

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局



(43) 国際公開日
2009年2月26日 (26.02.2009)

PCT

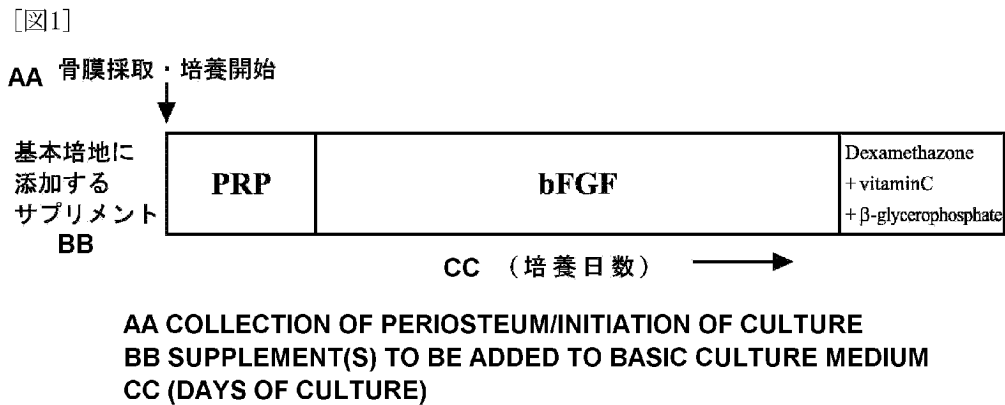
(10) 国際公開番号
WO 2009/025374 A1

- (51) 国際特許分類:
C12N 5/06 (2006.01) A61L 27/00 (2006.01)
- (21) 国際出願番号: PCT/JP2008/065050
- (22) 国際出願日: 2008年8月22日 (22.08.2008)
- (25) 国際出願の言語: 日本語
- (26) 国際公開の言語: 日本語
- (30) 優先権データ:
特願2007-217340 2007年8月23日 (23.08.2007) JP
- (71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 国立大学法人新潟大学 (NIIGATA UNIVERSITY) [JP/JP]; 〒9502181 新潟県新潟市西区五十嵐二の町8050番地 Niigata (JP).
- (72) 発明者; および
- (75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 川瀬 知之 (KAWASE, Tomoyuki) [JP/JP]; 〒9518520 新潟県新潟市中央区旭町通1番町754番地 新潟大学歯学部内 Niigata (JP). 奥田 一博 (OKUDA, Kazuhiro) [JP/JP]; 〒9518520 新潟県新潟市中央区旭町通1番町754番地 新潟大学歯学部内 Niigata (JP).
- (74) 代理人: 牛木 護 (USHIKI, Mamoru); 〒1050001 東京都港区虎ノ門一丁目14番1号 郵政福祉琴平ビル3階 Tokyo (JP).
- (81) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の国内保護が可能): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.
- (84) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の広域保護が可能): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MT, NL, NO, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

[続葉有]

(54) Title: HUMAN PERIOSTEUM CULTURE METHOD

(54) 発明の名称: ヒト骨膜培養方法



(57) Abstract: The object is to develop an accelerated human periosteum culture method having a short culture period. Thus, disclosed is a human periosteum culture method, comprising the following steps (1) to (4): (1) placing a periosteum piece collected from a patient on a culture dish containing no culture solution; (2) dropping a platelet-rich plasma collected from the patient onto the surface of the periosteum piece placed on the culture dish and solidifying the platelet-rich plasma so as to cover the surface of the periosteum piece; (3) adding a first culture solution to the culture dish and carrying out the culture; and (4), after the step (3), carrying out the culture by using a second culture solution containing a basic fibroblast growth factor but not containing the platelet-rich plasma.

(57) 要約: 培養期間が短いヒト骨膜の促成培養方法を開発する。(1) 患者から採取した骨膜片を培養液を添加しない培養ディッシュに載置するステップと、(2) 前記培養ディッシュ上の骨膜片の表面に前記患者の多血小板血漿を滴下して骨膜片の表面を覆うように凝固させるステップと、(3) 前記培養ディッシュに第1培養液を添加して培養するステップと、(4) 前記ステップ(3)の後、塩基性繊維芽細胞成長因子を含むが前記多血小板血漿は含まない第2培養液で培養するステップとを含む、ヒト骨膜培養方法を提供する。

WO 2009/025374 A1



添付公開書類：
— 国際調査報告書

明 細 書

ヒト骨膜培養方法

技術分野

[0001] 本発明は、再生医療に用いる自家骨膜の培養方法に関し、具体的には、歯周組織再生療法に用いる自家骨膜の培養方法に関する。

背景技術

[0002] 歯周病は我が国において成人の約8割が罹患しているといわれており、国民病といっても過言ではない。歯周病の病態が進行すると歯槽骨が失われ、結果として歯が脱落してしまう。現行の歯周病の治療は、炎症の原因となる歯垢や歯石、不良肉芽などを除去し、新しい歯周組織を回復させることを目的としている。しかしながら、炎症原因の除去を目的とする治療法では、歯周疾患の進行を防ぐことは可能であるが、一旦失われた組織を回復することはできない。欠損した歯槽骨を再生させる治療法として、自家移植による歯周組織再生細胞療法がある。本細胞療法では、骨芽細胞の前駆細胞として患者自身の骨髄幹細胞から付着性の細胞を選別し、人工的な基材と呼ばれる細胞の足場とともに移植することで、患者自身の細胞が本来維持している組織再生能力を引き出すことができる。新潟大学では、本細胞療法を積極的に実施しており(特許文献1及び2)、顕著な再生効果が認められた。

特許文献1:特願2007-051153明細書

特許文献2:特願2007-147906明細書

発明の開示

発明が解決しようとする課題

[0003] しかし従来技術では、骨膜片を患者から採取してから、培養下で骨膜シートを成長させて移植に供するまでに45日程度の期間を要する。これは患者にとって長すぎるだけでなく、医療機関にとっては患者1人当たりの骨膜培養設備の占有期間が長いため、症例数の増加を妨げている。また長期間培養では感染や検体取り違えの危険性が高くなる。そのため、本細胞療法は、高い治療効果が認められるにもかかわらず、普及が進まない。そこで、培養期間が短いヒト骨膜の促成培養方法を開発する必

