

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公開特許公報(A)

(11) 特許出願公開番号

特開2006-122518  
(P2006-122518A)

(43) 公開日 平成18年5月18日(2006.5.18)

(51) Int. Cl.	F I	テーマコード (参考)
<b>A 6 1 L 27/00 (2006.01)</b>	A 6 1 L 27/00	G 4 C 0 8 1
<b>A 6 1 K 6/00 (2006.01)</b>	A 6 1 K 6/00	Z 4 C 0 8 9

審査請求 未請求 請求項の数 8 O L (全 21 頁)

(21) 出願番号 特願2004-317241 (P2004-317241)	(71) 出願人 504139662 国立大学法人名古屋大学 愛知県名古屋市千種区不老町1番
(22) 出願日 平成16年10月29日(2004.10.29)	(74) 代理人 100095577 弁理士 小西 富雅
特許法第30条第1項適用申請有り	(74) 代理人 100100424 弁理士 中村 知公
	(74) 代理人 100114362 弁理士 萩野 幹治
	(72) 発明者 上田 実 愛知県名古屋市千種区不老町1番 国立大 学法人名古屋大学内
	(72) 発明者 山田 陽一 愛知県名古屋市千種区不老町1番 国立大 学法人名古屋大学内

最終頁に続く

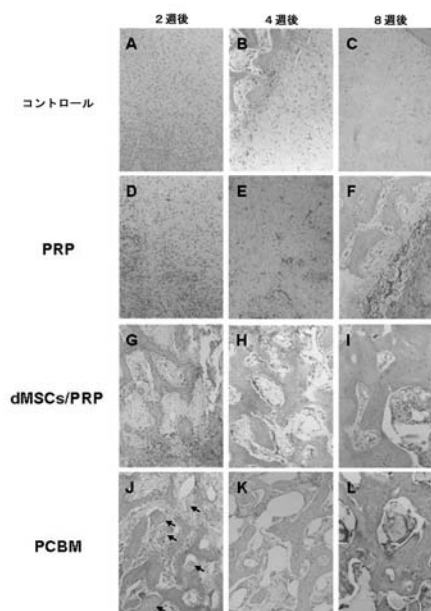
(54) 【発明の名称】 骨又は歯周組織形成用組成物

(57) 【要約】

【課題】 臨床応用可能な骨又は歯周組織の再建(再生)術を確立すべく、それに使用される組成物を提供する。

【解決手段】 所定濃縮率の多血小板血漿 (PRP) と、骨形成能を有する細胞とを組み合わせる骨又は歯周組織形成用の組成物とする。

【選択図】 図4



## 【特許請求の範囲】

## 【請求項 1】

血小板濃縮率が約150%～約1500%の範囲にある、多血小板血漿（PRP）と、骨形成能を有する細胞と、を含んでなる骨又は歯周組織形成用の組成物。

## 【請求項 2】

前記血小板濃縮率が約300%～約600%の範囲にある、請求項 1 に記載の組成物。

## 【請求項 3】

多血小板血漿（PRP）と、骨形成能を有する細胞とを含んでなり、血小板濃度が約200,000個/μL～約6,150,000個/μLの範囲にある、骨又は歯周組織形成用の組成物。

## 【請求項 4】

多血小板血漿（PRP）と、骨形成能を有する細胞とからなる、骨又は歯周組織形成用の組成物。

## 【請求項 5】

使用時において注入容器を用いて注入可能な流動性を有する、ことを特徴とする請求項 1～4 のいずれかに記載の組成物。

## 【請求項 6】

前記細胞が、骨系細胞へと分化誘導された間葉系幹細胞である、請求項 1～5 のいずれかに記載の組成物。

## 【請求項 7】

歯科インプラント、歯周病、嚢胞、抜歯窩、骨延長部、又は顎裂部骨移植部位等に適用される組成物である、請求項 1～6 のいずれかに記載の組成物。

## 【請求項 8】

請求項 1～7 のいずれかに記載の組成物を注入容器に封入してなる骨又は歯周組織形成用注射剤。

## 【発明の詳細な説明】

## 【技術分野】

## 【0001】

本発明は、骨組織又は歯周組織の修復又は再生（再建）に利用できる組成物に関する。

## 【背景技術】

## 【0002】

頭蓋顎顔面外科、形成外科、及び整形外科領域において、骨欠損の再建・修復を目的として数多くの研究が行われてきた。しかし、軟組織及び硬組織の両者に関して、生体適合性材料の使用及び調製には臨床上解決すべき問題が残っている。これまで、脂肪、筋膜、骨片を含む切除自己組織が頻用されてきた。しかしながら、これまでの治療法は個別の問題を抱えるものであった。適切な自己材料はその供給量が限られ、ドナーサイトの罹患性があり、時折、組織質が低いため又は移植片として成形することが困難なために目的の再建術に十分ではない。他家材料であってもドナー不足からその供給量が限られる。一方、人工修復物の使用は感染に対する感受性を増大させ、周囲への侵襲、及び宿主生理機能との長期的な相互作用が不明であるという問題も伴う。

器官臓器移植におけるこれらの問題を解決する手段として、Vacantiら（非特許文献 1～3）は、単離された細胞に生体適合性スキャフォールドと成長因子を組み合わせて形成される構築物を使用して新生組織の形態形成を伴う、“組織工学”と呼ばれる新規技術を提唱した。この技術では通常、細胞-スキャフォールド構築物の観血的移植を要する。この技術を骨芽細胞に適用し、細胞-スキャフォールド構築物を低侵襲性で移植することができるシステムが開発されれば、組織工学の適用範囲は、例えば頭蓋顎顔面再建、形成外科、及び整形外科領域など、多くの領域へと広がる。

## 【0003】

間葉系幹細胞（MSCs）は未分化の細胞として複製することができ、且つ骨、軟骨、脂肪、腱、筋、骨髄間質を含む間葉系組織系列への分化能を有する多能性細胞と考えられており（非特許文献 4、5）、組織工学分野における潜在的有用性の高さから広く注目を集め

10

20

30

40

50

ている。

これまでに、MSCsの単独の使用によって骨組織が修復されることが示されている（非特許文献5、6）。しかし、欠損部をMSCsのみで充たそうとすれば、非常に多くのMSCsを必要とし、また、骨欠損部にMSCsを維持することは難しい。このような理由から、最近では多くの研究者がスキャフォールドとしてのセラミックスの使用を試みている（非特許文献7）

先行する研究において我々は、MSCsと組み合わせた新規な生体吸収性 三リン酸（-TCP）のスキャフォールドとしての骨形成能を検討し、ヒドロキシアパタイト（HA）と比較した（非特許文献8）。この研究の結果、このスキャフォールドは骨形成能を有するものの脆弱であり、また、貫通孔の不足、セラミックスの低吸収性、及び骨誘導特性の不在のために新生骨が骨欠損部へ進入することが妨げられてしまうことが判明した。次に我々は、骨粗鬆症、歯周炎、腫瘍切除による骨欠損を治療又は再建するために自己骨を送達することに使用可能な、低侵襲性で且つゼリー状の柔軟性材料を用いた手法を試みた。まず、注入可能なスキャフォールドとしてフィブリン糊を使用した。注入可能なMSCs / -TCP -フィブリン糊混合物によって、骨芽細胞の良好な移植及び生着に必要な三次元的スキャフォールドを形成することが可能であった（非特許文献9）。骨誘導材料、移植片の凝集剤、及び移植材料としてフィブリンを使用した例が報告されている（非特許文献10、11）。また、自己フィブリン粘着剤内に見出される成長因子の重要性が指摘されている（非特許文献12～14）。そこで我々は、成長因子と修正自己フィブリン糊の混合物からなる、多血小板血漿（PRP）ゲルを使用することを考えた。PRPゲルは、自己全血を複数の異なる条件で遠心処理して得られる、多血小板血漿とトロンビン及び塩化カルシウムを混合することによって得られる。PRPゲルがフィブリン糊と決定的に相違する点は、血小板が高濃度で存在すること、及び本来のフィブリノーゲン濃度があることである。血小板は、トロンビンの存在下でひとたび活性化されれば、無数の因子を放出し、フィブリン塊を形成することによってスキャフォールドを形成し機能するのである。PRPを使用することには、骨再生の増強及び促進、より迅速で且つ予測可能な軟組織治癒等、いくつかの利点がある。モノクローナル技術の使用によって、トランスフォーミング成長因子 1（TGF-1）、トランスフォーミング成長因子 2（TGF-2）及び血小板由来成長因子（PDGF）の受容体が髄様骨内に見つかっている（非特許文献12～14）。モノクローナル抗体を使用した研究によって、高濃度のPDGF及びTGF- が血漿中に存在することが示され、これによってこれらの因子が、自己フィブリンを得ることに使用した元の血漿中に存在することが証明された。

尚、本出願に関連する技術が国際公開第02/17983号パンフレット及び国際公開第02/40071号パンフレットに開示される（特許文献1、2）。

【0004】

【特許文献1】国際公開第02/17983号パンフレット

【特許文献2】国際公開第02/40071号パンフレット

【非特許文献1】Langer, R., and Vacanti, J.P. Tissue engineering. Science 260, 920, 1993.

【非特許文献2】Vacanti, J.P., Morse, M.A., Saltzman, W.M., Domb, A.J., Perez-Atayde, A., and Langer, R. Selective cell transplantation using bioabsorbable artificial polymers as matrices. J Pediatr Surg 23, 3, 1988.

