

A

(12) 特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局(43) 国際公開日
2011年3月17日 (17.03.2011)

PCT



(10) 国際公開番号

WO 2011/030552 A1

(51) 国際特許分類 :

A61L 27/00 (2006.01)	A61P 1/02 (2006.01)
A61K 35/32 (2006.01)	A61P 43/00 (2006.01)
A61K 38/22 (2006.01)	

(74)

市森岡町源吾35番地独立行政法人国立長寿医療研究センター内 Aichi (JP).

(21) 国際出願番号 :

PCT/JP20 10/005536

(22) 国際出願日 :

2010年9月10日 (10.09.2010)

(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 2009-210441 2009年9月11日 (11.09.2009) JP

(71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 独立行政法人国立長寿医療研究センター (National Center for Geriatrics and Gerontology) [JP/JP]; T 474851 愛知県大府市森岡町源吾35番地 Aichi (JP).

(72) 発明者 ; および

(75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 中島美砂子 (NAKASHIMA, Misako) [JP/JP]; T 474851 愛知県大府市森岡町源吾35番地独立行政法人国立長寿医療研究センター内 Aichi (JP). 庵原耕一郎 (IOHARA, Koichiro) [JP/JP]; T 474851 愛知県大府 (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, CL, 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, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, ML, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PE, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

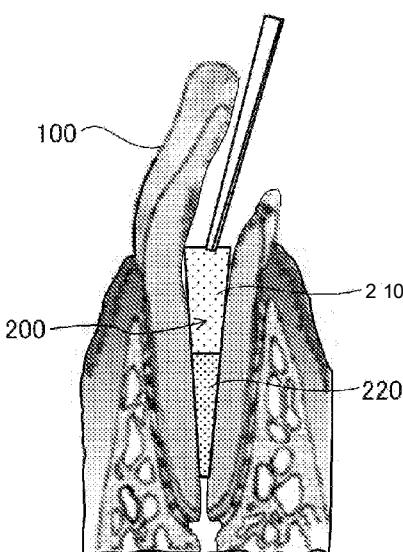
(84) 指定国 表示のない限り、全ての種類の広域保護が可能: ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF,

[続葉有]

(54) Title: ROOT CANAL FILLER FOR NON-EXTRACTED TOOTH AND NON-EXTRACTION METHOD FOR REGENERATING DENTAL TISSUE

(54) 発明の名称 : 非抜歯根管充填材及び非抜歯による歯組織再生方法

[図3G]



(57) Abstract: Disclosed is a root canal filler for non-extracted tooth which causes no internal resorption or external resorption in a tooth with complete root formation, shows no odontoclast, and contributes to the regeneration of a dental tissue in which odontoblasts are smoothly aligned on the dentin wall. After pulpectomy or enlargement/cleaning of an infected root canal, a root canal filler (200) for non-extracted tooth, which comprises tooth pulp stem cells (220) and an extracellular matrix (210), is inserted into the apical side of the root canal of the non-extracted tooth. The tooth pulp stem cells may be, for example, dental pulp CXCR4-positive cells. It is preferred to attach, to the crown side of the root canal, migration factor(s) including at least one factor selected from among a cell migration factor, a cell proliferation factor, a neurotrophic factor and an angiogenic factor.

(57) 要約: 歯根完成歯に対して、内部吸収や外部吸収発生させず、破歯細胞が見られず、象牙質壁に

象牙芽細胞に滑らかに並ぶ歯組織再生を図る非抜歯根管充填材を提供する。非抜歯根管充填材200は、歯髄幹細胞220及び細胞外基質210を有し、抜髄後又は感染根管の根管拡大清掃後、非抜歯の根管の根尖側に挿入される。歯髄幹細胞は、例えば歯髄CXCR4陽性細胞である。根管の歯冠側に細胞遊走因子、細胞増殖因子、神経栄養因子、及び血管新生因子のうち少なくとも何れか一つを含む遊走因子を付着させることが好ましい。

V 2 11/030552 A1



BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, _ 明細書の別個の部分として表した配列リスト
SN, TD, TG) . (規則 5.2(a))

添付公開書類 :

- 國際調査報告 (条約第 21 条(3))

明 細 書

発明の名称：非抜歯根管充填材及び非抜歯による歯組織再生方法 技術分野

[0001] 本発明は、非抜歯の根管に充填される非抜歯根管充填材、及び、その非抜歯根管充填材を使用する非抜歯における歯組織再生方法に関する。

背景技術

[0002] 現在、歯を失う原因は、破折を含めると約半分がう蝕によるもので、歯髄を抜くと歯を失う可能性が激増することが知られている。

[0003] 歯の平均寿命は現在 57 歳といわれ、一生自分の歯で咬むことを考えると、歯の寿命は 20 年以上高める必要がある。8020 運動（80 歳になっても自分の歯を 20 本以上残す運動）にもかかわらず、現在 80 歳の人の歯の平均本数は約 8 本で、高齢者の残存歯数はほとんど増加しておらず、う蝕治療の抜本的改革が必要である。

