

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局



(43) 国際公開日
2003年5月22日 (22.05.2003)

PCT

(10) 国際公開番号
WO 03/041607 A1

- (51) 国際特許分類: A61C 13/08, (71) 出願人 および
A61F 2/02, A61L 27/00, C12N 5/06 (72) 発明者: 石橋 利文 (ISHIBASHI, Toshifumi) [JP/JP]; 〒
305-0044 茨城県つくば市並木3丁目604番地1号
Ibaraki (JP).
- (21) 国際出願番号: PCT/JP02/11869 (72) 発明者; および
(75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 大野 忠夫
(OHNO, Tadao) [JP/JP]; 〒300-1234 茨城県牛久市中
央1丁目18番地12 Ibaraki (JP).
- (22) 国際出願日: 2002年11月14日 (14.11.2002)
- (25) 国際出願の言語: 日本語
- (26) 国際公開の言語: 日本語 (74) 代理人: 特許業務法人特許事務所サイクス (SIKS &
CO.); 〒104-0031 東京都中央区京橋一丁目8番7号
京橋日殖ビル8階 Tokyo (JP).
- (30) 優先権データ:
特願 2001-349614 (81) 指定国 (国内): BR, CA, CN, KR, US.
2001年11月15日 (15.11.2001) JP
- (71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 理化学研究所 (RIKEN) [JP/JP]; 〒351-0198 埼玉県和光市
広沢2番1号 Saitama (JP). セルメデシン株式会社
(CELL-MEDICINE, INC.) [JP/JP]; 〒300-1234 茨城県
牛久市中央1丁目18番地12 Ibaraki (JP). (84) 指定国 (広域): ヨーロッパ特許 (AT, BE, BG, CH, CY,
CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL,
PT, SE, SK, TR).
- 添付公開書類:
— 国際調査報告書

[続葉有]

(54) Title: METHOD OF CELL TAKING ON SURFACE OF ARTICLE WITH THREE-DIMENSIONAL STRUCTURE

(54) 発明の名称: 立体構造物表面への細胞生着法

(57) Abstract: A method of cell taking whereby cells originating in a living body are made to take on the surface of an article having a three-dimensional and complicated structure such as a tooth, a dental implant, an artificial bone or an artificial blood vessel, characterized by involving the following steps: (a) the step of constructing a mold having a shape adapting for the surface of the article; and (b) the step of pouring a cell suspension into the mold, then fitting the article into the mold and incubating the cells; and an article with a three-dimensional structure carrying cells originating in a living body taking to the surface which can be produced by the above method.

(57) 要約:

生体由来の細胞を歯、歯科インプラント、人工骨、人工血管等の複雑な形状を有する立体構造物表面に生着させる方法であって、以下の工程:

(a) 立体構造物の表面の形状に合わせた鋳型を作製する工程

(b) 該鋳型に細胞懸濁液を入れた後、該立体構造物を該鋳型に嵌合させてインキュベーションする工程

を含むことを特徴とする方法、及び該方法によって製造することができる、その表面に生体由来細胞を生着させた立体構造物。



WO 03/041607 A1



2文字コード及び他の略語については、定期発行される各PCTガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語のガイダンスノート」を参照。

明 細 書

立体構造物表面への細胞生着法

技術分野

本発明は、生体由来の細胞を立体構造物の表面に生着させる方法に関する。より詳細には、本発明は、生体内に埋植するか、又は生体外に取付けて使用する人工臓器又は人工組織などの立体構造物の表面に生体由来の細胞を生着させる方法、及び該方法により製造することのできる立体構造物に関する。

背景技術

歯周疾患の中では、歯周組織周囲に口腔内微生物が感染して起こる慢性炎症が最も多い。結果的に歯槽骨の吸収、歯肉の退縮を引き起し、歯牙の脱落に至る。また、歯周疾患では、食物を噛むたびに歯周組織が痛むため、歯は抜歯せざるを得ない場合が多い。従来から、脱落又は抜歯した歯に代わって、他者又は自家天然歯、人工歯、歯科インプラント等の移植による治療が行われてきた。

しかし、天然歯の歯根と、人工歯や歯科インプラント(人工歯根)には大きな違いがある。天然歯の歯根は歯根膜で被われていて、通常は歯を支える歯槽骨の吸収が認められない。これに対し、歯根膜を除去した天然歯を移植した場合 (Lang, H., et al., Formation of differentiated tissues in vivo by periodontal cell population cultured in vitro. ; J. Dent. Res., 74, pp.1219-25, 1995)、歯根膜がない歯科インプラントを移植した場合 (江藤隆徳、インプラントと天然歯の支持機構と感覚の違い、末次恒夫・松本直之監修；歯科インプラント 初版、先端医療技術研究所、東京、pp.113-119、2000) は、長期間の間にそれらを支える歯槽骨の吸収を引き起こし、用に耐えなくなるという問題点があった。従って、移植歯の歯根膜をいかに健全に保存した状態で移植を遂行するかが歯牙移植法におけるキーポイントであるとされている (月星光博、自家歯牙移植法の実際、末

次恒夫・松本直之監修；歯科インプラント 初版、先端医療技術研究所、東京、pp. 247-251、2000）。

この歯根膜組織の形成維持には明らかに歯根膜細胞が貢献しているが（藤田恒太郎、歯の組織学 1 版、医歯薬出版、東京、pp. 159-190、1981）、口内細菌に汚染されている天然歯では、通常の殺菌処理をすれば歯根膜細胞も死滅してしまう。よって、天然歯の歯根部、あるいはもともと歯根膜がない人工歯の歯根部や歯科用インプラントに、歯根膜細胞を新たに付着させ、生存し続けさせて、天然の歯根膜組織に極めて類似した歯根膜様組織を形成させることができれば、長期間の使用が可能となる。