【非特許文献3】Vacanti, J.P. Beyond transplantation. Arch. Surg 123, 545, 1998.

【非特許文献4】Pittenger, M.F., Mackay, A.M., Beck, C.B., Jaiswal, R.K., Douglas, R., Mosca, J.D., Moorman, M.A., Simonetti, D.W., Craig, S., and Marshak, D.R. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. Science 284, 143, 1999.

【非特許文献5】Owen, M., and Friedenstein, A.J. Stromal stem cells: Marrow derived osteogenic precursors. Ciba Found Symp 136, 42, 1998.

【非特許文献6】Kadiyala, S., Young, R.G., Thiede, M.A., and Bruder, S.P. Cultur

10

20

30

40

50

e expanded canine mesenchymal stem cells possess osteochondrogenic potential in vivo and in vitro. *Cell Transplant* 6, 125, 1997.

【非特許文献 7】Bruder, S.P., Kurth, A.A., Shea, M., Hayes, W.C., Jaiswal, N., and Kadiyala, S. Bone regeneration by implantation of purified, culture-expanded human mesenchymal stem cells. *J Orthop Res* 16, 155, 1998.

【非特許文献 8】Boo, J.S., Yamada, Y., Hibino, Y., Okazaki, Y., Okada, K., Hata, K., Yoshikawa, T., Sugiura, Y., and Ueda, M. Tissue-engineered bone using mesenchymal stem cells and a biodegradable scaffold. *J Craniofac Surg* 13, 231, 2002.

【非特許文献 9】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-Maxill Surg* 31, 27, 2003. 10

【非特許文献 10】Rosenberg, M., and Mortenson, W. Considerations in the corticosteroid treatment of bone cysts. *J Pediatr Orthop* 9, 240, 1989.

【非特許文献 11】Schlag, G., and Redl, H. The influence of fibrin sealant on demineralized bone matrix-dependent osteoinduction: A quantitative and qualitative study in rats. *Clin Orthop* 238, 282, 1989.

【非特許文献 12】Bowen-Pope, D.F., Vogel, A., and Ross, R. Production of platelet-derived growth factor-like molecules and reduced expression of platelet-derived growth factor receptors accompany transformation by a wide spectrum of agents. *Pnas* 81, 2396, 1984. 20

【非特許文献 13】Roberts, A.B., and Spron, M.B. Physiological actions and clinical applications of transforming growth factor-beta (TGF-beta). *Growth factors* 8, 1, 1993.

【非特許文献 14】Antonides, H.N., and Williams, L.H. Human platelet-derived growth factors: Structure and functions. *Federation Proc* 42, 2630, 1983.

【非特許文献 15】Wada, K., Niimi, A., Watanabe, K., Sawai, T., and Ueda, M. Maxillary sinus floor augmentation in rabbits: a comparative histologic-histomorphometric study between rhBMP-2 and autogenous bone. *Int J Periodontics Restorative Dent* 21, 253, 2001. 30

【非特許文献 16】Kadiyala, S., Jaiswal, N., and Bruder, S. Culture-expanded bone marrow-derived mesenchymal stem cells can regenerate a critical-size segmental bone defect. *Tissue Engineering* 3, 173, 1997.

【非特許文献 17】Petite, H., Viateau, V., Bensaid, W., Meunier, A., de Pollak, C., and Bourguignon, C. Tissue-engineered bone regeneration. *Nature Biotech* 18, 959, 2000.

【非特許文献 18】Haynesworth, S.E., Goshima, J., Goldberg, V.M., and Caplan, A. I. Characterization of cells with osteogenic potential from human marrow. *Bone* 13, 81, 1992.

【非特許文献 19】Bruder, S.P., Jaiswal, N., and Haynesworth, S.E. Growth kinetics, self-renewal, and the osteogenic potential of purified human mesenchymal stem cells during extensive subcultivation and following cryopreservation. *J Cell Biochem* 64, 278, 1997. 40

【非特許文献 20】Marks, S.C., and Hervey, D.C. The structure and development of bone. In: Bilezikian JP, Raisz LG (ed) *Principles of bone biology*. Academic Press, San Diego, CA, 1996, pp3-14.

【非特許文献 21】Zawicki, D.F., Jain, R.K., Schmid-Schoenbein, G.W., and Chien, S. Dynamics of neovascularization in normal tissue. *Microvasc Res* 21, 27, 1981.

【非特許文献 22】Mundy, G.R., Rodan, S.B., Majeska, R.J., DeMartio, S., Trimmer, C., Martin, T.J., and Rodan, G.A. Unidirectional migration of osteosarcoma c 50

ells with osteoblast characteristics in response to products of bone resorption. Calcified Tissue International 34, 542, 1982.

【非特許文献 2 3】 Hill, P.A., and Orth, M. Bone remodeling. Br J Orthodontics 25, 101, 1998.

【非特許文献 2 4】 Marx, R.E., Carlson, E.R., Eichstaedt, R.M., Schimmele, S.R., Stauss, J.E., and Georgeff, K.R. Platelet-rich plasma, growth factor enhancement for bone grafts. OS OM OP 85, 638, 1998.

【非特許文献 2 5】 Soslau, G., Morgan, D.A., Jaffe, J.S., Brodsky, I., and Wang, Y. Cytokine mRNA expression in human platelets and a megakaryocytic cell line and cytokine modulation of platelet function. Cytokine 9, 405, 1997.

【非特許文献 2 6】 Khouri, R.K., Koudsi, B., and Reddi, H. Tissue transformation into bone in vivo. JAMA 266, 1953, 1991.

【非特許文献 2 7】 Kaban, L.B. Calvarial bone regeneration using osteogenin. J Oral Maxillofac Surg 47, 1187, 1989.

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0005】

以上の背景の下で本発明は、臨床応用可能な骨又は歯周組織の再建（再生）術を確立すべく、それに使用される組成物、及び当該組成物の利用形態（再建方法等）を提供することを目的とする。

【課題を解決するための手段】

【0006】

上記目的に鑑み本発明者らは、多血小板血漿（PRP：Platelet-rich Plasma）が新生骨形成を促す可能性を有し、無害性であり、免疫拒絶を受けないのであり、更には創傷治癒を活性化することに注目した。そこで我々は、自己スキャフォールド（足場）としてのPRPに、インビトロで調製した間葉系幹細胞（MSCs）を組み合わせたものを用いて骨形成の促進を図った。尚、骨形成促進効果を、比較対照としてのスキャフォールド単独で使った場合（PRP群）、自己碎片状海綿骨及び骨髄（PCBM）を使用した場合（PCBM群）と比較した。新生骨の評価には、放射線额的、組織学的解析、及び組織形態計測学的解析を用いた。組織学的観察の結果、移植2週後及び4週後において、コントロール群（欠損のみ）、PRP群、及びPCBM群と比較して、イヌMSCsとPRPの組み合わせを用いた群（dMSCs/PRP群）では良好な成熟骨の形成及び血管新生を認めた。組織形態計測的評価の結果、処置8週後において各群の新生骨の面積は、 $18.3 \pm 4.84\%$ （コントロール群）、 $29.2 \pm 5.47\%$ （PRP群）、 $61.4 \pm 3.38\%$ （PCBM群）、及び $67.3 \pm 2.06\%$ （dMSCs/PRP群）であり、PCBM群、dMSCs/PRP群、及びコントロール群の間に有意差が認められた。

これらの結果から、間葉系幹細胞とPRPの混合物が骨再生（再建）用の材料として極めて有用であることが示された。一方で、使用するPRPの血小板濃縮率（血小板濃度）に注目し、これを検討したところ、骨再生効果が血小板濃縮率（血小板濃度）に依存することが判明した。即ち、所定の血小板濃縮率（血小板濃度）を有するPRPを使用することが、高い骨再生効果を得るために重要であるとの知見が得られた。

本発明は以上の知見を基に完成されたものであって、以下の構成を提供する。

即ち本発明は、血小板濃縮率が約150%～約1500%範囲にある、多血小板血漿（PRP）と、骨形成能を有する細胞と、を含んでなる骨又は歯周組織形成用の組成物である。骨形成能を有する細胞としては、好ましくは、骨系細胞へと分化誘導された間葉系幹細胞が使用される。

本発明の他の一態様では、血小板濃縮率が約300%～約600%の範囲にある、多血小板血漿を用いて組成物が構成される。

また、本発明の一態様では、組成物の血小板濃度が約200,000個/ $\mu\text{L}$ ～約6,150,000個/ $\mu\text{L}$ の範囲にある。

本発明の更なる一態様では、多血小板血漿（PRP）と、骨形成能を有する細胞とからの

み実質的に構成された骨又は歯周組織形成用の組成物が提供される。

本発明の一態様では、明の骨又は歯周組織形成用組成物は、ゲル化材料をさらに含む、骨又は歯周組織形成用の組成物が提供される。ゲル化材料としては、トロンピン及び塩化カルシウムを用いることができる。

本発明の組成物は、使用時において注入容器を用いて注入可能な流動性を有することが好ましい。また、本発明の組成物は、一旦凍結状態にした後、使用時に凍結状態から解凍して使用することができる。