[0004] 歯の歯髄を除去（拔髄）すると、修復象牙質形成能及び感染防御機構が喪失し、痛みという警告信号の喪失により、う蝕拡大の危険性が増加する。また、拔髄治療に完璧な方法はなく、拔髄・根管充填後、歯冠側からの漏えいにより根尖病巣が生じたり、垂直性破折や審美性の消失、術後疼痛の可能性もある。

[0005] 従って、超高齢社会では、安易に拔髄を行うことを避け、歯の延命化をめざして、歯再生医療技術を組み入れた象牙質・歯髄再生による新しいう蝕・歯髄炎治療法を開発することは非常に重要である。

[0006] 象牙質再生に関しては、細胞治療法あるいは遺伝子治療法として、生体外で歯髄幹細胞／前駆細胞に BMP（Bone morphogenetic proteins, 骨形成因子）等の蛋白質あるいは遺伝子を導入し、三次元培養して分化した象牙芽細胞をその細胞外基質とともに生活歯髄切断面上に自家移植し、大量の象牙質を再生させることができる（非特許文献 1 及び 2）。

[0007] しかしながら、歯髄炎が生じている場合には、象牙質ばかりでなく、歯髄

組織そのものも再生させる必要がある。

- [0008] 一方、歯髄組織は非常に血管と神経に富む組織である。歯髄は創傷を受けると局所から遊走因子が放出され、歯髄深部血管周囲から幹細胞が創傷部に遊走し、増殖・分化し、血管が新生され、修復象牙質が形成される自然治癒メカニズムが存在する。特に歯髄の血管系は栄養や酸素の供給源、代謝産物の排出路、歯髄の恒常性維持に重要である。また、歯髄神経は血流・象牙細管内溶液の流れ・歯髄内圧の調節に重要な役割を有し、血管新生、免疫応答細胞あるいは炎症性細胞浸潤に関与して炎症を調節し、歯髄の恒常性の維持、歯髄防御反応の強化に寄与する。よって、象牙質・歯髄再生においては血管と神経の相互作用及び血管新生・神経再生を考慮する必要がある。
- [0009] S P 細胞は GD31/GD1 46- S P 細胞と GD31/GD1 46+S P 細胞がほぼ半々の割合で含まれ、GD31/GD1 46- S P 細胞は、GD31/GD1 46+S P 細胞に比べ、非常に有意に血管新生・神経再生・歯髄再生を促進し、Stroma leellderived factor-1 (SDF-1)に対するケモカインレセプター、CXCR4 mRNAを有意に発現している。
- [0010] 皮フ等の創傷部位からは SDF-1 が分泌され、SDF-1 に対するヒト幹細胞の遊走は CXCR4 の発現に依存することが知られている。CXCR4 は幹細胞のマーカーともいわれ、ヒト臍帯血からは胚性幹細胞様細胞が GXGR4+/SSEA-4+/Oct-4+ として分取されている（非特許文献 3）。
- [0011] また、マウス胎児の脳からは神経幹細胞として、中枢神経部位に遊走し顕著な神経分化能を有する GXGR4+/SSEA-1+ 細胞が分取されている（非特許文献 4）。
- [0012] 更に、ヒト臍臓において、CXCR4 陽性細胞は多潜能性を有し、インシユリンを分泌する細胞に分化可能な幹細胞・前駆細胞を分取するために用いることができるといわれている（非特許文献 5）。
- [0013] 一方、歯髄再生に関しては、これまで、歯根未完成歯において、抜歯して拔髓・根管治療をした後に再度移植すると歯髄が再生されるといわれている。根尖部に病変を伴う歯根未完成歯でも、抜歯して徹底的な根管拡大・清掃

を行い、セメント・象牙境まで血餅を満たしMineral trioxide aggregate (MTA)で窩洞を完全封鎖することにより、歯髄様組織が再生されるとの報告がある。

[001 4] また、イヌの健全歯根完成歯においては、抜歯後抜髓し、根尖部を切斷するあるいは根尖部を1.1mm以上拡大し再び移植し、血餅を充填すると歯髄様組織の再生がみられるといわれている(非特許文献6)。

[001 5] 上述の根管内歯髄再生は、歯根未完成歯についての報告が大半であり、根管内に再生された組織が血管や神経を伴う歯髄固有の組織であることの証明もなされていない。また、すべて、一旦抜歯して生体外で根管拡大・清掃を行い、再移植して血餅を充填している。

先行技術文献

非特許文献

[001 6] 非特許文献1 :Nakashima and Reddi、2003 (PMID:12949568 doi:10.1038/nbt864)