要がある。

課題を解決するための手段

- [0004] 本発明は、(1)培養液を添加しない培養ディッシュに患者から採取した骨膜片を戴置するステップと、(2)前記培養ディッシュ上の骨膜片の表面に前記患者の多血小板血漿を滴下して骨膜片の表面を覆うように凝固させるステップと、(3)前記培養ディッシュに第1培養液を添加して培養するステップと、(4)前記ステップ(3)の後、塩基性繊維芽細胞成長因子を含むが前記多血小板血漿は含まない第2培養液で培養するステップとを含む、ヒト骨膜培養方法を提供する。
- [0005] 本発明のヒト骨膜培養方法の前記ステップ(3)は、トランスフォーミング成長因子ベータを含む第1培養液を添加して培養する場合がある。
- [0006] 前記トランスフォーミング成長因子ベータはトランスフォーミング成長因子ベータ1の場合がある。
- [0007] 本発明のヒト骨膜培養方法の前記ステップ(1)は、患者から採取した前記骨膜片に赤血球溶解処理を施し、生理食塩水による洗浄を行った後で第1培養液で培養する場合がある。
- [0008] 本発明のヒト骨膜培養方法は、(5)前記ステップ(4)の後、骨芽細胞分化誘導剤を含む第3培養液で培養するステップを含む場合がある。
- [0009] 本発明のヒト骨膜培養方法の前記ステップ(5)に用いる骨芽細胞分化誘導剤は、デキサメタゾン、ビタミンC及びβ-グリセロリン酸を含む場合がある。
- [0010] 本発明は、本発明のいずれかのヒト骨膜培養方法により培養されたヒト骨膜由来の細胞を提供する。
- [0011] 本発明は、骨芽細胞分化誘導剤を含む第3培養液で培養するステップを含む本発明のいずれかのヒト骨膜培養方法により培養された、ヒト骨膜由来の造骨細胞を提供する。
- [0012] 本発明は、本発明のヒト骨膜由来の造骨細胞から作成される人工骨を提供する。
- [0013] 本発明は、本発明のヒト骨膜由来の造骨細胞を基材に埋め込んで石灰化させるステップを含む、造骨細胞の使用方法を提供する。
- [0014] 再生医療は、次の3つに大きく分類することができる。すなわち、増殖因子に加えて

、基材(細胞の足場)単独の移植、細胞単独の移植、基材と細胞の組合せによる移植、である。さらに、基材と細胞の組合せは、細胞採取後の即時移植と培養による細胞操作後の移植の2つに分けられる。培養人工骨というのは、後者であり、「インビトロ(in vitro)で造骨能を発現した状態まで細胞インテリジェント化を進めてから移植することにより、自家骨移植に匹敵する治療効果を引き出す」ことを目的としている。本発明の骨膜培養方法は、患者から採取したヒト骨組織、特にヒト骨膜片を試験管内で培養して、骨膜由来の細胞を増殖させ、その後、骨芽細胞に分化させる方法をいう。

[0015] 本発明の骨膜片は患者のいずれかの硬組織を覆う骨膜から採取された骨膜の断片をいう。本発明の骨膜片は歯肉下骨表面から採取される場合がある。本発明の骨膜片の形状及びサイズは特に制限はないが、骨膜片から遊走した細胞が培養ディッシュ上で形成する培養骨膜シートを得ることが目的であるから、大きなサイズである必要はない。10mm x 10mmから1mm x 1mmまでの範囲のサイズであることが好ましく、約5mm x 5mmのサイズがより好ましい。

[0016] 本発明の生理食塩水は、0.9%NaCl水溶液、リンゲル液、リン酸緩衝生理食塩水(以下、「PBS」という。)その他これらに類するヒト骨膜細胞と等張の溶液をいう。本発明の生理食塩水は、pH緩衝剤を含まない場合があり、あるいは、pH緩衝剤として、リン酸バッファー、重炭酸バッファー、Hepesバッファーその他これらに類するバッファーを含む場合がある。本発明の生理食塩水には、Tyrode、Earl、Hank、Dulbecoらの処方による平衡塩溶液を含むが、これらに限定されない。本発明の生理食塩水は高圧滅菌又は孔径0.22 μ mのフィルター濾過滅菌により無菌処理されたものを用いる。

[0017] 培養液は、以下に説明する、多血小板血漿、塩基性繊維芽細胞成長因子又は骨芽細胞分化誘導剤を10%ウシ胎児血清とともに添加することによりヒト骨膜片由来の細胞を増殖分化させることができることを条件として、いずれの培養液を用いてもよい。好ましい培養液はメディウム199である。なお、本発明のヒト骨膜培養方法で培養された細胞を最終的に該細胞を採取した患者の体内に戻す場合には、狂牛病のリスクを回避するために、狂牛病の発生がないオーストラリア産ウシ胎児血清を含む培地を用いることが好ましい。また、塩基性繊維芽細胞成長因子及び骨芽細胞分化誘導剤

も動物から精製した標品ではなく遺伝子組換え技術により産生された標品を用いることが好ましい。本発明の培養液には、ビタミンC、すなわち、アスコルビン酸を $25\mu\text{g}/\text{mL}$ 、抗菌剤として、ペニシリンGカリウム塩を100単位 $/\text{mL}$ 、ストレプトマイシンを $0.1\text{mg}/\text{mL}$ 、アムホテリシンBを $0.25\mu\text{g}/\text{mL}$ 含む場合がある。本発明の培養液は高圧滅菌又は孔径 $0.22\mu\text{m}$ のフィルター濾過滅菌により無菌処理されたものを用いる。

[0018] 本発明の第1培養液は多血小板血漿(platelet rich plasma)を添加した培養液である。多血小板血漿の調製は、例えば、Okuda, K. ら、J. Periodontol. (2003) 849-857及び特開2004-201799号明細書に従って行う。簡潔には、患者から採血した新鮮な全血をクエン酸及びブドウ糖を含む抗凝固剤を添加した10mL遠心管に分注し、最短径約57mm、最長径約140mmのスウィングバケット型ロータで2,400rpm、10分間遠心する。遠心分離すると、赤血球が沈殿し、上清の血漿との間に血小板が集まる。次に、血小板及び血漿を別の10mL遠心管に移して3,600rpm、15分間遠心して、血小板を沈殿させ、最少量の血漿中に懸濁して回収した分画を多血小板血漿として使用する。本発明の多血小板血漿は患者から採取した新鮮なものを使用する場合もあるが、凍結保存したものを使用する場合もある。以下に説明するとおり、多血小板血漿は骨膜片からの細胞の遊走を促進することを可能にするいかなる条件で使用してもよい。例えば、直接骨膜片に滴下して5%CO₂、95%空気、飽和水蒸気雰囲気中で37°Cで20-30分間インキュベートして骨膜片の表面を覆うように凝固させるのに使用される場合があり、10%ウシ胎児血清を添加したメディアウム199のような培養液中に多血小板血漿を約0.5%添加した第1培養液として使用する場合もある。培養液の量及び交換頻度も骨膜片からの細胞の遊走と、培養ディッシュ基質上での増殖とを促進することを可能にするいかなる条件であってもよい。例えば、100mm径のディッシュについて培養開始時は5mLの第1培養液を添加し、その後は10mLの第1培養液を添加する場合がある。培養液の交換頻度は1週間あたり2回の頻度の場合がある。