歯科インプラント、歯周病、嚢胞、抜歯窩、骨延長部、又は顎裂部骨移植部位等用として、本発明の組成物を提供することができる。

本発明は他の形態として、上記組成物を注入容器に封入してなる骨又は歯周組織形成用注射剤を提供する。 10

#### 【発明の効果】

##### 【0007】

本発明の組成物を適用すれば、骨（又は歯周組織）欠損部において良好な骨再生（再建）が促される。具体的には、骨系細胞の増殖、分化促進効果を有する成長因子を豊富に含むPRPを含有することによって、これらの成長因子により、適用部位（移植部）において効果的な骨組織（又は歯周組織）の再生が期待できる。また、本発明の組成物では、骨形成能を有する細胞を含有することによって、当該細胞による積極的な骨組織（又は歯周組織）の再生を期待できる。

さらに以上の構成によれば、使用時において流動性を有する状態に移植材料を調製することが可能であるから、骨（又は歯周組織）欠損部の形状に合わせて予め成型する必要がなく汎用的であり、その取り扱いも容易である。 20

加えて本発明によれば、自家骨を採取することなく骨（又は歯周組織）欠損部の修復、再建を行うことができることから、施術に伴う患者への負担を軽減できる。

このように、本発明の組成物は骨（又は歯周組織）再生用の材料として極めて有用である。

#### 【発明を実施するための最良の形態】

##### 【0008】

本発明では、多血小板血漿（PRP）と、骨形成能を有する細胞とを組み合わせる骨又は歯周組織形成用の組成物が構築される。 30

ここで「多血小板血漿」とは、PRP（Platelet-rich Plasma）であって、即ち血小板を豊富に含む血漿である。換言すれば、血小板が濃縮された血漿のことをいう。PRPは、例えば、Whitmanらの方法（Dean H. Whitman et al.: J Oral Maxillofac Surg, 55, 1294-1299 (1997)）に準じて、採取した血液を遠心分離処理に供することにより調製することができる。PRPは、Platelet-derived Growth Factor（PDGF）、Transforming growth factor 1（TGF- $\beta$ 1）、Transforming growth factor 2（TGF- $\beta$ 2）等の成長因子を豊富に含むことが知られている（Jarry J. Peterson: Oral surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod, 85, 638-646 (1998)）。

##### 【0009】

ここで、PRPの調製方法の一例を示せば、まず、採取した血液にクエン酸ナトリウム等の凝固防止剤を添加し、室温で所定時間放置する。その後、血球及び軟膜が分離する条件（例えば約5,400rpm）で遠心処理する。これにより、2層（上層はPlatelet-poor Plasmaと呼ばれる。下層には、血球及び軟膜が含まれる）に分離される。上層を取り除いた後、更に、赤血球が分離される条件（例えば、約2,400rpm）で遠心処理する。その結果得られた赤血球を実質的に含まない画分（Platelet-rich Plasma: PRP）を採取する。PRPの調製方法は当該方法に限定されるものではなく、必要に応じて修正を加えた方法により調製することができる。 40

好ましくは自己血のPRPを用いる。これにより、毒性ないし免疫拒絶反応の恐れがなくなる。

##### 【0010】

PRPに含まれる血小板の数（血小板濃縮率）についての一般的な定義はないが、採取した血液に比較して約150倍～約1500倍の血小板を含有する血漿を本発明におけるPRPとして用いることができる。

本発明においてPRPの「血小板濃縮率」は、次の式で表される。

血小板濃縮率（%）＝（PRP中の平均血小板数／出発材料である全血中の平均血小板数）×100

従って、例えばPRP中の平均血小板数が1,000,000であって、全血中の平均血小板数が300,000であるときの血小板濃縮率は約333%となる。以下の実施例に示すように、本発明者らの検討の結果、PRPの血小板濃縮率が骨（又は歯周）組織の再生効果と関連性を有することが明らかとなった。そこで、一層高い再生効果を得るべく、血小板濃縮率が約150%～約1500%（平均血小板数に換算した場合には通常、約240,000個／ $\mu$ L～約6,150,000個／ $\mu$ Lに相当する）の範囲にあるPRPを用いることが好ましく。更に好ましくは血小板濃縮率が約300%～約600%（平均血小板数に換算した場合には通常、約480,000個／ $\mu$ L～約2,460,000個／ $\mu$ Lに相当する）の範囲にあるPRPを用いる。

10

PRPを調製する際の遠心処理の条件を適宜調節することによって、所望の血小板濃縮率のPRPを得ることができる。例えば、上記の如き二段階の遠心処理を実施することとし、最初の遠心処理を約500rpm～約1500rpm（例えば1,100rpm）、約5分間～約15分間（例えば約5分）の条件で実施し、2段階目の遠心処理を約2000rpm～約5000rpm（例えば約2,500rpm）、約5分間～約15分間（例えば約5分）の条件で実施することで、血小板濃縮率が約300%～約600%の範囲にあるPRPを得ることができる。出発材料である血液や使用する器具の相違によって、同条件で処理したとしても最終的に得られるPRPの血小板濃縮率が変動することが予想されるが、当業者であれば通常、上記条件を考慮しつつ、得られたPRPの血小板濃縮率に基づいて条件の修正を施すことによって、所望の血小板濃縮率のPRPを調製する条件を見出すことができる。

20

尚、PRPの血小板濃縮率の計測は常法（例えば、実施例に示すように市販のSysmex XE-2100（Sysmex、東京、日本）を使用）を利用して行うことができる。

#### 【0011】

本発明の組成物を構築するために使用するPRPの血小板濃縮率は上記の通りであるが、一方で最終的な組成物（本発明の組成物）の血小板濃度は、PRPの血小板濃縮率、PRPとそれに組み合わせる他の成分（即ち、骨形成能を有する細胞等）の使用比率等によって変動するが、例えば約200,000個／ $\mu$ L～約6,150,000個／ $\mu$ L、好ましくは約480,000個／ $\mu$ L～約2,460,000個／ $\mu$ Lである。このような濃度で血小板を含有することによって、良好な骨（又は歯周組織）再生効果が得られる。尚、例えば血小板濃縮率が約300%～約600%の範囲にあるPRPを使用すれば、最終的な組成物の血小板濃度を約480,000個／ $\mu$ L～約2,460,000個／ $\mu$ Lの範囲に調整することが可能である。

30

#### 【0012】

ここで、使用時における本発明の組成物の流動性の程度は特に限定されず、ゲル状、スラリー状、ペースト状、粘土状、高粘度流動体状等とすることができる。好ましくは、ゲル状又はペースト状である。ゲル状又はペースト状とすることにより、可塑性に優れた骨又は歯周組織形成用組成物となる。したがって、予め適用部の形状に成型することなく適用できる。即ち、適用部への適用が容易に行える。また、適用部において定着性の良い骨又は歯周組織形成用組成物となる。

40

また、使用時において、注入容器を用いて注入可能な程度の流動性であることが好ましい。かかる流動性とすることにより、適用部への適用が一層容易となる。

尚、適用部に応じて所望の流動性とすることができる。例えば、骨膜下に注入する場合には、より流動性を有する状態（粘度の低い状態）にすることが好ましい。

本発明の組成物は、少なくとも使用時において流動性を有しておればよく、使用前においては、粉状ないし固形状であっても良い。したがって、凍結した状態をもって本発明の組成物とすることができる。また、凍結乾燥した状態をもって本発明の組成物とすることもできる。使用前において凍結状態又は凍結乾燥状態とすることにより、長期の保存が可

50

能となり、また、使用前の取り扱いも容易となる。さらには、凍結処理又は凍結乾燥処理により抗原性の低下が期待できるため、自家のPRPではなく同種の他家のPRPを用いた場合の安全性が向上される。

#### 【0013】

本発明において「骨形成能を有する細胞」とは骨組織を形成し得る細胞をいい、骨芽細胞、前骨芽細胞、骨系細胞への分化能を獲得した間葉系幹細胞等が含まれる。これらの細胞を任意に組み合わせて用いてもよい。好ましくは、骨形成能を有する細胞として、骨系細胞への分化能を獲得した細胞を用いる。ここで、「骨系細胞への分化能を獲得した」とは、未分化の状態であったものが骨系細胞へ分化すべく方向づけられた状態をいう。

骨系細胞への分化能を獲得した間葉系幹細胞として、自家細胞に限らず、同種由来の他家細胞を用いることができる。特に、人の間葉系幹細胞を用いることができる。

骨系細胞への分化能を獲得した間葉系幹細胞（以下、「骨系分化能獲得細胞」という）は、未分化の間葉系幹細胞を骨系細胞への分化を誘導する条件下で培養することにより調製することができる。例えば、 $\beta$ -グリセロリン酸（ $\beta$ -glycerophosphate）、デキサメタゾン（Dexamethason）、L-アスコルビン酸（L-ascorbic acid）を含む培地で未分化の間葉系細胞を培養することにより、骨系細胞への分化を誘導することができる。もちろん、培養条件はこれに限定されるものではなく、骨系細胞への分化を誘導する条件として公知のものを採用することができる。

#### 【0014】

未分化の間葉系幹細胞源としては、骨髄、骨膜、歯髄、さい帯血を挙げることができる。これらを常法に従い採取した後、未分化の間葉系細胞を接着性の有無により選択する。即ち、骨髄等に含まれる細胞の中で接着性を有するものを選択することにより、未分化の間葉系幹細胞が得られる。