非特許文献2 :Nakashima and Akamine、2006 (PMID:16186748)

非特許文献3 :Kucia et al. 2007 (PMID:17136117doi:10.1038/sj.jleu.2404470)

非特許文献4 :Corti et al. 2005 (PMID:16150803 doi:10.2478/v1_0042-008-0045-0)

非特許文献5 :KoblasT et al. 2007 (PMID:17328838)

非特許文献6 :Laureyset al. 2001 (PMID:11298308doi:10.1067/mod.2001.113259)

発明の概要

発明が解決しようとする課題

[001 7] しかし、一旦抜歯して生体外で根管拡大・清掃を行い、再移植して血餅を充填する手法では、歯髄腔や根管内の象牙質に起こる特発性の歯質の吸収(内部吸収)が発生する場合があり、この内部吸収が大きくなると象牙質に穿

孔が生じることもある。また、臨床で一般的に行われている歯根の完成した正常智歯等を他の歯喪失部位に再植する治療法については、再植後数年後に内部吸収や外部吸収による歯の動搖や脱落が生じる可能性がある。更に、歯根完成歯の場合における抜髓や感染根管治療における歯髓組織再生方法及び歯髓組織再生のための根管充填材の開発は全く確立されていない。

[001 8] 本発明はかかる問題点に鑑みてなされたものであって、歯根完成歯に対して、内部吸収や外部吸収を発生させず、破歯細胞が見られず、象牙質壁に象牙芽細胞が滑らかに並ぶ歯組織再生を図る新規で独創的で適切な根管充填材、及び、そのような根管充填材を使用する歯組織再生方法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

[001 9] 本発明の第1の観点に係る非抜歯根管充填材は、抜髓後又は感染根管の根管拡大清掃後、非抜歯の根管の根尖側に挿入される、歯髓幹細胞及び細胞外基質を有することを特徴とする。

[0020] 前記歯髓幹細胞は、歯髓CXCR4陽性細胞、SSSEA-4陽性細胞、FLK-1陽性細胞、CD105陽性細胞、歯髓SP細胞、CD31陰性かつCD146陰性細胞、CD24陽性細胞、及び、CD150陽性細胞、CD29陽性細胞、CD34陽性細胞、CD44陽性細胞、CD73陽性細胞、及びCD90陽性細胞のうち少なくとも何れか一つを含むことが好ましい。

[0021] 前記歯髓SP細胞が、CXCR4陽性、SSSEA-4陽性、FLK-1陽性、CD31陰性かつCD146陰性、CD24陽性、CD105陽性、CD150陽性、CD29陽性細胞、CD34陽性細胞、CD44陽性細胞、CD73陽性細胞、又はCD90陽性細胞の何れかであることが好ましい。

[0022] 前記非抜歯根管充填材は、歯髓幹細胞を根管の根尖側に付着させるとともに、根管の歯冠側に細胞遊走因子、細胞増殖因子、神経栄養因子及び血管新生因子のうち少なくとも何れか一つを含む遊走因子を付着させていることが好ましい。

[0023] 前記細胞遊走因子が、SDF-1、VEGF、G-CSF、SCF、MM

P 3 、 S I i t 及び GM—CSF のうち少なくとも何れか一つであることが好ましい。

- [0024] 前記細胞増殖因子が、 IGF 、 bFGF 及び PDGF のうち少なくとも何れか一つであることが好ましい。
- [0025] 前記神経栄養因子が、 GDNF 、 BDNF 、 NGF 、 Neuropeptide Y 及び Neurotrophin 3 のうち少なくとも何れか一つであることが好ましい。
- [0026] 前記細胞外基質が、コラーゲン、人工プロテオグリカン、ゼラチン、ハイドロゲル、フィブリン、フォスフォホリン、ヘパラン硫酸、ヘパリン、ラミニン、フィブロネクチン、アルギン酸、ヒアルロン酸、キチン、PLA 、 PLLA 、 PEG 、 PGA 、 PDLA 、 PCL 、ハイドロキシアパタイト、 β -TCP 、炭酸カルシウム、チタン及び金のうち少なくとも何れか一つを含む生体親和性材料から構成されていることが好ましい。
- [0027] 前記細胞外基質における前記歯髄幹細胞の含有率は、 1×10^3 セル／パル以上 1×10^6 セル／ μ l 以下であることが好ましい。
- [0028] また、本発明の第 2 の観点に係る非抜歯による歯組織再生方法は、抜髄後又は感染根管の根管拡大清掃後の非抜歯の根管の根尖側に、歯髄幹細胞及び細胞外基質を有する非抜歯根管充填材を注入することで、根管内の歯組織を再生することを特徴とする。
- [0029] 前記歯髄幹細胞は、歯髄 CXCR4 陽性細胞、 SSEA-4 陽性細胞、 FLK-1 陽性細胞、 CD105 陽性細胞、歯髄 SP 細胞、 CD31 陰性かつ CD146 陰性細胞、 CD24 陽性細胞、 CD150 陽性細胞、 CD29 陽性細胞、 CD34 陽性細胞、 CD44 陽性細胞、 CD73 陽性細胞、及び CD90 陽性細胞のうち少なくとも何れか一つを含むことが好ましい。
- [0030] 前記歯髄 SP 細胞が、 CXCR4 陽性、 SSEA-4 陽性、 FLK-1 陽性、 CD31 陰性かつ CD146 陰性、 CD24 陽性、 CD105 陽性、 CD150 陽性、 CD29 陽性細胞、 CD34 陽性細胞、 CD44 陽性細胞、 CD73 陽性細胞、又は CD90 陽性細胞の何れかであることが好ましい。
- [0031] 前記非抜歯根管充填材は、歯髄幹細胞を根管の根尖側に付着させるととも