歯根膜細胞を付着させる従来の方法としては、ただ単に、大量の歯根膜細胞の懸濁液に歯牙や歯科インプラントを入れて培養し、細胞の生着を期待する方法が一般的であった。しかしながら、天然歯の歯根部は、詳細に見ると複雑な曲面構造を持つので、天然歯の歯根部を静置し、歯根膜細胞を通常の培養液に懸濁して上から注いでも、細胞を沈着させることができるのは極くわずかな面積しかなく、大部分の細胞は曲面を滑り落ちてしまう。歯科インプラントでも同様である。

そのため、歯牙や歯科インプラントのごとき立体構造物の三次元曲面に、歯根膜細胞を広くかつ効率よく生着させ、歯根膜様組織を形成させることを目的としてこれまで数々の試みがなされてきた。例えば、Choi らの報告（Choi, B. H., Periodontal ligament formation around titanium implants using cultured periodontal ligament cells ; A pilot study. Oral Maxillofac Implants, 15 , pp. 193-196, 2000）、及び、木下らの報告（木下鞆彦、福岡真一、日高丈博；人工歯根における歯根膜の再生、末次恒夫・松本直之監修；歯科インプラント 初版、先端医療技術研究所、東京、pp.305-311、2000）、及び清水らの方法（特開平 6-7381）が知られている。

Choi らは、イヌの抜去歯牙の歯根部に残っている歯根膜を取り、細かく刻んだ膜断片をインプラント表面に直接置き、ここから遊走してくる歯根膜細胞がインプラント表面を広く被覆するまで培養して歯根膜様組織を形成させた後、この歯

根膜様組織を自家（当該抜去歯牙が由来した）イヌに再移植し、3ヶ月後にインプラント表面とその周囲に歯根膜組織とセメント質が形成されているのを観察している。しかし、この技術には、最初に十分量の歯根膜を採取しなければならない、歯根膜が口腔内由来微生物に汚染されている場合は細胞を殺すことなく殺菌しなければならない、不均一に設置された歯根膜断片から遊走してくる歯根膜細胞がインプラント表面を十分被覆するまで4～5週間の培養が必要で、かなりの時間を要するなどの短所がある。

また、木下らは、歯根膜細胞をコラーゲングル内で三次元培養し、この中にコラーゲン固定化インプラントを入れ、インプラント表面上に歯根膜細胞を播種している。しかし、この技術は、細胞が重力によって沈まないようにコラーゲングル内に保つため、足場依存性である歯根膜細胞がインプラント表面に付着するのを抑えることとなり、インプラント表面から若干でも離れている歯根膜細胞は、インプラント表面に生着できず、細胞播種効率が低い。

また、清水らは、歯根膜細胞をコラーゲングル内で三次元培養し、さらにこれをアテロコラーゲンスポンジにしみ込ませて培養した重層培養シートを、人工歯根面に巻き付ける方法を開発している。しかし、この方法はスポンジを巻き付けて固定（場合によってはさらに培養を継続）するという技術的に煩雑な操作が必要である。

従って、上記の試みはいずれも問題点があり、歯根膜様細胞を歯牙や歯科インプラントのような複雑な形状を有する立体構造物の表面に生着させることのできる優れた技術の確立には至っていない。また、歯根部と同様に、他の生体内埋植用・生体外取付け用の人工組織・人工臓器も、細胞を単純に沈着させることができる広い平面構造があるものはほとんどない。すなわち、複雑な形状を有する立体構造物の表面に細胞をうまく生着させるための技術がないという問題点は、歯科材料のみならず、人工物と生体由来細胞によって構成されるハイブリッド型人工組織や人工臓器の製造分野にもあてはまる。

発明の開示

従って、本発明の課題は、例えば生体内の臓器や組織などの複雑な形状を有する立体構造物の表面に、生体由来の細胞を広くかつ効率よく生着させる方法を提供することにある。

本発明の他の課題は、その表面に生体由来の細胞を生着させた立体構造物を提供することにある。

本発明者らは上記の課題を解決すべく鋭意努力した結果、

(1) 複雑な形状を有する歯根部であっても、その歯根部の形状にあった鋳型を作製し、その鋳型内部に少量の培養歯根膜細胞懸濁液を入れた後、歯根部を嵌合させてインキュベーションすることにより、歯根部に細胞を生着させることができること；

(2) 鋳型が細胞毒性が少なく、かつ細胞接着性のない材料から成るか、又は、鋳型を該材料で表面処理すれば、歯根部に効率よく歯根膜細胞を生着させることができること；

(3) 鋳型内表面及び／又は歯根部表面に、細溝及び／又は細孔を設けることにより、再び鋳型に歯根部をはめたとき、歯根膜細胞懸濁液が簡単には排除されず、細溝及び／又は細孔に滞留し、細胞をさらに効率よく歯根部に生着できること；

(4) 上記(1)のインキュベーション後、鋳型から歯根部をはずし、歯根部を培養液に浸けて再び培養すれば、生着した歯根膜細胞が歯根部表面上で生存し続け、伸展して歯根膜様組織を形成すること；