[0019] 第1培養液は、トランスフォーミング成長因子ベータを含む場合がある。トランスフォーミング成長因子ベータは、狂牛病等の感染症のリスクを回避するために、動物から

精製した標品ではなく遺伝子組換え技術により産生された標品を用いることが好ましい。トランスフォーミング成長因子ベータは、PeproTech Inc. (免疫生物研究所)、日本ベクトン・ディッキンソン株式会社、R&D Systems, Inc. (コスモ・バイオ株式会社)等のさまざまなメーカーの製品が商業的に入手可能である。第1培養液中のトランスフォーミング成長因子ベータの濃度は、骨膜片から培養ディッシュ基質上への細胞の遊走を促進することを可能にするいかなる濃度で使用してもよい。例えば、トランスフォーミング成長因子ベータの濃度は1ng/mLの濃度の場合がある。トランスフォーミング成長因子ベータは、TGF β 1、TGF β 2、TGF β 3をはじめとする遺伝子ファミリーの構成メンバーがある。本発明においてトランスフォーミング成長因子ベータは、前記遺伝子ファミリーのいずれであってもよいが、TGF β 1が好ましい。

[0020] 第2培養液は塩基性繊維芽細胞成長因子(b-FGF)を添加した培養液である。塩基性繊維芽細胞成長因子は、狂牛病等の感染症のリスクを回避するために、動物から精製した標品ではなく遺伝子組換え技術により産生された標品を用いることが好ましい。塩基性繊維芽細胞成長因子は、PeproTech Inc. (免疫生物研究所)、日本ベクトン・ディッキンソン株式会社、R&D Systems, Inc. (コスモ・バイオ株式会社)等のさまざまなメーカーの製品が商業的に入手可能である。第2培養液中の塩基性繊維芽細胞成長因子の濃度は、骨膜片から遊走した細胞の培養ディッシュ基質上での増殖を促進することを可能にするいかなる濃度で使用してもよい。例えば、塩基性繊維芽細胞成長因子の濃度は5-10ng/mLの濃度の場合がある。培養液の量及び交換頻度も骨膜片から遊走した細胞の培養ディッシュ基質上での増殖を促進することを可能にするいかなる条件であってもよい。例えば、10mm径のディッシュに10mLの体積の第2培養液を1週間あたり2回の頻度で交換する場合がある。第1培養液から第2培養液に切り替える時期は、骨膜片から培養ディッシュ上に遊走した細胞の数がその後の増殖により患者に戻す自家移植治療に十分であることを条件として、特に制限はない。例えば骨膜片の全周にわたって骨膜片から培養ディッシュへの遊走が認められる時期に第1培養液から第2培養液に切り替える場合がある。

[0021] 第3培養液は骨芽細胞分化誘導剤を添加した培養液である。骨芽細胞への分化は、アルカリ性ホスファターゼ活性の上昇を指標として判断される。骨芽細胞分化誘

導剤には、デキサメタゾン、ビタミンC及びβ-グリセロリン酸からなる群から選択される少なくとも1つの化合物が含まれる。これらの骨芽細胞分化誘導剤は、シグマ、カルbiochemその他のメーカーから単剤として入手して混合使用する場合があり、例えば、R&D Systems, Inc. (コスモ・バイオ株式会社)から入手可能なStemXVivo(商標)骨形成サプリメントのような商業的に入手可能な合剤試薬を使用する場合がある。培養液中の骨芽細胞分化誘導剤の濃度は、骨芽細胞への分化を可能にするいかなる濃度であってもかまわない。例えば、デキサメタゾンが10nM、ビタミンCが25 μg/mL、β-グリセロリン酸が2mMの場合がある。培養液の量及び交換頻度も骨膜片から遊走し増殖した細胞の培養ディッシュ基質上でのアルカリ性ホスファターゼ発現を促進することを可能にするいかなる条件であってもよい。例えば、10mm径のディッシュに10mLの体積の第2培養液を1週間あたり2回の頻度で交換する場合がある。第2培養液から第3培養液に切り替える時期は、骨膜片由来の細胞の数が第2培養液中の増殖により患者に戻す自家移植治療に十分であることを条件として、特に制限はない。例えば、骨膜片由来の細胞が直径60mm程度まで増殖するときに第2培養液から第3培養液に切り替える場合がある。図1は、第1ないし第3培養液を用いる順序とそれぞれの培養液に添加されるサプリメントとを示す。

[0022] 培養ディッシュその他の容器は、本発明のヒト骨膜培養方法で培養された細胞を最終的に該細胞を採取した患者の体内に戻す場合に、狂牛病等の感染症のリスクを回避できることを条件として、いかなるものを使用してもよい。例えば、ガンマ線照射滅菌されたTPP、ファルコン(日本ベクトン・ディッキンソン株式会社)又はヌンク(ナルジェ ヌンク インターナショナル株式会社)の100mm径組織培養用ディッシュを用いる場合がある。

[0023] 本発明の骨膜片は、患者から採取された後、培養液で湿らせたガーゼの上に乗せて無菌的に培養室に運ばれ、無菌的に前処理及び培養され、最終的に患者に自家移植される。

[0024] 本発明の骨膜片の培養に先立つ前処理として、赤血球溶解処理及び培養ディッシュへの骨膜片の貼り付けを行なう場合がある。赤血球溶解処理は、溶血処理ともよばれ、赤血球が多数混入することにより骨膜片と培養ディッシュとの接着の障害が起こ

ることを防ぐための処理である。赤血球溶解処理は、固定剤を含まない少量の NH_4Cl 溶液、例えば、VersaLyse Lysing Solution (商標、ベックマン コールター株式会社) 又は PharmLyse (商標、Pharmingen、BD バイオサイエンス、日本ベクトン・ディッキンソン株式会社) で短時間 (3分間以内) 処理した後、PBSで3回洗浄することによって行なう場合がある。PBS洗浄後、骨膜片は、乾燥した培養ディッシュの上に戴置し、5% CO_2 、95%空気、飽和水蒸気雰囲気中で37°Cで20-30分間インキュベートして、過剰な水分を蒸発させて、骨膜片を培養ディッシュ上に貼り付ける場合がある。