#### 【0015】

骨系分化能獲得細胞とともに、該細胞の細胞外基質をも加えて本発明の組成物とすることができる。本発明の組成物を適用した部位において、細胞外基質が骨分化能獲得細胞の足場となることが期待され、適用部位において骨分化能獲得細胞が定着し易くなると考えられるからである。また、適用部位周囲に存在する骨系細胞の足場ともなり、高い骨誘導能が期待できるからである。さらに、細胞外基質に含まれるBMP等の因子が、本発明の組成物に含有される骨系分化能獲得細胞自体、及び適用部周囲の骨系細胞ないしは骨系細胞への分化能を備えた幹細胞の成長、増殖、分化を促進することが期待できるからである。ここでの細胞外基質とは、骨系分化能獲得細胞を取り巻いて存在する基質（マトリックス）である。

#### 【0016】

自家細胞の細胞外基質に限らず、同種の他家細胞の細胞外基質を用いることもできる。かかる細胞外基質に含まれるBMP等が同種であるため、他家細胞を用いた場合においても同様の効果が期待できるからである。このように、自家細胞の細胞外基質のみならず、同種細胞の細胞外基質をも用いることができることは、骨系分化能獲得細胞の細胞外基質の調製を容易とするものである。

細胞外基質を加える場合には、同時に加えられる骨系分化能獲得細胞は生細胞でなくても良い。このことは、骨系分化能獲得細胞を生細胞の状態に取り扱わなくても良いことを意味し、取り扱いの観点から望ましいものといえる。例えば、骨系分化能獲得細胞を得た後、凍結乾燥処理等をしたものを用意し、これを骨系分化能獲得細胞及びその細胞外基質として用いることができる。

#### 【0017】

本発明の組成物における骨系分化能獲得細胞の含有量は、組成物1ml中に $1 \times 10^5$ 個以上の細胞が存在することが好ましく、さらに好ましくは $1 \times 10^6 \sim 1 \times 10^8$ 個の細胞が存在することが好ましい。かかる細胞含有量とすることにより、効果的に骨形成を誘導できるからである。

#### 【0018】

10

20

30

40

50



本発明の組成物は、上記の各成分を混合することにより調製される。調製方法の一例として、PRPと骨形成能を有する細胞とを組合せ、トロンピン及び塩化カルシウム（ゲル化材料）の作用によってゲル状にする場合の手順を簡単に説明する。まず、PRPと骨形成能を有する細胞をそれぞれ調製し、一つの注入容器内に入れる。このとき少量の空気も一緒に入れる。一方で別の注入容器を用意し、この中に塩化カルシウム溶液とトロンピンとの混合液を入れる。次に、これら二つの注入容器をT型連結具で連結した後、両注入容器のプランジャーを交互に押し込む（引き出す）ことで、二つの注入容器内の成分を混合する。所望の流動性（粘度）が得られるまで混合操作を繰り返す。

#### 【0019】

本発明の組成物を、凍結した状態又は凍結乾燥した状態として調製した場合には、使用時に所望の流動性を有する状態にする。凍結状態の場合には、解凍することにより凍結前の状態に戻される。このとき、生理食塩水等を加えて所望の流動性に調整することもできる。他方、凍結乾燥状態の場合には、生理食塩水等の溶媒を加えることにより、凍結乾燥処理前の流動性又は所望の流動性を有する状態にする。

10

#### 【0020】

本発明の組成物を注入容器に封入することにより、骨又は歯周組織形成用注射剤（以下、「本発明の注射剤」ともいう）とすることができる。例えば、流動性を有する状態で調製した本発明の組成物を注入容器に封入し、その後凍結又は凍結乾燥させて本発明の注射剤とする。このような注射剤とすることにより、取り扱いが一層容易となる。すなわち、適用時に従来のごとく皮膚又は粘膜に切開を加えることなく経皮的又は経粘膜的に本発明の注射剤を注入することで所望の効果を期待できる。このような注射剤は、その中に封入される骨又は歯周組織形成用組成物を上記同様に所望の流動性を有する状態にした後、使用されるものである。注入容器の種類は特に限定されず、例えば、市販の注射器を用いることができる。

20

#### 【0021】

以上説明したように、本発明の組成物は多血小板血漿（PRP）と、骨形成能を有する細胞とを組み合わせた点に特徴を有するが、その骨（又は歯周組織）再生効果が保持されることを条件として、他の成分を含有することを妨げない。但し、本発明の好ましい態様では実質的に、多血小板血漿（PRP）と、骨形成能を有する細胞のみ（使用時にはゲル化を促す成分が含有される）から組成物が構成される。

30

以下に、本発明の組成物において、追加的に組み合わせることが想定され得る成分を列挙する。

#### 【0022】

（無機系生体吸収性材料）

無機系生体吸収性材料の種類は特に限定されないが、リン酸三カルシウム（TCP）、 $\beta$ -リン酸三カルシウム（ $\beta$ -TCP）、リン酸四カルシウム、リン酸八カルシウム、及び非結晶質リン酸カルシウムからなる群から選択される材料を用いることができる。これらの材料は単独で用いることができることはもちろんのこと、任意に選択した2種以上を組み合わせても良い。好ましくは、 $\beta$ -TCP又は $\beta$ -TCPのいずれか、又はこれらを任意の割合で組み合わせ用いる。さらに好ましくは $\beta$ -TCPを無機系生体吸収性材料として用いる。

40

無機系生体吸収性材料は公知の方法により得ることができる。また、市販される無機系生体吸収性材料を用いることもできる。 $\beta$ -TCPとしては、例えば、オリンパス光学工業株式会社製のものを利用できる。

#### 【0023】

無機系生体吸収性材料は、本発明の組成物が使用時において流動性となるような粒子径を有する粉末状であることが好ましい。

粉末状の無機系生体吸収性材料は、適当な大きさに加工された無機系生体吸収性材料を、所望の粒子径となるまで破碎、粉碎することにより調製することができる。無機系生体吸収性材料の平均粒子径を、 $0.5\ \mu\text{m} \sim 50\ \mu\text{m}$ とすることが好ましい。さらに好まし

50

くは、平均粒子径  $0.5 \mu\text{m} \sim 10 \mu\text{m}$  の無機系生体吸収性材料を用いる。さらにさらに好ましくは、平均粒子径  $1 \mu\text{m} \sim 5 \mu\text{m}$  の無機系生体吸収性材料を用いる。粒子径の異なる複数種類の無機系生体吸収性材料を組み合わせることも可能である。

無機系生体吸収性材料は本発明の組成物全体に対して  $30 \text{重量}\% \sim 75 \text{重量}\%$  含有することが好ましい。

尚、本発明の組成物の流動性は、無機系生体吸収性材料の粒子径、及び含有率で調整することができ、両者を適宜調整することにより所望の流動性を得ることができる。また、後述の増粘剤を添加する場合には、増粘剤の添加量によっても流動性の調整を行うことができる。

#### 【0024】

(ゲル化材料)

例えば、トロンピンと塩化カルシウムを添加して本発明の組成物を構成することができる。これらを添加することにより、トロンピンがPRP中のフィブリノーゲンに作用しフィブリンが生ずる。そして、フィブリンの凝集作用により粘性が増加する。ゲル化剤の種類は特に限定されず、上記のようにPRP中の成分に作用して粘性を増加させるもの、又はそれ自身により増粘効果を奏するものを適宜選択して用いることができる。

また、上記のゲル化材料に加えて、適用後(移植後)に作用して本発明の組成物の流動性(粘度)を変化させる第2のゲル化材料を併用することもできる。このような構成とすれば、使用時には適度な流動性を有するために移植が容易であり、かつ、適用後にはより粘度が増すことにより適用部位における定着性が向上し、骨又は歯周組織の修復又は再生を効果的に行うことができる。また、予め適用部位の形状に成型する必要がなく、汎用性が高い。

ゲル化材料は、生体親和性が高いものを用いることが好ましく、上記の例の他、コラーゲン又はフィブリン糊等を用いることができる。コラーゲンとしては種々のものを選択して用いることができるが、本発明の組成物の適用目的(適用組織)に適したものを採用することが好ましい。骨組織の再生を目的とする場合には、例えば、I型コラーゲンを用いることができる。用いるコラーゲンは可溶性(酸可溶性コラーゲン、アルカリ可溶性コラーゲン、酵素可溶性コラーゲン等)であることが好ましい。

#### 【0025】

(増粘剤)

増粘剤を添加することにより、本発明の組成物の流動性を調整することもできる。増粘剤としては、アルギン酸ナトリウム等の増粘多糖類、グリセリン、ワセリン等を用いることができるが、安全性及び/又は骨形成能の観点から、生体親和性が高く、かつ生体吸収性又は生体分解性のものを用いることが好ましい。グリセリン等を添加することにより、凍害防止の効果も得られる。

#### 【0026】

(溶媒)

本発明の組成物は、水系の溶媒を含むものであってもよい。水系の溶媒としては、滅菌水、生理食塩水、リン酸塩溶液等の緩衝液等を用いることができる。

#### 【0027】

(その他)

本発明の組成物は、上記の成分の他、安定化剤、保存剤、pH調整剤等を含んでいても良い。また、成長因子、特に骨誘導因子(BMP)を含ませることもできる。

#### 【実施例1】

#### 【0028】

<材料と方法>

##### 1. イヌ動物モデル

本研究における全ての動物実験は、動物実験委員会によって承認されたプロトコールに厳密に従って実施した。所定飼育後、4匹の成体雑種犬(平均2歳)に全身麻酔下で施術した。下顎第一小白歯、大白歯、及び第二、第三小白歯を抜歯し、治癒期間を二月とした