を見い出した。本発明はこれらの知見に基づいて完成されたものである。

すなわち、本発明は生体由来の細胞を立体構造物の表面に生着させる方法であって、以下の工程：

(a) 立体構造物の表面の形状に合わせた鋳型を作製する工程

(b) 該鋳型に細胞懸濁液を入れた後、該立体構造物を該鋳型に嵌合させてインキュベーションする工程

を含むことを特徴とする、前記方法を提供する。

本発明はまた、その表面に生体由来の細胞を生着させた立体構造物を提供する。この立体構造物は、好ましくは上記方法により製造することができる。

本発明の好ましい態様によれば、抜歯したヒト歯の歯根部に歯根膜細胞を広く生着させることができ、また同様に、人工歯又は歯科インプラントにも歯根膜細胞を効率よく生着させることができる。また、生着した歯根膜細胞を生存させ続け、歯根膜様組織を形成させることもできる。これによって、移植歯・歯科インプラントを支える歯槽骨の吸収を防ぎ、長期に渡って使用可能な歯を再生することができる。すなわち、抜歯のやむなきに至った歯周疾患等の歯科疾患の治療が可能となる。

同様に、本発明の好ましい態様によれば、複雑な立体構造をもつ生体埋植用の人工組織・人工臓器の表面に細胞を効率よく生着させることができる。また、生着した細胞を生存させ続け、生体内組織に類似した組織をもつハイブリッド型人工組織・人工臓器を製造することもできる。

図面の簡単な説明

第1図は、歯根部の鋳型形成法、歯根膜細胞接着法・培養法のフロー図を示す。

第2図は、ヒト歯牙歯根部表面における歯根膜細胞のフォローアップ培養結果を示す写真である。

A. 高濃度ゲンタマイシンを含む移送用培地で殺菌処理したヒトの歯牙。フォローアップ培養後のアルカリフォスファターゼ染色によって、濃青紫色の様なアゾ色素の沈着物が見える。歯根部表面に歯根膜細胞が生着し十分広がっていることを示している。

B. 対照とした70%アルコール保存・オートクレーブ殺菌処理したヒトの歯牙。濃青紫色の様なアゾ色素の沈着物は全く観察されず、歯根膜細胞が生着しなかったことを示している。

発明を実施するための最良の形態

本発明の立体構造物の表面への細胞生着方法は、典型的には以下の工程を含む。

(1) 鋳型の作製

本工程では、立体構造物の形状に合わせた鋳型を作製する。

本発明における「立体構造物」とは、複雑な形状を有する三次元構造物、具体的には人工臓器や人工組織などをいい、代表的には人口歯根が挙げられる。

第一の態様では、鋳型自体が、細胞毒性が少なく、かつ細胞が生着し難い性質を持つ材料から成る。該鋳型は、例えば、細胞毒性が少なく、かつ細胞が生着し難い性質を持つ材料の溶液を立体構造物周囲に添加し、冷却固化することによって作製できる。

「細胞毒性が少なく、かつ細胞が生着し難い性質を持つ材料」としては、例えば、固化前は流動性を有するが、当業者に利用可能な適切な処理によって固化し、固化後に当該性質を発揮しうる材料を好適に用いることができる。その種類は特に限定されないが、代表的にはアガロースや寒天が挙げられる。また、固化前の流動性が高い液状材料であれば、より複雑な形状の立体構造物に対しても適用可能である。

上記材料の濃度はその種類により異なり、特に限定はされないが、例えばアガロースであれば4%水溶液とすることが例示される。

また、別の態様として、鋳型が前記材料で表面処理されていてもよい。この場合、鋳型を形成する部材の種類は特に限定されないが、例えばポリスチレンのように加熱状態で溶液であり、冷却すれば固化するプラスチックを鋳型の形成部材として使用できる。例えば、立体構造物の周囲にポリスチレン溶融液を冷却固化し、この固化した鋳型表面（立体構造物接触面）に、細胞毒性が少なく、かつ細胞が生着し難い性質を持つ材料をコーティングする。該材料としては、ポリ（2-ヒドロキシエチルメタクリレート）、ポリエチレングリコール、アガロースなどが挙げられる。

また、該材料を鋳型表面にコーティングする際、コーティングの厚さを分子1

ケ分の厚さから0.1mm程度とすればよい。コーティングに用いるコーティング液の濃度は、例えば、コーティング剤としてアガロースを用いる場合には、0.3重量%程度である。

上記の態様以外であっても、立体構造物との接触面に細胞が生着し難いようにし、かつ、細胞毒性が少ない表面とするのであれば、いかなる表面加工法も使用可能である。

なお、通常は所望の立体構造物を用いて鋳型を形成するが、あらかじめ立体構造物の鋳型の形状が設計できる場合であれば、細胞が生着し難い性質を持つプラスチック塊や金属塊を用いて立体構造物の鋳型を作製してもよく、また、その鋳型表面を、前述した細胞が生着し難い性質を持つ材料でコーティングしてもよい。ここでも細胞毒性が少なく、かつ細胞が生着し難い表面とするのであれば、いかなる表面加工法も使用可能である。

本発明においては、上記のごとく作製した鋳型表面に細胞懸濁液が滞留できるように該表面に細溝及び／又は細孔を設けてもよい。細溝及び／又は細孔は、歯科用探針及びその類似針を利用して該鋳型表面に傷をつけるなどの当業者に利用可能な方法や、その他のいかなる方法を用いてもよく、特に限定されるものではない。