[0025] 骨膜片は、培養ディッシュ上に戴置された後直ちに、あるいは、インキュベートにより骨膜片を培養ディッシュに貼り付けた後、第1培養液を添加して培養が開始される場合がある。また第1培養液を添加する前に、多血小板血漿によるコーティングを行なう場合もある。多血小板血漿によるコーティングは、培養ディッシュ上に貼り付けられた骨膜片の表面に、多血小板血漿を滴下して多血小板血漿が骨膜片を覆った状態でゲル状に凝固させることによって行なう場合がある。凝固は、例えば、5% CO_2 、95%空気、飽和水蒸気雰囲気中で37°Cで多血小板血漿が注がれた骨膜片を20-30分間インキュベートすることによって行なわれる。多血小板血漿による骨膜片のコーティングにより、多層性の細胞遊走が誘導され、骨膜本来の解剖学的構造を比較的保存したまま骨膜由来の細胞を培養下で成長させることができる。

[0026] 本発明のヒト骨膜由来の細胞の骨芽細胞への分化は、アルカリ性ホスファターゼ活性の上昇を指標として判断される。骨組織の石灰化がアルカリ性ホスファターゼ活性に依存しているからである。アルカリ性ホスファターゼ活性は細胞内のアルカリ性ホスファターゼ酵素を抽出して呈色反応産物を比色定量することができる。代替策として、細胞を固定して、アルカリ性ホスファターゼの不溶性反応産物の局在か、抗アルカリ性ホスファターゼ抗体による酵素タンパク質の局在かを検出する場合がある。

[0027] 本発明の造骨細胞は、試験管内でアルカリ性ホスファターゼを発現し、生体内で骨組織の石灰化を行なう細胞をいう。本発明の造骨細胞の使用 방법에用いる基材は、本発明の造骨細胞が立体的な組織を構築するための足場であって、多孔質ハイドロキシアパタイトブロック体、ハイドロキシアパタイト顆粒、多血小板血漿その他の無機

及び／又は有機物質で作られる。本発明の基材は生体適合性があることが好ましい。本発明の人工骨は、歯周病その他の原因による骨欠損に対応するために、本発明の造骨細胞を基材に埋め込んで作成される。

(生命倫理)

ヒト由来歯根膜細胞を使用するに当たって、新潟大学医歯学総合病院の倫理規定に基づき作成した実験計画を新潟大学歯学部倫理委員会で承認を受けた(平成17年5月9日、平成18年6月22日)。さらに、インフォームドコンセントにより、その都度、患者に対して歯根膜組織からの歯根膜細胞の採取と実験への供与について説明し、同意を得られることを前提とした。

図面の簡単な説明

[0028] [図1]第1ないし第3培養液を用いる順序とそれぞれの培養液に添加されるサプリメントとを示す模式図。

[図2]培養5日目の骨膜片からの細胞遊走を示す光学顕微鏡写真。

[図3]さまざまな条件下での培養5日目の骨膜片から遊走した細胞の増殖を示す光学顕微鏡写真。

[図4]培養15日目の骨膜片から遊走した細胞の増殖を示す光学顕微鏡写真。

[図5]培養27日目に固定、染色した培養骨膜シートのアルカリ性ホスファターゼ発現を示す写真。

発明を実施するための最良の形態

[0029] 以下に本発明の実施例によって、本発明を詳細に説明するが、本発明はこれらの実施例により何ら制限されるものではない。

実施例 1

[0030] 1. 採取した骨膜片の輸送と培養への前処置

採取した骨膜片は原法にしたがって、培地で湿したガーゼの上に載せ、無菌的に培養室に運び、クリーンベンチ内で以降の操作を行った。VersaLyse Lysing Solution(商標、ベックマン コールター株式会社)で最長3分間赤血球溶解処理を行った。PBSで3回洗浄してから、100mm径ディッシュ(TPP、#93100)の中央に静置した。その後、CO₂インキュベータ内で20-30分間程度インキュベートし、過剰な水

分を蒸発させた後、骨膜片をディッシュに接着させた。

[0031] 2. 骨膜片の培養ディッシュへの付着と多血小板血漿の処置

骨膜片を採取したのと同じ患者から採取した血液から多血小板血漿分画を採取した。患者から採血した新鮮な全血をクエン酸及びブドウ糖を含む抗凝固剤を添加した10mL遠心管に分注し、最短径約57mm、最長径約140mmのスウィングバケット型ロータで2,400rpm、10分間遠心した。遠心分離すると、赤血球が沈殿し、上清の血漿との間に血小板が集まった。次に、血小板及び血漿を別の10mL遠心管に移して3,600rpm、15分間遠心して、血小板を沈殿させ、最少量の血漿中に懸濁して回収した分画を多血小板血漿として使用した。これを10–20 μ Lだけ骨膜片の表面に滴下し、20–30分インキュベートした。多血小板血漿がややゲル状に凝固した後、第1培養液として多血小板血漿を0.5%、ペニシリンGカリウム塩を100単位/mL、ストレプトマイシンを0.1mg/mL、アムホテリシンBを0.25 μ g/mL (Antibiotic–Antimycotic (100x) liquid (#15240–062、インビトロジェン株式会社)を100倍希釈して使用)、ビタミンCを25 μ g/mL、オーストラリア産ウシ胎児血清を10%含むメディウム199培養液を5mL添加した。

[0032] 骨膜片からの細胞遊走を促進する培養条件の検討には以下の条件(A)～(F)を用いた。条件(A)は、前記培養ディッシュ上の骨膜片の表面に前記患者の多血小板血漿を滴下して骨膜片の表面を覆うように凝固させること(以下、「PRPコーティング」という。)を行わずに、多血小板血漿もいかなる成長因子も含まない第1培養液を添加する条件(以下、「control」という。)であった。条件(B)は、PRPコーティングを行わずに、5ng/mLの塩基性繊維芽細胞成長因子(Recombinant Human FGF–basic (#100–18B)、PeproTech Inc.、免疫生物研究所)を添加した第1培養液を添加する条件(以下、「bFGF」という。)であった。条件(C)は、PRPコーティングを行わずに、1ng/mLのトランスフォーミング成長因子ベータ(TGF β 1、R&D Systems)を含む第1培養液を添加する条件(以下、「TGF β 1」という。)であった。条件(D)は、PRPコーティングを行い、多血小板血漿もいかなる成長因子も含まない第1培養液を添加する条件(以下、「PRP」という。)であった。条件(E)は、PRPコーティングを行い、5ng/mLの塩基性繊維芽細胞成長因子を含む第1培養液を添加