10

20

30

40

50

。直径10mmのトレフィンバーを用いて下顎の両側に、外側皮質に垂直になるように骨欠損を形成した。このように形成した骨欠損部に、以下の移植材料、即ちPRP、PRPとイヌMSCs (dMSCs)、PCBM、及びコントロール(欠損のみ)を移植し、骨形成を観察した。骨再生において三カ所の骨欠損を作製し、部位的差異がないように、これら4種類の材料を3移植部にランダムに移植した。また、PCBMは腸骨稜より採取した。

#### 【0029】

##### 2. MSCの単離及び培養

dMSCs(イヌ間葉系幹細胞)は、イヌ腸骨稜骨髓より穿刺し、既報の方法に従って単離した(非特許文献6)。簡単に説明すると、基本培地、低グルコースDMEM及び成長補助剤(間葉系細胞成長添加剤を50mL、200mMのL-グルタミンを10mL、及び2.5ユニットのペニシリン及び25 $\mu$ gのストレプトマイシンを含有するペニシリン-ストレプトマイシン混合物を0.5mL)をBioWhittaker(Walkersville, MD, USA)より購入した。骨形成を誘導するための3種類の添加剤、即ち、デキサメタゾン(Dex)、 $\beta$ -グリセロリン酸ナトリウム( $\beta$ -GP)、及びL-アスコルビン酸二リン酸塩(AsAP)をSigma(St. Louis, MO, USA)より購入した。95%空気及び5%CO<sub>2</sub>の湿潤雰囲気中、37 $^{\circ}$ Cで細胞を培養した。3.1 $\times$ 10<sup>3</sup>細胞/cm<sup>2</sup>の濃度でdMSCsをコントロール培地に接種した。基質としてp-ニトロフェニルホスファターゼを用いたアルカリフォスファターゼによるアルカリフォスファターゼ(ALP)染色法によって、分化したdMSCsを確認した。コントロール培地で培養したdMSCsはALP活性が低く、骨形成用添加物を含む培地で培養した場合の処置6日後の結果によれば、経時的にALP活性の劇的な上昇を示した。培養後、dMSCsをトリプシン処理し、移植に使用した。

#### 【0030】

##### 3. PRP、PRPゲルの調製、及びMSCs/PRP混合物の注入

約50mLの全血をイヌから採血し、保存剤非含有のヘパリン(250U/mL)とともに10mLの培養液を含む遠心チューブに入れた。血液は最初に標準的な実験室用遠心機(Himac CT、日立社、東京、日本)を用いて1100rpm、5分間の条件で遠心処理した。続いて、黄色の血漿(血小板と白血球を含んだ軟膜を含む)をカニューレで単層中間層を採取した。血小板をペレットにするために、2500rpm、5分の条件で2回目の遠心処理を行った。そして、乏血小板血漿(PPP)であって、細胞含有量の比較的少ない血漿上清を除去した。得られた血小板ペレット、即ち軟膜/血漿フラクション(PRP)を、残りの血漿5mLに懸濁し、血小板ゲルに使用した。PRPとPPP内の血小板数はSysmex XE-2100(Sysmex、東京、日本)で測定した。その結果、全血小板数は平均値295,000(224,000~333,000の範囲)であった。一方、PRPの血小板数は平均値1,293,400(935,000~1,840,000の範囲)であった。これらの測定結果によって、血小板が分離できていることが確認できるとともに、PRPにおける濃縮の割合は438%(対全血血小板数(100%))であることが判明した。PRPは、使用時まで一般的な振盪機内において室温で保存した。粉状ウシトロンピン(10,000ユニット)を別の滅菌容器内で10%塩化カルシウム溶液10mLに溶解した。次に、3.5mLのPRP、dMSCs(1.0 $\times$ 10<sup>7</sup> cells/mL)、及び0.5mLの空気を5mL注射器内に吸引し、また第2注射器(2.5mL)内には500 $\mu$ Lのトロンピン-塩化カルシウム混合物を吸引した。ここで細胞を直接PRP内に再懸濁した。上記二つの注射器を三方活栓で連結し、両注射器内で交互に混合し、これによって二つの注射器間を空気のバブルが行き来するようにした。フィブリンに作用し不溶性ゲルを形成させるといふ、トロンピンの効果によって、5~30秒内で内容物がゲル状の粘度を呈したようであった。得られたゲルを、5mL注射器に取り付けた16ゲージの針を使用して骨欠損部に注入した。各検体を、注入2週後(n=6)、4週後(n=6)、8週後(n=6)に分析した。放射線学的評価のために、全身麻酔下で横面のX線写真を撮影した。

#### 【0031】

##### 4. 組織学的及び組織形態計測学的分析

移植2週後、4週後、及び8週後に、トレフィンバーを用いて各移植部を切り出し(直径2mm)、組織学的及び組織形態計測学的分析に供した。標本は10%ホルマリン緩衝液で固定し、脱灰し(K-CX; Falma、東京、日本)、そしてヘマトキシリン・エオジン染色に供

した。これらの標本を光学顕微鏡下で観察し、また骨形成の有無を著者を含め、病理学者にも盲検で分析させた。

組織形態計測学的分析のデータはマイクロコンピュータでイメージ解析した。トレフィンバーで切り出した移植部（直径2mm）における、上記標本の各イメージをカラーリバーサルフィルムにコピーし、8ビット密度値の256×256アレイとしてデジタル化した後、マイクロコンピュータに移して解析した（NIH-Image、バージョン1.61；National Institutes of Health）（非特許文献15）。再生された領域は、トレフィンバー（直径10mm）で切り出した下顎骨内に含まれている領域と定義された。再生された領域における新生骨の量は、このコンピュータベースのイメージ分析システムで測定した。存在する骨のパーセンテージとして計算し、測定領域から正常骨部位を差し引いた。

10

#### 【0032】

##### 5．統計学的解析

各群の平均値及び標準偏差を各測定パラメータについて計算した。コントロール群、PRP群、dMSCs/PRP群、及びPCBM群間の新生骨における相違は、分散の分析（ANOVA）で解析した。Mann-Whitneyで、各治療期間での新生骨の相違を評価した。p値<0.05のときに統計的に有意とした。

#### 【0033】

##### 6．PRPの血小板濃縮率と骨再生効果との関係

遠心処理の条件を変えることによって、血小板濃縮率の異なるPRPを調製した（血小板濃縮率：100～1500%）。各PRPについて、dMSCと組み合わせたときの骨再生効果を上記同様の方法で評価・比較した。

20

#### 【0034】

##### <結果>

##### 1．イヌ下顎における骨欠損モデルの形成

図1に、自然には骨が再生しない環境を得るために、イヌの下顎内に10mm長の欠損を形成する実験手法を示す。移植体（インプラント）の骨再生能は放射線的、組織学的検討、及び組織形態学的解析で評価した。

#### 【0035】

2．PRP、dMSCs/PRP、及びPCBMのコントロールに比較した、In vivo肉眼的所見、X線の評価、及び組織学的評価

30

PRP、dMSCs/PRP、及びPCBMをイヌ下顎内の10mm欠損部に移植した。肉眼的所見において、dMSCs/PRP群とPCBM群では本来の骨レベルであったが、PRPによる再生及びコントロール群では完全には復元再生されていなかった。dMSCs/PRPスキャフォールドは、移植後感染なく、ほとんど完全に消失していた（図2A、パネルa-c）。

X線撮影及び組織学的評価を2週毎に実施することで骨再生とインプラントを評価した。PRP群とコントロール群では、骨再生が欠損部底部からゆっくりと拡がっていた。PCBMを充填した欠損部は移植8週後においてX線透過性であった。このことは、PCBMが吸収されたことを示す。これに対して、dMSCs/PRPを充填した欠損部では良好な骨形成が認められ、移植体の吸収とほぼ同じ速度で骨形成が起きていることが示唆された（図2B）。移植部及びコントロール群（移植なし）の各領域を2週後、4週後、及び8週後に採取し、所定の処理及び脱灰して組織学的解析に供した。X線学的評価は組織学的解析の結果を裏づけるものであった。コントロール群及びPRP群では皮質辺縁骨の連続性は回復せず、欠損部に血管性及び線維性組織が侵入し、新生骨形成はほとんど見られなかった（図3及び4、パネルA-C及びD-F）。一方、dMSCs/PRP群では2週後においても新生骨形成が見られ、8週後には層板構造が認められており、豊富な血管形成も確認された（図3及び4、パネルG-I）。このパターンは正常な骨マクロ構造を反映しており、PCBMの吸収による空洞を示したPCBM群に比較して、良好に分化した骨髓腔及び皮質骨を有していた（図3及び4、パネルH及びK）。

40

#### 【0036】

##### 3．組織形態計測学的解析

50

全てのインプラントの骨再生能を、皮質骨及び骨髄骨表面をイメージ解析で測定することによって評価した(表1)。PRPを欠損部に加えた場合には、コントロール群と比較して、皮質及び骨髄骨表面の有意な増加を認めなかった。これに対してdMSCs/PRP群及びPCBM群では、コントロール群(2週後及び8週後 $p<0.001$ 、4週後 $p<0.005$ 、ANOVA)およびPRP群(2週後及び4週後 $p<0.05$ 、8週後 $p<0.001$ 、ANOVA)と比較して、全ての測定時点で皮質及び骨髄骨表面の有意な増加を認め、X線学的実験結果、及び組織学的実験結果が確認された。しかしながら、dMSCs/PRP群とPCBM群の間では、長期的には新生骨に有意差は認められなかった。