細溝及び／又は細孔は、少なくとも細胞が入り込める大きさがあり、しかも鋳型構造が大きく変形しない範囲であればよく、例えば直径・深さとも1mm程度が好ましいが、必ずしもこれに限定されるものではない。また、その数も適宜選択できるが、該鋳型の形態を大幅に崩すことがない範囲で、できるだけ多数あるのが望ましい。

このように鋳型表面に細溝及び／又は細孔を設けることによって、鋳型内に流し込んだ細胞懸濁液はこれらの細溝及び／又は細孔に入り込み、立体構造物を該鋳型に嵌合させたとき、立体構造物が該鋳型に全面的には密着しないので細胞懸濁液が押し出されて鋳型から漏れ出すことを防止できる。その結果、細胞を立体構造物側の表面に速やかに生着させることができる。

上記の細溝及び／又は細孔は、立体構造物の表面に設けてもよい。立体構造物の表面に細溝及び／又は細孔を設けることによって、細胞はこれらの細溝及び／又は細孔に入り込み、立体構造物の表面への細胞の生着を容易にする。

この場合、例えば市販の歯科インプラントのように、細溝及び／又は細孔に相当するネジ山や孔を持つものをそのまま使用してもよい。細溝及び／又は細孔を設置した立体構造物表面を、さらに細胞が接着しやすい性質を持つ材料、たとえばコラーゲン、フィブロネクチン、ラミニン等の細胞接着因子でコーティングすることによって、細胞の接着性を強化できる。この際のコーティングに用いる材料と方法は、当業者に利用可能なものであればよい。

上記の細溝及び／又は細孔は、必要に応じて、鋳型側、立体構造物側のいずれか一方、あるいは両方に設けてもよい。鋳型側と立体構造物側の両方の表面に設ければ細胞はこれらの細溝及び／又は細孔に入り込み、細溝及び／又は細孔の容積に応じて一時的にそこに保持され、該鋳型表面には生着せず立体構造物側には一層生着しやすい状態を形成できる。

(2) 細胞生着のための培養

(1) で作製された鋳型が、立体構造物を用いてその立体構造物と一体化した形で作製された場合は、いったん鋳型を立体構造物からはずし、また、鋳型が独立して設計可能であり、立体構造物とは分離した形で別途作製された場合にはそのまま、以下の工程に供する。

得られた鋳型内に別途調製した生体由来の細胞の懸濁液を入れ、該立体構造物を該鋳型に嵌合させてインキュベーションする。この操作によって、細胞は、細胞が生着し難い鋳型側表面ではなく、細胞が生着しやすい立体構造物側表面に生着する。この手法によれば、前述の木下らの方法のように細胞が重力によって沈まないようにコラーゲングル内に閉じこめる必要もなく、あるいは清水らのように重層培養シートを人工歯根面に巻き付けるという煩雑な方法をとる必要もなく、培養液に懸濁した細胞を直接立体構造物に生着させることができる。このために必要な細胞数は、鋳型を用いない場合よりも少数で済む。もっとも、細胞数は必

ずしも限定されるものではなく、後記のフォローアップ培養後、当業者に知られた望ましい広さに立体構造物を覆うと予想される程度の数があればよい。

本発明において「細胞が生着する」とは、細胞が生きたまま目的とする立体構造物の表面に付着・固定されることをいい、細胞が、立体構造物の表面に懸濁状態から単純に疎に付着しているままではなく、伸展した細胞が密に広がって存在し、該細胞様組織となっていることをいう。

ここで用いる生体由来の細胞は、該細胞を生着させようとする立体構造物の用途に適した細胞を用いることが好ましい。例えばヒト歯根膜細胞をヒト天然歯に生着させ、移植治療に用いる場合は、治療対象となる患者本人のヒト歯根膜細胞が最も好ましい。

本発明において、生体由来の細胞とは、ヒトを含む各種の動物由来細胞、各種の組織由来細胞を用いることができ、例えば、歯根膜細胞、骨芽細胞、軟骨細胞、滑膜細胞、線維芽細胞細胞、血管内皮細胞、角膜細胞、レンズ細胞、口腔粘膜細胞、咽頭上皮細胞、喉頭上皮細胞、食道上皮細胞、気管支上皮細胞、肺胞上皮細胞、肝由来細胞、胆管細胞、胆嚢細胞、腎由来細胞、移行上皮細胞、腸管粘膜細胞などが挙げられる。

ここで用いる細胞の懸濁液の調製方法は、該細胞が生存維持できる方法であれば特に限定されず、当業者に利用可能な方法でよい。また、該立体構造物を該鑄型に嵌合させた後にインキュベーションする条件は特に限定されないが、例えば、37°Cで一日培養を行うことが好ましい。もっとも、インキュベーション条件は上記の条件に限定されるものではなく、細胞が立体構造物表面に生着できる条件であれば、いかなる条件を用いてもよい。また、インキュベーションとは、単に放置することをも含む。