する条件(以下、「PRP+bFGF」という。)であった。条件(F)は、PRPコーティングを行い、1ng/mLのトランスフォーミング成長因子ベータ1を含む第1培養液を添加する条件(以下、「PRP+TGF β 1」という。)であった。

[0033] 3. 培養液交換のタイミング

培養液は1週間に2回交換した。100mm径の培養ディッシュに添加する培養液の体積は、培養開始時は5mLであったが、最初の培養液交換以降は10mLに増やした。培養開始第7日に第1培養液から第2培養液として、5–10mg/mLの塩基性繊維芽細胞成長因子(Recombinant Human FGF–basic(#100–18B)、Pepr oTech Inc.、免疫生物研究所)、ペニシリンGカリウム塩を100単位/mL、ストレプトマイシンを0.1mg/mL、アムホテリシンBを0.25 μ g/mL(Antibiotic–Antimycotic(100x)liquid(#15240–062、インビトロジェン株式会社)を100倍希釈して使用)、ビタミンCを25 μ g/mL、オーストラリア産ウシ胎児血清を10%含むメデイウム199培養液に切り替えた。その後、培養開始第21日目に第2培養液から、第3培養液として、デキサメタゾン10nM、ビタミンCを25 μ g/mL、 β –グリセロリン酸を2mM、ペニシリンGカリウム塩を100単位/mL、ストレプトマイシンを0.1mg/mL、アムホテリシンBを0.25 μ g/mL(Antibiotic–Antimycotic(100x)liquid(#15240–062、インビトロジェン株式会社)を100倍希釈して使用)、オーストラリア産ウシ胎児血清を10%含むメデイウム199培養液に切り替えた。

[0034] 4. ALP活性と石灰化物の組織化学的検出

細胞のALP活性は、10%中性ホルマリン固定の後、市販のキット(アルホス染色キット、武藤化学)を用いて検出した。簡潔には、培養ディッシュをPBSでリンスした後、ホルマリン固定し、基質としてナフトールAS–MXホスフェート、ジアゾニウム塩としてファーストブルーRR塩を用いて酵素反応を行わせ、不溶性の青色の反応産物によって酵素の局在を検出した。なお、細胞は1%サフラニンOで赤紫色に後染色した。

[0035] 5. 結果

(1) 骨膜片からの細胞遊走

図2は培養5日目の骨膜片からの細胞遊走を示す位相差顕微鏡写真である。右は、本発明の骨膜培養方法にしたがって、赤血球溶解処理及び多血小板血漿によるコ

ーティング処理を施した骨膜片を多血小板血漿を0.5%含む第1培養液で培養した結果の位相差顕微鏡写真であり、骨膜片の周辺全体から細胞の遊走がみられ、骨膜片から1mm以上の距離の移動が観察された。左は、赤血球溶解処理及び多血小板血漿によるコーティング処理をともに施さない対照実験の骨膜片を多血小板血漿を含まない培養液で培養した結果の位相差顕微鏡写真であり、骨膜片の周辺の一部のみから細胞の遊走はみられず、0.1ないし0.2mmの距離の移動しか観察されなかった。

[0036] (2) 骨膜片からの細胞遊走を促進する培養条件の検討

図3はさまざまな培養条件下での培養5日目の骨膜片からの細胞遊走を示す位相差顕微鏡写真である。左上段は条件(A)、右上段は条件(B)、左中段は条件(C)、右中段は条件(D)、左下段は条件(E)、右下段は条件(F)でそれぞれ5日間培養した骨膜片の培養である。前記骨膜片にPRPコーティングを施して成長因子を含まない第1培養液で培養した場合(条件(D)、図3右中段)には図2と同様に活発な細胞遊走がみられたが、PRPコーティングを施さないときには、塩基性繊維芽細胞成長因子を添加した第1培養液で培養した場合(条件(B)、図3右上段)でも、トランスフォーミング成長因子ベータ1を添加した第1培養液で培養した場合(条件(C)、図3左中段)でも、成長因子を含まない第1培養液で培養した対照実験(条件(A)、図3左上段)と同様で、ほとんど細胞遊走がみられなかった。PRPコーティングを施すときには、塩基性繊維芽細胞成長因子を添加した第1培養液で培養した場合(条件(E)、図3左下段)には、成長因子を含まない第1培養液で培養した場合(条件(D)、図3右中段)に比べて細胞遊走がほぼ同程度であった。逆に、トランスフォーミング成長因子ベータ1を添加した第1培養液で培養した場合(条件(F)、図3左下段)には、成長因子を含まない第1培養液で培養した場合(条件(D)、図3右中段)に比べて細胞遊走が促進された。これらの実験結果から、本発明のヒト骨膜培養方法における前記培養ディッシュ上の骨膜片の表面に前記患者の多血小板血漿を滴下して骨膜片の表面を覆うように凝固させるステップ(PRPコーティング)は、塩基性繊維芽細胞成長因子又はトランスフォーミング成長因子ベータを含む培養液では置換できないことが明らかになった。また、PRPコーティングを施す場合に、さらに塩基性繊維芽細胞成長因

子を添加しても細胞遊走を促進することはないが、さらにトランスフォーミング成長因子ベータ1を添加すると、成長因子を含まない培養液の場合よりも細胞遊走を促進することがわかった。

[0037] (3) 培養ディッシュ上での細胞増殖

図4は培養15日目の骨膜片細胞の増殖を示す位相差顕微鏡写真である。右は、本発明の骨膜培養方法にしたがって、赤血球溶解処理及び多血小板血漿によるコーティング処理を施した骨膜片を1週間多血小板血漿を0.5%含む第1培養液で培養した後、塩基性繊維芽細胞成長因子を10ng/mL含む第2培養液に切り替えてさらに8日間培養した結果の位相差顕微鏡写真であり、顕著な細胞増殖が観察された。左は、赤血球溶解処理及び多血小板血漿によるコーティング処理をともに施さない対照実験の骨膜片をサプリメントを含まない培養液で15日間培養した結果の位相差顕微鏡写真であり、細胞の遊走及び増殖は低調であった。