【0037】

#### 4. PRPの血小板濃縮率と骨再生効果との関係

血小板濃縮率の異なる複数のPRPを調製した。各PRPについて、dMSCと組み合わせたときの骨再生効果を評価・比較した。その結果、PRPの血小板濃縮率が150%~1500%の範囲において良好に骨再生が認められた。特に、血小板濃縮率が300%~600%の範囲では、骨再生効果が非常に高い。

【0038】

#### <考察>

組織工学的アプローチでは、多孔質セラミックス製スキャフォールド上に播種されたMSCsを利用した新生骨形成が試みられてきた(非特許文献7、16、17)。これらの試みによって、ハイドロキシアパタイトベースのセラミックスが有する、吸収速度が遅いという性質による次善の結果がもたらされた。我々の以前の研究では、生体分解性材料である-TCPブロックにMSCsを保持させたものを使用し、その結果、優れた骨形成能を認めた(非特許文献8)。しかし、これらの送達用物質は良好な可塑性を有さず、移植手順は複雑であって移植手段に問題があった。最適には、これらの物質には適切な生体内分解速度と各細胞の増殖を許容する能力が要求される。本研究において我々はPRPとMSCsの組合せを用い、それがスキャフォールドの進行性かつ完全吸収をもたらし、比較的成熟した再生骨を形成させることを見出した。我々の知見によれば、MSCsとの組合せで用いた場合には、その生体材料(PRP)はほとんど完全に消失し、適切な構造を備える成熟骨に早い段階で置き換わっており、これによって本当の骨再生を示した。この結果は今回初めて得られたものである。コントロール群では欠損部が軟組織に取り囲まれており、治癒しなかった。これによって、設定した欠損の大きさが、実験の効果を評価する上で適切であることが確認された。我々はまた、細胞源によって治癒の程度が有意に異なることを見出した。PRPのみで欠損部を満たした場合には十分な骨形成は生じなかった。骨髄からの多能性MSCsの培養法が向上したこと(非特許文献18)、及び骨芽細胞系列へMSCsの分化を方向付けることが可能であることが示されたことによって、骨再生へのMSCsの使用が可能であることが示唆されている。確かにMSCsは、骨形成能を失うことなく細胞分裂を多く繰り返すことができる(非特許文献19)。MSCsの増殖的培養によって、臨床での骨形成及び修復に使用できるであろう、骨形成能を有する細胞を数多く作り出すことができる(非特許文献7)。一方、dMSCs/PRPによる組織工学的再生骨では良好な結果が得られ、PRPがMSCsに対してプラスの影響を与えたことが示唆された。PRPスキャフォールドはMSCsの接着、増殖及び分化を促し、骨形成能を發揮させるものと考えられる。骨形成には、十分に発達した血管の供給が必要であることから(非特許文献20)、移植されたスキャフォールドでは血管形成が生ずると考えられる。我々は、dMSCs/PRP群では良好に血管形成が生ずることを見出した。理想的には、新生骨形成と釣り合いのとれた速度(2,3週)でスキャフォールドが吸収される必要がある。ほとんどのハイドロキシアパタイト、-TCPセラミックス、または珊瑚のスキャフォールド(非特許文献17)では、移植後の数週間では実質的な分解が生じない。これに対して本研究の実験系では、おそらく、dMSCs/PRPの消退に応じて骨組織形成が誘導され、周囲環境に応じた自己細胞による骨形成が行われたと考えられる。

ウサギ耳房での血管形成の平均速度は0.09~0.25mm/日と推定されている(非特許文献21)。イヌにおいても同等の速度であると仮定すれば、少なくとも20日以内に移植物中

10

20

30

40

50

心に血管が到達するはずである。血管形成の不足に起因して移植体中心で多くの細胞死が生ずる可能性があるものの、本研究における組織工学的再生骨で得られた結果は、良好な細胞生存率と骨新生におけるMSCsの直接的関与が示唆される。従って、PRPが血管形成を促したものと考えられる。

#### 【0039】

未分化間葉系幹細胞の増殖、骨芽前駆細胞（骨前駆細胞（osteoprogenitor）、前駆骨芽細胞（preosteoblast））への分化、骨芽細胞の成熟化、マトリックス（I型コラーゲン）形成、及び最終的な石灰化を伴う複雑なカスケード事象の結果として骨形成が起きる（非特許文献22、23）。最初の事象は骨芽細胞の走化性誘導であろう。OwenとFriedensteinは、骨髄由来及び末梢由来前駆細胞が骨及び軟骨を産生することを、数多くのin vivo及びin vitroでの研究で示すとともに、分化過程が多くのサイトカインの影響を強く受けることを示した（非特許文献5）。本研究の系では、dMSCs/PRPの使用によって、より迅速且つ効果的な骨再生を達成できる条件となった。PRPは、自己の血小板由来成長因子（PDGF）源であり、トランスフォーミング増殖因子（TGF- $\beta$ ）等を含む。また、凝集塊であるPRPゲルは操作性がよい。しかし、成長因子の活性の維持を考慮すれば迅速に適用する必要がある。創傷部における血小板の生存期間およびその成長因子による直接的効果が得られる期間は5日以内である（非特許文献24）。これらの成長因子に加えて、血小板内の他のタンパク質（非特許文献25）が、他の細胞源から放出されるサイトカインとともに作用して止血現象を調節するのである。本研究の結果は、創傷部におけるPRPの適用による増強された成長因子濃度が軟組織の修復及び骨再生を向上させたことを示唆する。

Khouriらは、組織変換（ティッシュ・トランスフォーメーション）によって、様々な所望形状の、自己の且つ良好に血管形成された骨を実験的にin vivoで形成することに成功している。この組織変換は筋、軟骨、及び骨などの間葉系組織の変換であって、BMP-3と同一である骨誘導因子オステオゲニン（osteogenin）及びその親物質であるDMP（deminerIALIZED bone matrix）によって誘導される（非特許文献26）。コンセプトがしっかりしていること、及び実験データの有効性にもかかわらず、この手法は広く使用されるに至っていない。その理由は、臨床使用が許諾されたDBMを定常的に供給することが困難であり、DBMは死体の骨から調製しなければならず、さらには日本では承認されていないからである。さらに重要なことには、使用するDBMによって誘導性が様々であることから、遠位筋弁移植及び組織成形であっても、ほとんどの外科医はこれの使用を試みられない（非特許文献27）。また、この方法は他の部位への侵襲を伴う。さらに、オステオゲニンを容易に且つ毒性又は免疫源性的の問題なく精製することは難しい。一方、我々の方法では組織工学による自己骨再生を伴い、それは無毒性であり、非免疫源性であり、さらには最低限の侵襲性で実施できるとともに優れた可塑性が得られる。

#### 【0040】

以上をまとめると、我々の研究によって、dMSCs/PRP移植体は、自己骨移植と同様に、本当の骨再生を誘導でき、それは臨床的に意義のある容積の骨欠損部における完全な生体材料の消失、及びPRPによる骨・軟骨組織の形成を伴うことが示された。また、PRPは自己調製物であり、施術時に調製することができることから、他家又は異種調製物を使用する際に伴う感染及び免疫反応のおそれがなく、実験室での間違いによるサンプルの取り違いのおそれもない。さらに、dMSCs/PRP混合物は注入によって適用でき、ホスト内で凝固し、時間をかけて骨に置換されることから、口腔顎顔面領域及び再建術において将来的に極めて有望な方法である。

本研究において示した方法は、カスタマイズされた自己骨移植に向けた重要な一歩となる。理論的には、最低侵襲性での生検によって自己のMSCsを得ることができ、続いてMSCsをin vitroで骨芽細胞として分化する細胞へと誘導し、その後制御された状態で再移植し、直接的な輪郭造成、再建、及び歯周病、歯科インプラントのために骨再生させることができる。dMSCs/PRP混合物について得られた実験データによって、MSCsが効率的にPRP内へ又それを通して移動することが示された。PRPは、細胞構造を変形させることなくMSCの増

殖を促し、適切な送達物質として作用する。PRPは、注入による細胞の送達のための極めて好適な媒体として、臨床の場で骨欠損を修復又は再建するために有用であろう。

【産業上の利用可能性】

【0041】

本発明の骨又は歯周組織形成用の組成物は、骨組織又は歯周組織の修復、再生が必要とされる各種の分野に適用することができるものである。例えば、高度な骨吸収が認められる顎堤に人工歯根の植立を行う場合の骨増生に適用することができる。また、外傷、各種骨疾患により生ずる骨欠損部における骨組織の再生、骨の補強又は補填に適用することができる。また、歯周病等による歯槽骨の欠損部における歯槽骨、歯周組織の再生に適用することができるものである。適用方法としては、ゲル状、ペースト状等の組成物を適用部位に填入、注入、又は塗布等する。

10

【0042】

本発明の骨又は歯周組織形成用組成物には、骨形成系の細胞の増殖或いは分化を促進させる能力をもつ成長因子が数多く含まれる。従って、適用部（移植部）において、骨形成系の細胞を効率的に増殖或いは分化させ、骨組織又は歯周組織の形成を促進することができる。自家のPRPを用いることにより、毒性がなく、しかも免疫非活性である上記の成長因子により、骨組織又は歯周組織の再生は、質、量ともに向上するものと考えられる。また、ゲル状等の流動性であるため、注射針等を用いて適用部に容易に填入でき（創部を開放することなく適用することも可能である）、また、骨欠損部の形状に合わせて予め成型することを要せず、その汎用性が高い。このように、本発明の骨又は歯周組織形成用組成物を用いることにより、自家骨を採取して移植に供する必要がなくなり、容易に骨又は歯周組織の増生を図ることが可能となる。