細胞の培養液としては、当業者に利用可能な培養液を用いればよい。例えば歯根膜細胞の場合、培養液 RHAM α (-) にサプリメントを添加した培養液 RHAM α (Kawai, K. et al., Additive effects of antitumor drugs and lymphokine-activated killer cell cytotoxic activity in tumor cell killing

determined by lactate-dehydrogenase-release assay ; Cancer. Immunol. Immunother, 35, pp.225-229, 1992) に、更にウシ胎児血清を 10%(v/v)となるように添加したものが最も好ましい。しかし、ヒト歯根膜細胞が生存維持できる培養液であれば特に限定されず、いかなる培養液を用いてもよい。また、培養期間は適宜でよく、2～4週間が好ましいが、これも当業者に利用可能な方法に従った期間でよい。平均的な実施例では、3週間で歯根膜細胞は歯根部に、完全ではないにしても十分に広がり、上述したイヌ歯根膜を用いたChoiらの報告(Choi, B. H., Periodontal ligament formation around titanium implants using cultured periodontal ligament cells ; A pilot study. Oral Maxillofac Implants, 15, pp. 193-196, 2000) に記載された5～6週間よりも短くすませることができる。

上述したような方法によって細胞を生着させた立体構造物、例えば歯もしくは歯科インプラントを、鋳型からはずし、該細胞を生存もしくは増殖させ得る培養液に浸けて、立体構造物表面上で該細胞を培養し、該細胞によって生成される組織を形成させる。この立体構造物表面上におけるフォローアップ培養を実施することが好ましいが、用いる細胞の性質と使用目的に応じて適宜条件を設定すればよい。例えば歯牙歯根部に生着した歯根膜細胞は、このフォローアップ培養によって歯根部表面に伸展し、ときに増殖し、培養中に歯根膜様組織を形成していく。

実施例

以下、実施例により本発明をさらに具体的に説明するが、本発明はこれらに限定されるものではない。なお、第1図に本発明の細胞生着法の概要をフロー図として示した。

(実施例1)

(1) 歯根膜細胞の調製

埋伏智歯や位置異常歯の矯正治療を必要としている歯科外来患者から同意を得て抜歯した、臨床的に炎症のない歯を用いた。まず、抜去した歯を、滅菌生理食

塩水で血液を洗浄除去し、滅菌メス、歯科用タービンの滅菌バーにて抜去歯牙の歯頸部に残存している歯肉・歯石を除去した。これを直ちに4℃に冷却した移送用培地（表1）に入れた。

表1.

移送用培地

RHAM α （-）（市販の動物細胞用基礎培地 RPMI1640、HAM-F12、MEM α の3:1:1の混合培養液）

添加物	ゲンタマイシン	10 μ g/ml
	ストレプトマイシン	100 μ g/ml
	カナマイシン	60 μ g/ml

洗浄液（表2）を作製し、5mlの洗浄液を入れた直径6cmの培養ディッシュを5枚横に並べ、左端のディッシュから右端のディッシュまで、歯をピンセットで揺すりながら次々と移動し、十分洗浄した。

表2.

洗浄液

ダルベッコリン酸緩衝生理食塩水（PBS（-））

添加物	ペニシリン	200 IU/ml
	ゲンタマイシン	10 μ g/ml
	ストレプトマイシン	100 μ g/ml
	カナマイシン	60 μ g/ml
	アンホテリシンB	2.5 μ g/ml

培養用6ウェルプレートの1つのウェルに、10%（v/v）のウシ胎児血清を含む培養液RHAM α 10mlを入れ、洗浄した歯を静かに入れて沈め、そのま

ま培養した。翌日、培養液 10 ml を添加した隣のウェルに歯を移動した。同様にして、当初 3～4 日間は毎日培養液を交換し、その後は培地を半交換した。この培養工程で、運良く細菌感染がなく、歯からはがれてウェルの培養表面に付着した歯根膜細胞がウェル内で増殖し、コンフルエントに達したならば、常法によりトリプシン処理して 35 mm 培養ディッシュにて継代培養した。細胞が増殖した 1～3 枚の培養ディッシュから、常法により 1～2 ml の培養液に懸濁した細胞懸濁液を作製した。

(2) 抜去歯牙の殺菌

15 ml 容の試験管に、移送用培地 10 ml を入れ、歯牙を 1 本ずつ別々に保存した。洗浄液で前項と同様にして洗浄し、前項と同様にして培養した。この培養工程で細菌感染が発見された場合、直ちに歯を移送用培地に移し、さらに、高濃度ゲンタマイシン水溶液 (20 mg/ml) を添加して、ゲンタマイシン終濃度を 100 μ g/ml とし、一夜以上培養して殺菌した。この後の洗浄、培養工程でなお細菌感染が見いだされたならば、さらにゲンタマイシンを増量して上記工程を繰り返し、細菌感染がなくなったことを確認して、以下の工程に使用した。比較対照として、抜歯後 70% アルコール液に入れて保存していた歯牙を、PBS (-) で洗浄し、120℃、20 分のオートクレーブ滅菌後、使用した。

(3) 歯根膜細胞の歯牙への付着及び培養

アガロース 3 g に水 75 ml を加え、電子レンジで暖め溶かした。この溶かした 4% アガロース溶液を、培養用 24 ウェルプレートのウェルに入れ、ゲル状になるまで放置した。このアガロースゲル内に、殺菌し、PBS (-) で洗浄した歯牙を植立させ、アガロースゲルが固化するまで放置し、歯型鑄型を作製した。次に、歯牙を取り出し、表面を滅菌ピンセットでこすって清掃し、フィブロネクチン溶液 (PBS (-) に 10 μ g/ml となるように溶解したもの) に 1～2 日常温下で浸した。前記の歯型鑄型内表面に、ピンセット又は探針で溝を付け、