[0038] (4) アルカリ性ホスファターゼの発現

図5は培養27日目に固定、染色した培養骨膜シートのアルカリ性ホスファターゼ発現を示す写真である。薄灰色は細胞を示し、濃灰色はアルカリ性ホスファターゼ活性の検出された部分を示す。右は本発明の骨膜培養方法にしたがって、赤血球溶解処理及び多血小板血漿によるコーティング処理を施した骨膜片を多血小板血漿を0.5%含む第1培養液で1週間培養した後、塩基性繊維芽細胞成長因子を10ng/mL含む第2培養液に切り替えて2週間培養し、その後、デキサメタゾン 10nM 、ビタミンCを $25\mu\text{g/mL}$ 、 β -グリセロリン酸を 2mM 含む第3培養液に切り替えて5日間培養した培養ディッシュの染色結果である。顕著な細胞増殖と強いアルカリ性ホスファターゼ活性が認められた。左は、赤血球溶解処理及び多血小板血漿によるコーティング処理をともに施さない対照実験の骨膜片をサプリメントを含まない培養液で27日間培養した培養ディッシュの染色結果である。アルカリ性ホスファターゼ活性はわずかしか認められなかった。

[0039] 本発明の骨膜培養方法で増殖成長した骨膜シートの大きさは20日間で平均直径が60mm程度、27日間で平均直径90-100mmであった。これに対し、従来の培養方法で増殖成長した骨膜シートの大きさは45日間で平均直径が60mm程度にす

ぎなかった。そこで、本発明の培養方法は、従来の培養方法より50%以上の短縮を実現したと考えられる。

請求の範囲

- [1] (1)培養液を添加しない培養ディッシュに患者から採取した骨膜片を戴置するステップと、
(2)前記培養ディッシュ上の骨膜片の表面に前記患者の多血小板血漿を滴下して骨膜片の表面を覆うように凝固させるステップと、
(3)前記培養ディッシュに第1培養液を添加して培養するステップと、
(4)前記ステップ(3)の後、塩基性繊維芽細胞成長因子を含むが前記多血小板血漿は含まない第2培養液で培養するステップとを含むことを特徴とするヒト骨膜培養方法。
- [2] 前記ステップ(3)は、トランスフォーミング成長因子ベータを含む第1培養液を添加して培養することを特徴とする、請求項1に記載のヒト骨膜培養方法。
- [3] 前記トランスフォーミング成長因子ベータはトランスフォーミング成長因子ベータ1であることを特徴とする、請求項2に記載のヒト骨膜培養方法。
- [4] 前記ステップ(1)は、患者から採取した前記骨膜片に赤血球溶解処理を施し、生理食塩水による洗浄を行った後で第1培養液で培養することを特徴とする請求項1ないし3のいずれかに記載のヒト骨膜培養方法。
- [5] (5)前記ステップ(4)の後、骨芽細胞分化誘導剤を含む第3培養液で培養するステップを含むことを特徴とする請求項1ないし4のいずれかに記載のヒト骨膜培養方法。
- [6] 前記骨芽細胞分化誘導剤は、デキサメタゾン、ビタミンC及びβ-グリセロリン酸からなることを特徴とする請求項5に記載のヒト骨膜培養方法。
- [7] 請求項1ないし6のいずれかに記載の方法により培養されたことを特徴とするヒト骨膜由来の細胞。
- [8] 請求項5又は6に記載の方法により得られたことを特徴とするヒト骨膜由来の造骨細胞。
- [9] 請求項8に記載の造骨細胞から作成されることを特徴とする人工骨。
- [10] 請求項8に記載の造骨細胞を基材に埋め込んで石灰化させるステップを含むことを特徴とする造骨細胞の使用方法。

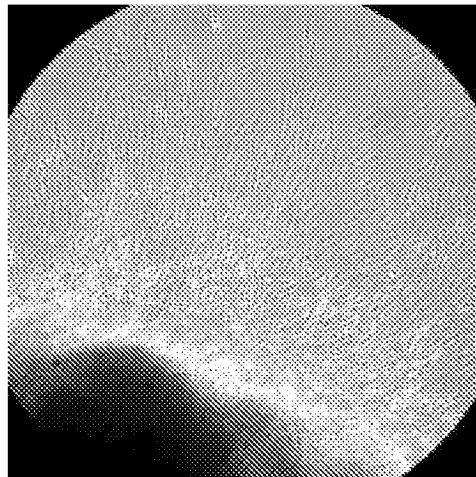
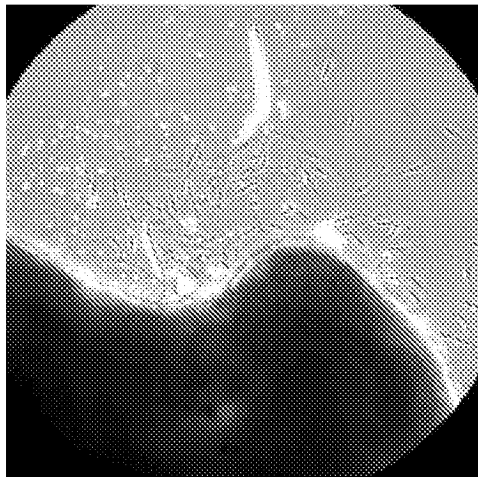
[図1]

骨膜採取・培養開始

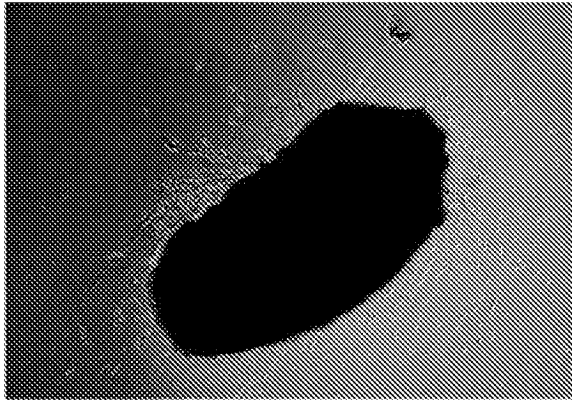
基本培地に
添加する
サプリメント**PRP****bFGF**Dexamethazone
+ vitaminC
+ β -glycerophosphate

(培養日数)

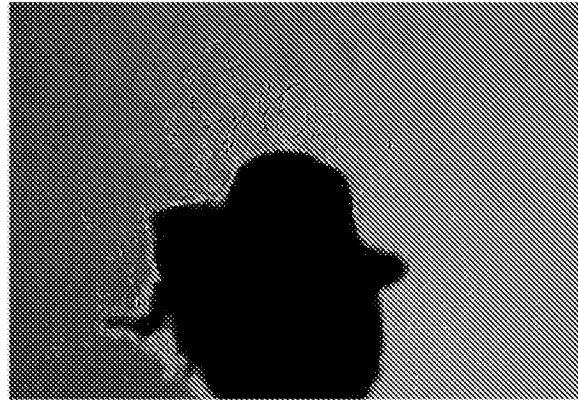
[図2]