20

【0043】

この発明は、上記発明の実施の形態及び実施例の説明に何ら限定されるものではない。特許請求の範囲の記載を逸脱せず、当業者が容易に想到できる範囲で種々の変形態様もこの発明に含まれる。

本明細書の中で明示した論文、公開特許公報、及び特許公報などの内容は、その全ての内容を援用によって引用することとする。

【図面の簡単な説明】

【0044】

【図1】実験プロトコールを示す。

30

【図2】(A)骨再生の肉眼的所見：(a)イヌ下顎における実験デザイン、トレフィンバーで直径10mmにて作製。(b)骨欠損部内の移植材料。(c) dMSCs/PRP群、PCBM群及びコントロール群の骨再生（移植8週後）。dMSCs/PRP群及びPCBM群では本来の骨レベルであったが、PRP又はコントロール群では完全には再生されなかった。(B)X線による評価：(a)移植後のX線像。(b)移植2週後のX線像。コントロール群の欠損部において骨形成がないことに注目。PCBM群において移植したPCBMを認め、またdMSCs/PRP群で骨形成を認める。(c)移植4週後のX線像。dMSCs/PRP群及びPCBM群では、コントロール群と異なり、欠損部内に骨形成を認める。(d)移植8週後のX線像。PCBMで欠損部を埋めたものは8週後で放射線透過性であり、PCBMの吸収を示す。対照的に、dMSCs/PRPのインプラントで欠損部を埋めたものでは良好な骨形成を示した。

40

【図3】(A-L)コントロール群、PRP群、PCBM群、dMSCs/PRP群の2、4、8週後の組織学的評価：低倍率。各群について代表的な移植物の切断面。ヘマトキシリン・エオジンで染色した。オリジナル倍率：(A-L)×40。(A)コントロール群の2週後；(B)コントロール群の4週後；(C)コントロール群の8週後；(D)PRP群の2週後；(E)PRP群の4週後；(F)PRP群の8週後；(G) dMSCs/PRP群の2週後；(H) dMSCs/PRP群の4週後；(I) dMSCs/PRP群の8週後；(J)PCBM群の2週後；(K)PCBM群の4週後；(L)PCBM群の8週後。(A-L)コントロール群、PRP群、PCBM群、dMSCs/PRP群の2、4、8週後の組織学的評価：低倍率。各群について代表的なインプラントの切断面。ヘマトキシリン・エオジンで染色した。オリジナル倍率：(A-L)×40。(A)コントロール群の2週後；(B)コントロール群の4週後；(C)コント

50

ロール群の8週後；(D)PRP群の2週後；(E)PRP群の4週後；(F)PRP群の8週後；(G) dMSCs/PRP群の2週後；(H)dMSCs/PRP群の4週後；(I)dMSCs/PRP群の8週後；(J)PCBM群の2週後；(K)PCBM群の4週後；(L)PCBM群の8週後。

【図4】コントロール群、PRP群、PCBM群、dMSCs/PRP群の2、4、8週後の組織学的評価：高倍率。各群について代表的な移植物の切断面。ヘマトキシリン・エオジンで染色した。オリジナル倍率：(A-L)×200。(A)コントロール群の2週後；(B)コントロール群の4週後；(C)コントロール群の8週後；(D)PRP群の2週後；(E)PRP群の4週後；(F)PRP群の8週後；(G) dMSCs/PRP群の2週後；(H)dMSCs/PRP群の4週後（活性血管形成が見られる）；(I)dMSCs/PRP群の8週後（層状骨が観察される）；(J)PCBM群の2週後（矢印、移植PCBM）；(K)PCBM群の4週後（空洞が見られる、移植PCBMの吸収に起因）；(L)PCBM群の8週後。

10

【図5】組織形態学的解析結果をまとめた表である。全てのインプラントの骨再生能を、皮質及び髄質骨表面をイメージ解析で測定することによって評価した。有意性：\* $p<0.005$ 、\*\* $p<0.001$

### 【図5】

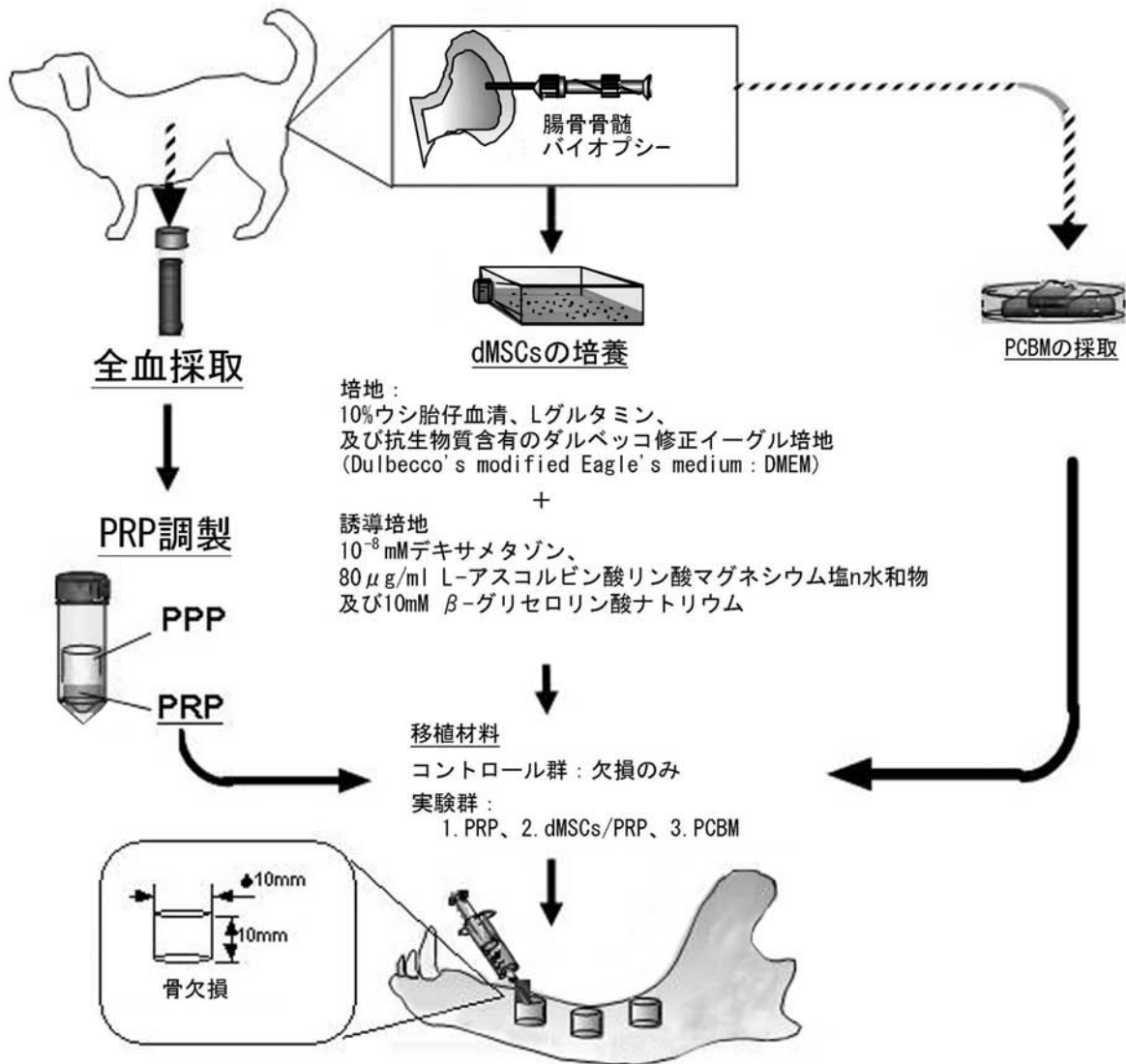
表1 組織形態学データ

	2週後 (%)	4週後 (%)	8週後 (%)
コントロール群	9.96±4.97	14.9±4.41	18.3±4.84
PRP 群	8.01±3.67	19.9±5.13	29.2±5.47
dMSCs/PRP 群	29.2±3.93	36.8±4.79	67.3±3.38
PCBM 群	34.1±6.86	38.7±5.93	61.4±2.06