適量の歯根膜細胞懸濁液を歯型鋳型に加え、フィブロネクチン処理した歯を植立させて歯冠部面まで培養液を注入し、1日培養した。この歯を他の空のウェルに移し、培養液を加えて、2～4週間培養した。

(4) アルカリフォスファターゼ染色

上記処理によって、培養歯牙表面に歯根膜細胞が生存していれば、それに由来するアルカリフォスファターゼ活性があり、染色歯牙表面には、濃青紫色のアゾ色素の沈着物が観察できる。アルカリフォスファターゼ染色は以下の手順で行った。まず、培養した歯牙を99.5%エタノールに浸け、細胞を固定し、精製水で5～6回洗浄した。これをアルカリフォスファターゼ反応液(表3)に浸け、室温で約30分反応させ、水道水で十分洗浄した後、1%メチルグリーン核染色液(ヘマトキシリン、ケルンエヒテロート)にて10分間染色し、水道水及び精製水で洗浄し、乾燥した。

表3.

アルカリフォスファターゼ反応液

Naphthol AS-BI(AS-MX) phosphoric acid(disodium salt) (シグマ、カタログ番号 N2125)	5 mg
2-amino-2-methyl-1,3-propandiol 緩衝液 (0.05M, pH9.8)	10 ml
Fast blue RR salt (シグマ、カタログ番号 F0500)	5 mg

(5) 結果

歯根膜細胞調製にあたって細菌感染がなかった抜去歯牙では、ウェル内に歯牙の入った培養プレートをそのまま培養器内で数日放置していたところ、培養プレートのウェル表面で細胞の増殖が認められた。培養歯根膜細胞は、骨芽細胞を初めとするその他の歯周組織の細胞とは形態的な特徴が異なることが知られている(窪田正宏、歯根膜細胞ならびに骨芽細胞の低酸素状態における増殖と機能に関

する研究、腔病誌 56 : pp. 473-484、1989)。ここで培養できた増殖の盛んな細胞は、光学顕微鏡観察では、長軸の長い紡錘形をした均一な線維芽細胞様細胞で、増殖すると一定方向に配列する性質も線維芽細胞の特徴を示していた。また、この細胞はアルカリフォスファターゼ染色によりアルカリフォスファターゼ活性を有することを示していた。これらの2点から、歯根膜細胞と同定できた。この歯根膜細胞を継代培養したところ、約1 : 2ないし1 : 3スプリットで5~10代以上に及んだ。この継代培養可能であった歯根膜細胞は、常法による凍結保存・融解再培養が可能であったため、殺菌処理した歯牙に再付着させる実験に使用できた。

上記(2)において高濃度ゲンタマイシンを含む移送用培地で殺菌処理した歯牙には、別途培養調製した歯根膜細胞が生着し、フォローアップ培養後のアルカリフォスファターゼ染色によって、歯根部表面に存在しているのが観察された(第2図A)。一面の濃く広がった染色領域があることから判断して、歯根膜細胞が懸濁状態から単純に疎に付着しているままではなく、伸展した細胞が密に広がって存在し、歯根膜様組織となっていると考えられる。

対照とした70%アルコール保存・オートクレーブ殺菌処理した歯牙では、濃青紫色の様なアゾ色素の沈着物は全く観察されず、歯根膜細胞が生着しなかったことを示している(第2図B)。70%アルコール保存・オートクレーブ殺菌処理したため、歯牙表面の細胞接着因子が変性し、歯根膜細胞が生着できなくなったためと考えられる。