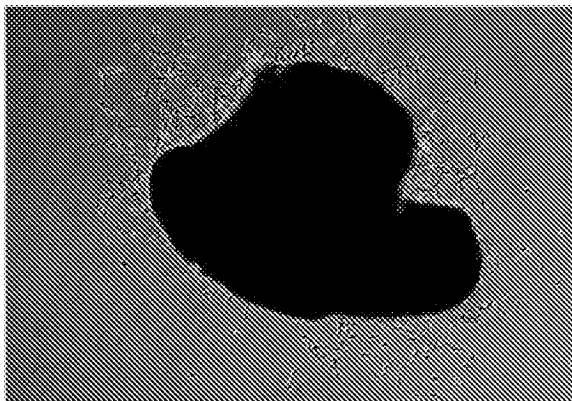
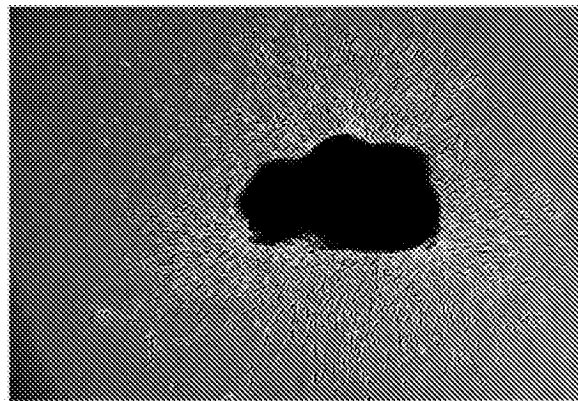
[図3]



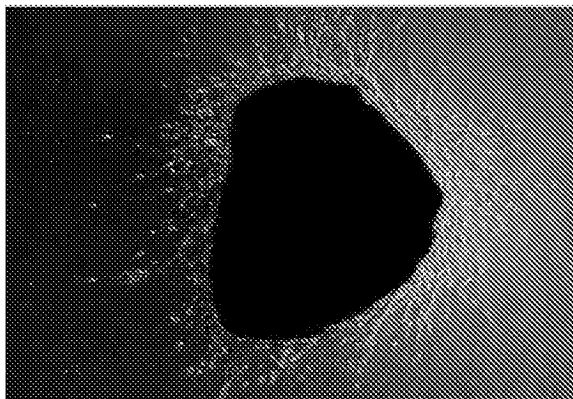
control



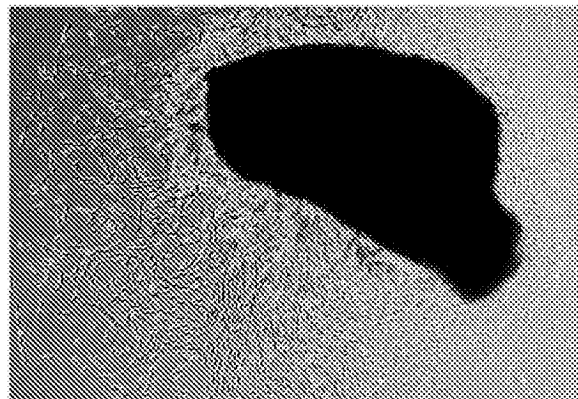
bFGF

TGF β 1

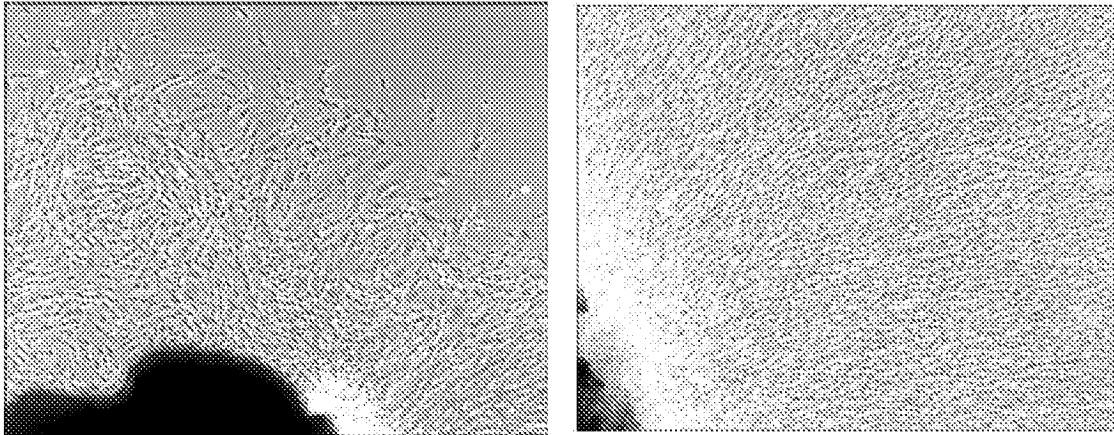
PRP



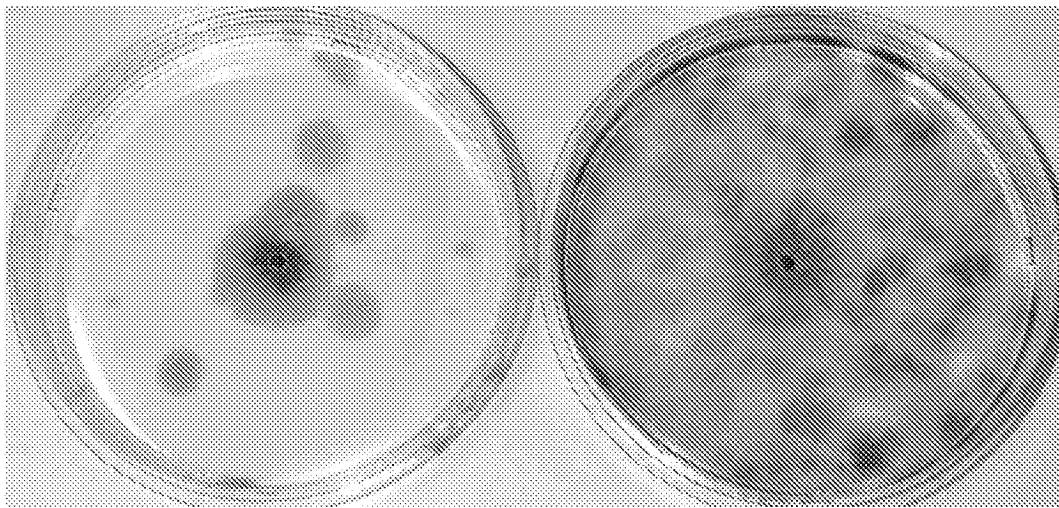
PRP + bFGF

PRP + TGF β 1

[図4]