有意性：\* $p<0.005$ 、\*\* $p<0.001$

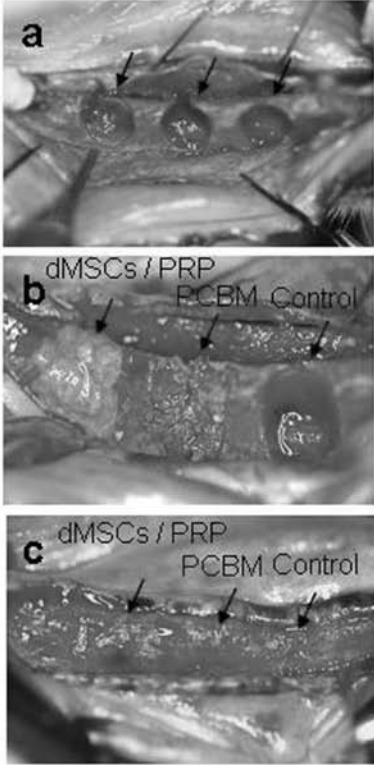


【 図 1 】

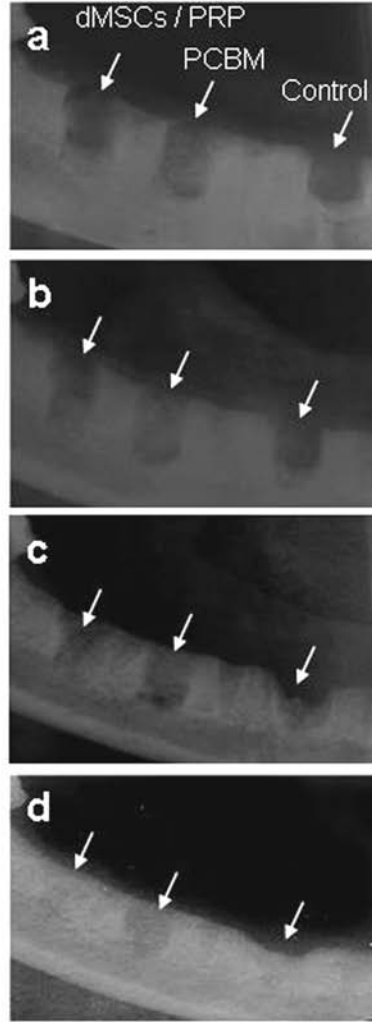


【 図 2 】

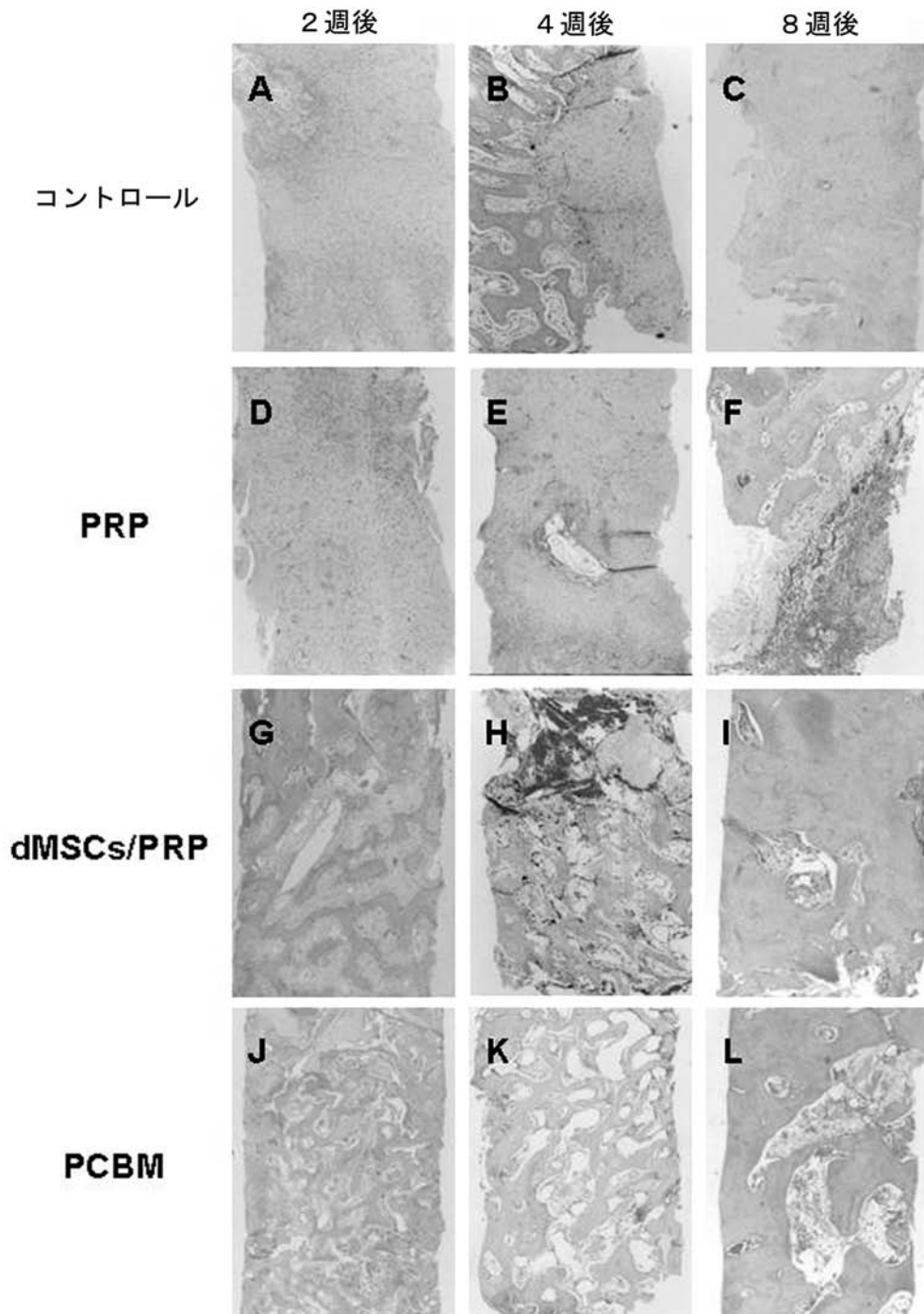
**A**



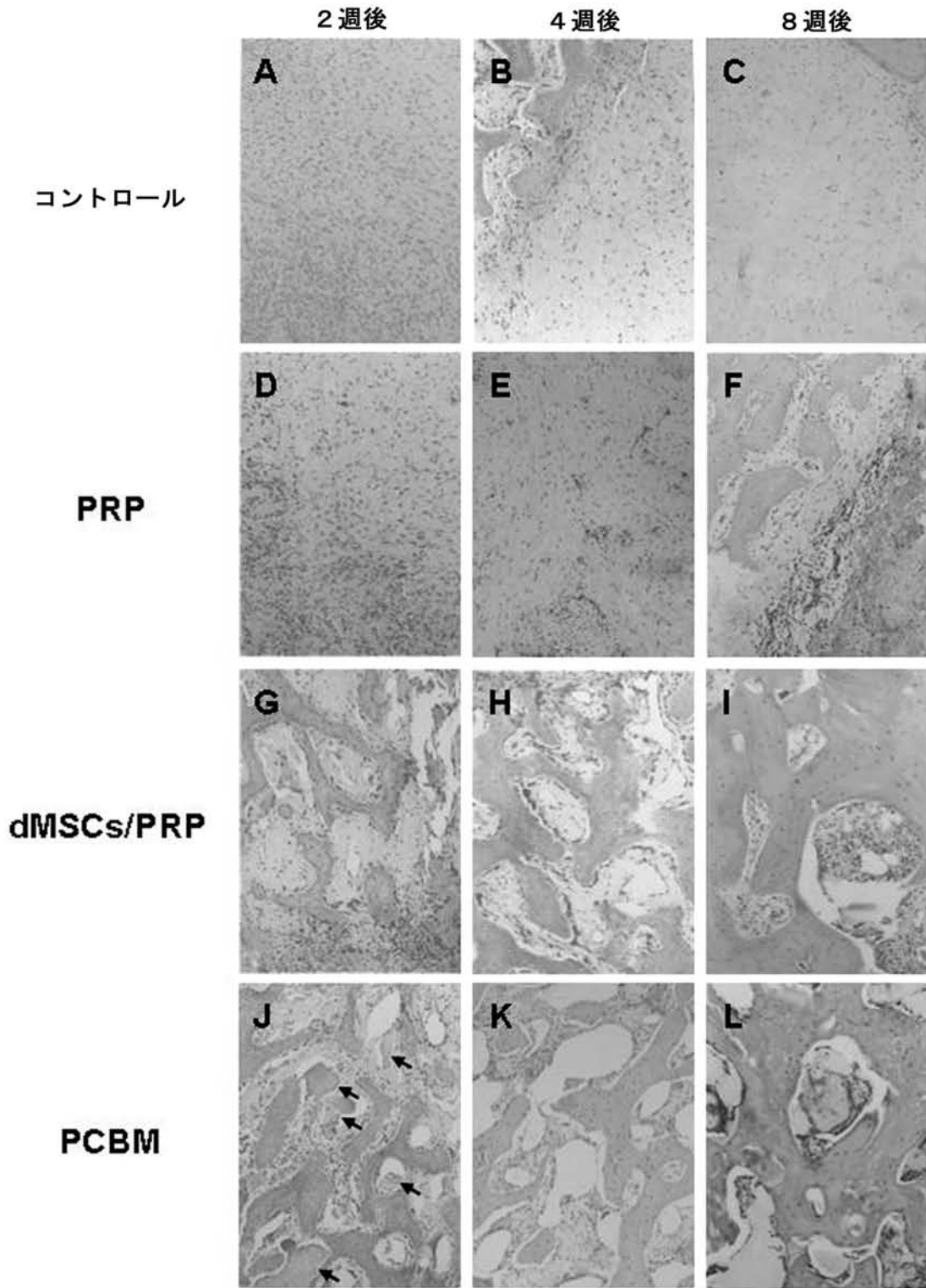
**B**



【 図 3 】



【 図 4 】



フロントページの続き

Fターム(参考) 4C081 AB02 AB06 BA12 CD34 DA15  
4C089 AA20 BE13 CA03