産業上の利用可能性

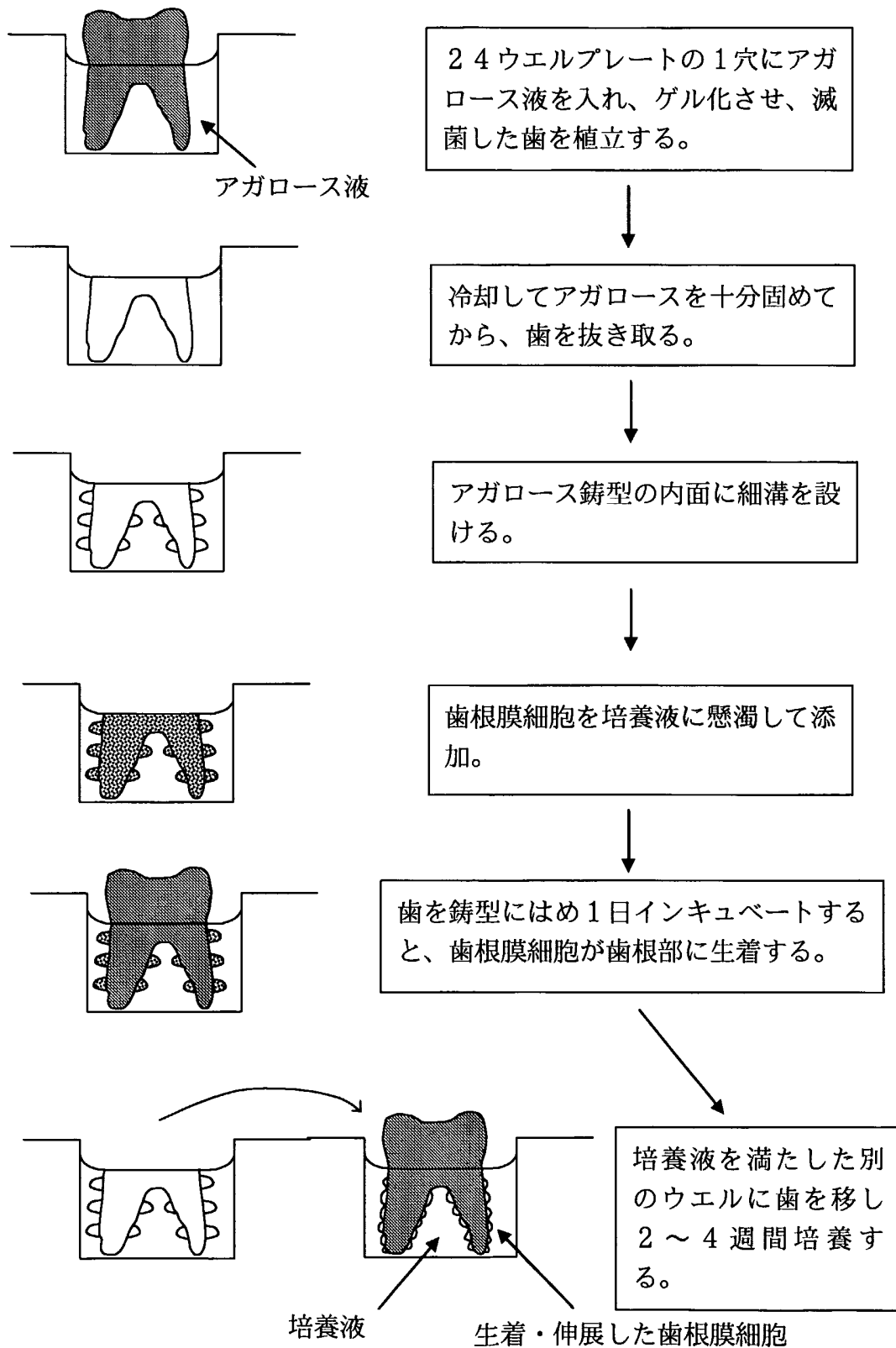
本発明によれば、歯、歯科インプラント、人工骨、人工血管等の複雑な形状を有する立体構造物の表面に、生体由来の細胞を広くかつ効率よく生着させる方法が提供される。該方法によって製造することのできる、生体由来の細胞を生着させた立体構造物は、生体内に埋植するか、又は生体外に取付けて使用する人工臓器、人工組織として高い生体適合性を有し、効果的な医療が可能となる。

請求の範囲

1. 生体由来の細胞を立体構造物表面に生着させる方法であって、以下の工程：
 - (a) 立体構造物の表面の形状に合わせた鋳型を作製する工程
 - (b) 該鋳型に細胞懸濁液を入れた後、該立体構造物を該鋳型に嵌合させてインキュベーションする工程を含むことを特徴とする方法。
2. 前記鋳型が、細胞毒性が少なく、かつ細胞が生着し難い性質を持つ材料から成るか、又は該材料で表面処理されていることを特徴とする、請求の範囲第1項に記載の方法。
3. 前記鋳型の表面及び／又は前記立体構造物の表面に、細胞懸濁液が滞留することができる細溝及び／又は細孔を設けることを特徴とする、請求の範囲第1項又は第2項に記載の方法。
4. 前記材料が、アガロース、ポリ(2-ヒドロキシエチルメタクリレート)、又はポリエチレングリコールである、請求の範囲第1項ないし第3項のいずれか1項に記載の方法。
5. 前記生体由来の細胞が、歯根膜細胞、骨芽細胞、軟骨細胞、滑膜細胞、線維芽細胞細胞、血管内皮細胞、角膜細胞、レンズ細胞、口腔粘膜細胞、咽頭上皮細胞、喉頭上皮細胞、食道上皮細胞、気管支上皮細胞、肺胞上皮細胞、肝由来細胞、胆管細胞、胆嚢細胞、腎由来細胞、移行上皮細胞、及び腸管粘膜細胞よりなる群から選ばれる、請求の範囲第1項ないし第4項のいずれか1項に記載の方法。
6. 前記立体構造物が、歯、歯科インプラント、骨、人工関節、固定用留め具、人工靭帯、人工硬膜、人工血管、人工角膜、眼内レンズ、人工喉頭、人工咽頭、人工食道、人工気管、人工肺、人工胸壁、人工乳房、人工心臓、人工弁、人工心膜、人工横隔膜、人工肝臓、人工胆管、人工腎臓、人工膀胱、人工尿管、人工膀胱、人工腹壁、人工腸管、人工陰茎、及び人工辜丸よりなる群から選ばれる、請求の範囲第1項ないし第5項のいずれか1項に記載の方法。