[図5]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/JP2008/065050

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
C12N5/06(2006.01) i, A61L27/00(2006.01) i

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
C12N5/06, A61L27/00

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Jitsuyo Shinan Koho	1922-1996	Jitsuyo Shinan Toroku Koho	1996-2008
Kokai Jitsuyo Shinan Koho	1971-2008	Toroku Jitsuyo Shinan Koho	1994-2008

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
BIOSIS/WPI (DIALOG), MEDLINE (STN), Science Direct, JSTPlus (JDreamII)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X/Y	JP 2003-52365 A (Japan Science and Technology Corp.), 25 February, 2003 (25.02.03), Par. Nos. [0022] to [0023] (Family: none)	7, 8/1-3, 5, 6, 9, 10
X/A	Minoru UEDA, "Saibo Hybrid-gata Jinkokotsu ni yoru Hone Soshiki no Saisei", Tissue Engineering, 2003, pages 137 to 139	7-10/1-6
Y/A	JP 2005-205074 A (Olympus Corp.), 04 August, 2005 (04.08.05), Claims 1, 4; Par. Nos. [0008] to [0009] (Family: none)	1-3, 5-10/4

Further documents are listed in the continuation of Box C. See patent family annex.

* Special categories of cited documents:	"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
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"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
"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date	"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
"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)	"&" document member of the same patent family
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	

Date of the actual completion of the international search 02 October, 2008 (02.10.08)	Date of mailing of the international search report 14 October, 2008 (14.10.08)
--	---

Name and mailing address of the ISA/ Japanese Patent Office	Authorized officer
Facsimile No.	Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2008/065050

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y/A	Seiji FURUKAWA et al., "Kato Kotsuzui Yurai Kan'yokei Kansaibo no Collagen Gel Baiyo ni Okeru Nankotsu Kishitsu Sansei Tanso Baiyoji ni TGF- β 1, FGF-2 o Tenka suru Kotonon Eikyo", The Journal of the Japanese Orthopaedic Association, 2002, Vol.76, No.8, p.S1106 (2-H2-29)	1-3,5-10/4
A	JP 2003-55237 A (Japan Science and Technology Corp.), 26 February, 2003 (26.02.03), Full text (Family: none)	1-10
A	JP 2006-289062 A (Pentax Corp.), 26 October, 2006 (26.10.06), Claim 18 (Family: none)	1-10
A	Kazuhiro OKUDA et al., "Shishu Soshiki no Saisei Iryo Baiyo Kotsumaku Sheet ni yoru Shishu Soshiki Saisei", Tissue Engineering, 27 June, 2007 (27.06.07), pages 212 to 219	1-10
A	Kenji KUSUMOTO et al., "Hone Kesson eno Taio -Hone·Jinkokotsu Ishoku, Kotsuencho·Saisei-5. Hone Saisei no Jissai to Tenbo", PEPAR, 25 May, 2007 (25.05.07), No.15, pages 84 to 89	1-10
A	JP 2004-201799 A (Niigata TLO Inc.), 22 July, 2004 (22.07.04), Par. No. [0007] (Family: none)	1-10
A	Kanoko YAMAMIYA et al., "Baiyo Kotsumaku Sheet + Takesshoban Kessho + Hydroxyapatite Karyu ni yoru Shishu Soshiki Saisei - Shorei Hokoku", The Japanese Society of Periodontology Gakujutsu Taikai Program Oyobi Koen Shorokushu, 2006, Vol.49th Shunki, page 204	1-10

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int.Cl. C12N5/06(2006.01)i, A61L27/00(2006.01)i

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. C12N5/06, A61L27/00

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

日本国実用新案公報	1922-1996年
日本国公開実用新案公報	1971-2008年
日本国実用新案登録公報	1996-2008年
日本国登録実用新案公報	1994-2008年

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), Science Direct, JSTPlus(JDreamII)

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
X/Y	JP 2003-52365 A (科学技術振興事業団) 2003.02.25, 段落【0022】 - 【0023】 (ファミリーなし)	7, 8/1-3, 5, 6, 9, 10
X/A	上田 実, 細胞ハイブリッド型人工骨による骨組織の再生, ティッシュ・エンジニアリング, 2003, p.137-139.	7-10/1-6

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

の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

02.10.2008

国際調査報告の発送日

14.10.2008

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)

田中 公子

4B

3756

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
Y/A	JP 2005-205074 A (オリンパス株式会社) 2005.08.04, 請求項 1 及び 4, 段落【0008】 - 【0009】 (ファミリーなし)	1-3, 5-10/4
Y/A	古川誠治 他, 家兔骨髄由来間葉系幹細胞のコラーゲンゲル培養における軟骨基質産生 単層培養時に TGF- β 1, FGF-2 を添加することの影響, 日本整形外科学会雑誌, 2002, Vol.76, No.8, p.S1106(2-H2-29)	1-3, 5-10/4
A	JP 2003-55237 A (科学技術振興事業団) 2003.02.26, 全文 (ファミリーなし)	1-10
A	JP2006-289062 A (ペンタックス株式会社) 2006.10.26, 請求項 1 8 (ファミリーなし)	1-10
A	奥田一博 他, 歯周組織の再生医療 培養骨膜シートによる歯周組織再生, ティッシュエンジニアリング, 2007.06.27, Vol.2007, p.212-219.	1-10
A	楠本健司 他, 骨欠損への対応—骨・人工骨移植, 骨延長・再生—5. 骨再生の実際と展望, PEPAR, 2007.05.25, No.15, p.84-89.	1-10
A	JP 2004-201799 A (株式会社新潟ティーエルオー) 2004.07.22, 段落【0007】 (ファミリーなし)	1-10
A	山宮かの子 他, 培養骨膜シート+多血小板血漿+ハイドロキシアパタイト顆粒による歯周組織再生—症例報告, 日本歯周病学会学術大会プログラムおよび講演抄録集, 2006, Vol.49th 春季, p.204.	1-10