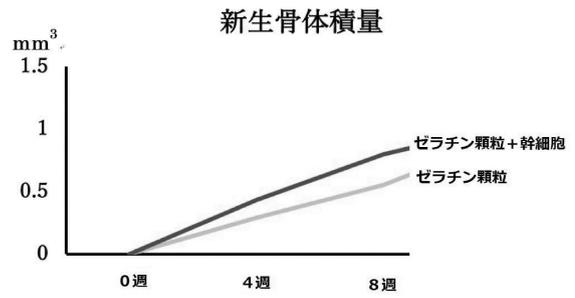


10

【図 3】

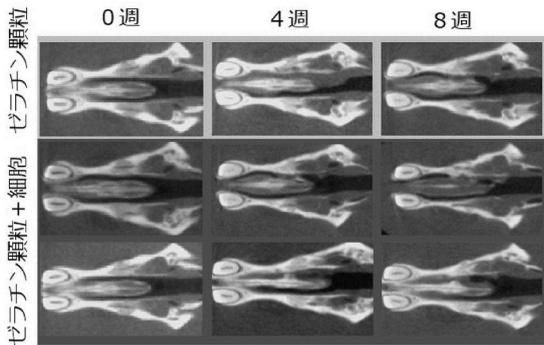


【図 4】



20

【図 5】



30

【配列表】

0007385664000001.app

40

フロントページの続き

(51)国際特許分類	F I		
A 6 1 L 27/38 (2006.01)	A 6 1 L	27/38	1 1 1
A 6 1 L 27/54 (2006.01)	A 6 1 L	27/54	
A 6 1 L 27/22 (2006.01)	A 6 1 L	27/22	
A 6 1 L 27/56 (2006.01)	A 6 1 L	27/56	

愛知県名古屋市千種区楠元町 1 - 1 0 0 愛知学院大学楠元キャンパス内

審査官 池上 文緒

(56)参考文献 国際公開第 2 0 1 6 / 1 4 8 2 4 5 (W O , A 1)
 特開 2 0 0 3 - 2 6 0 1 2 3 (J P , A)
 特表 2 0 0 0 - 5 0 8 9 1 1 (J P , A)
 中国特許出願公開第 1 0 9 2 3 4 2 3 1 (C N , A)
 LI, Xuewen, et al., , Synthesis and Evaluation of BMMSC-seeded BMP-6/nHAG/GMS Scaffold
 ds for Bone Regeneration , Int. J. Med. Sci. , 2016年 , vol.16, no.7 , p.1007-1017
 J. Biomed. Mater. Res. , 2000年 , vol.52, issue 2 , p.246-255

(58)調査した分野 (Int.Cl. , D B 名)

A 6 1 K 3 5 / 2 8
 A 6 1 K 3 5 / 3 2
 A 6 1 K 4 7 / 4 2
 A 6 1 P 1 9 / 0 0
 A 6 1 L 2 7 / 3 8
 J S T P l u s / J M E D P l u s / J S T 7 5 8 0 (J D r e a m I I I)
 C A p l u s / M E D L I N E / E M B A S E / B I O S I S (S T N)