7. 請求の範囲第1項ないし第6項のいずれか1項に記載の方法によって製造することができる、その表面に生体由来の細胞を生着させた立体構造物。

第1図 歯根部の鋳型形成法と歯根膜細胞接着法・培養法のフロー図



第2図

A



B



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/JP02/11869

<p>A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER Int.Cl⁷ A61C13/08, A61F2/02, A61L27/00, C12N5/06</p> <p>According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC</p>													
<p>B. FIELDS SEARCHED</p> <p>Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) Int.Cl⁷ A61C13/08, A61F2/02, A61L27/00, C12N5/06</p> <p>Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched</p> <p>Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) BIOSIS/WPI (DIALOG), MEDLINE (STN), JICST FILE (JOIS)</p>													
<p>C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT</p> <table border="1"> <thead> <tr> <th>Category*</th> <th>Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages</th> <th>Relevant to claim No.</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>A</td> <td>JP 6-7381 A (Shinichi ITO), 18 January, 1994 (18.01.94), (Family: none)</td> <td>1-7</td> </tr> <tr> <td>A</td> <td>PENG, C. et al., Morphologic study and syntheses of type I collagen and fibronectin of human periodontal ligament cells cultured on poly (ethylene-co-vinyl alcohol) (EVA) with collagen immobilization, J Biomed Mater Res, 2001 Feb, Vol.54, No.2, pages 241 to 246</td> <td>1-7</td> </tr> <tr> <td>A</td> <td>Shungan HO'U et al., " Shikonmaku o Yusuru Jinko Shikon no Kaihatsu Dai 2 Ho Collagen Koteika ethylene-vinylalcohol Kyojugotai (EVA) eno Hito Shikonmaku Yurai Saibo Baiyo", The Journal of the Japanese Society for Dental Materials and Devices, 2000, Vol.19, No.5, pages 464 to 469</td> <td>1-7</td> </tr> </tbody> </table>		Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.	A	JP 6-7381 A (Shinichi ITO), 18 January, 1994 (18.01.94), (Family: none)	1-7	A	PENG, C. et al., Morphologic study and syntheses of type I collagen and fibronectin of human periodontal ligament cells cultured on poly (ethylene-co-vinyl alcohol) (EVA) with collagen immobilization, J Biomed Mater Res, 2001 Feb, Vol.54, No.2, pages 241 to 246	1-7	A	Shungan HO'U et al., " Shikonmaku o Yusuru Jinko Shikon no Kaihatsu Dai 2 Ho Collagen Koteika ethylene-vinylalcohol Kyojugotai (EVA) eno Hito Shikonmaku Yurai Saibo Baiyo", The Journal of the Japanese Society for Dental Materials and Devices, 2000, Vol.19, No.5, pages 464 to 469	1-7
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.											
A	JP 6-7381 A (Shinichi ITO), 18 January, 1994 (18.01.94), (Family: none)	1-7											
A	PENG, C. et al., Morphologic study and syntheses of type I collagen and fibronectin of human periodontal ligament cells cultured on poly (ethylene-co-vinyl alcohol) (EVA) with collagen immobilization, J Biomed Mater Res, 2001 Feb, Vol.54, No.2, pages 241 to 246	1-7											
A	Shungan HO'U et al., " Shikonmaku o Yusuru Jinko Shikon no Kaihatsu Dai 2 Ho Collagen Koteika ethylene-vinylalcohol Kyojugotai (EVA) eno Hito Shikonmaku Yurai Saibo Baiyo", The Journal of the Japanese Society for Dental Materials and Devices, 2000, Vol.19, No.5, pages 464 to 469	1-7											
<p><input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/> See patent family annex.</p>													
<p>* Special categories of cited documents:</p> <table border="0"> <tr> <td>"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance</td> <td>"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention</td> </tr> <tr> <td>"E" earlier document but published on or after the international filing date</td> <td>"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone</td> </tr> <tr> <td>"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)</td> <td>"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art</td> </tr> <tr> <td>"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means</td> <td>"&" document member of the same patent family</td> </tr> <tr> <td>"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed</td> <td></td> </tr> </table>		"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention	"E" earlier document but published on or after the international filing date	"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone	"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)	"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art	"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	"&" document member of the same patent family	"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed			
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention												
"E" earlier document but published on or after the international filing date	"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone												
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)	"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art												
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	"&" document member of the same patent family												
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed													
<p>Date of the actual completion of the international search 11 December, 2002 (11.12.02)</p>	<p>Date of mailing of the international search report 14 January, 2003 (14.01.03)</p>												
<p>Name and mailing address of the ISA/ Japanese Patent Office</p> <p>Facsimile No.</p>	<p>Authorized officer</p> <p>Telephone No.</p>												

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))
 Int. Cl. ⁷ A61C13/08, A61F2/02, A61L27/00, C12N5/06

B. 調査を行った分野
 調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))
 Int. Cl. ⁷ A61C13/08, A61F2/02, A61L27/00, C12N5/06

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)
 BIOSIS/WPI (DIALOG), MEDLINE (STN), JICSTファイル (JOIS)

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
A	JP 6-7381 A (伊藤慎一) 1994. 01. 18 (ファミリーなし)	1-7
A	PENG, C. et al., Morphologic study and syntheses of type I collagen and fibronectin of human periodontal ligament cells cultured on poly(ethylene-co-vinyl alcohol) (EVA) with collagen immobilization, J Biomed Mater Res, 2001 Feb, Vol. 54, No. 2, p. 241-246	1-7


C欄の続きにも文献が列挙されている。 パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー
 「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの
 「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの
 「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)
 「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献
 「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願日の後に公表された文献
 「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの
 「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの
 「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの
 「&」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日
 11. 12. 02

国際調査報告の発送日
14.01.03

国際調査機関の名称及びあて先
 日本国特許庁 (ISA/J.P.)
 郵便番号 100-8915
 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)
 田村 明照 
 4 B 2936
 電話番号 03-3581-1101 内線 3448

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
A	<p>彭春岩他, 歯根膜を有する人工歯根の開発 第2報 コラーゲン固定化エチレン-ビニルアルコール共重合体 (EVA) へのヒト歯根膜由来細胞培養, 歯科材料・器械, 2000, Vol. 19, No. 5, p. 464-469</p>	1-7