に、根管の歯冠側に細胞遊走因子、細胞増殖因子、神経栄養因子及び血管新生因子のうち少なくとも何れか一つを含む遊走因子を付着させていることが好ましい。

- [0032] 前記細胞遊走因子が、SDF_1、VEGF、G-CSF、SCF、MMP3、Silit及びGM-CSFのうち少なくとも何れか一つであることが好ましい。
- [0033] 前記細胞増殖因子が、IGF、bFGF及びPDGFのうち少なくとも何れか一つであることが好ましい。
- [0034] 前記神経栄養因子が、GDNF、BDNF、NGF、Neuropeptide Y及びNeurotrophin 3のうち少なくとも何れか一つであることが好ましい。
- [0035] 前記細胞外基質が、コラーゲン、人工プロテオグリカン、ゼラチン、ハイドロゲル、フィブリン、フォスフォホリン、ヘパラン硫酸、ヘパリン、ラミニン、フィブロネクチン、アルギン酸、ヒアルロン酸、キチン、PLA、PLGA、PEG、PGA、PDLA、PCL、ハイドロキシアパタイト、 β -TCP、炭酸カルシウム、チタン及び金のうち少なくとも何れか一つを含む生体親和性材料から構成されていることが好ましい。
- [0036] 前記根管充填材を前記根管の根尖側に注入する前に、前記根管を拡大することで根尖部の根管の太さを所定の大きさにすることが好ましい。
- [0037] 前記細胞外基質における前記歯髄幹細胞の含有率は、 1×10^3 セル/パル以上 1×10^6 セル/ μ l以下であることが好ましい。

発明の効果

- [0038] 本発明によれば、歯根完成歯に対して、内部吸収や外部吸収を発生させず、破歯細胞が見られず、象牙質壁に象牙芽細胞が滑らかに並ぶ歯組織再生を図ることができる。

図面の簡単な説明

- [0039] [図1] 図1は、第1実施形態に係る非抜歯根管充填材の説明図である。[図2] 図2は、第1実施形態に係る非抜歯根管充填材の製造工程を説明する説明図である。

[図3A] 図3 Aは、歯髄炎に罹患している歯の説明図である。

[図3B] 図3 Bは、抜髓後の根管拡大処置を行ったところを説明する模式図である。

[図3C] 図3 Cは、非抜歯根管充填材を充填するところを説明する模式図である。

[図3D] 図3 Dは、スポンゼル(ゼラチン)及びレジンを注入したところを説明する模式図である。

[図3E] 図3 Eは、歯髄再生及び血管再生を示す模式図である。

[図3F] 図3 Fは、形態形成因子及びレジンを注入したところを説明する模式図である。

[図3G] 図3 Gは、象牙質再生を示す模式図である。

[図3H] 図3 Hは、細菌が根管壁の象牙質及び根尖歯周組織に及んでいる根尖性歯周炎の模式図である。

[図4A] 図4 Aは、根管の歯冠側に遊走因子を付着させている非抜歯根管充填材の説明図である。

[図4B] 図4 Bは、根管の歯冠側に遊走因子を付着させ、歯冠部側に細胞外基質を残している非抜歯根管充填材の説明図である。

[図5] 図5は、第2実施形態に係る非抜歯根管充填材の製造工程を説明する説明図である。

[図6糾] 図6 八は、抜歯後、生体外で抜髓後根管拡大して、I型・III型混合コラーゲンにSDF_1及びCD105陽性細胞を吸着させて、根管内に注入して再移植した14日後を説明する図である。

[図6B] 図6 Bは、抜歯後、生体外で抜髓後根管拡大して、I型・III型混合コラーゲンにSDF_1及びCD105陽性細胞を吸着させて、根管内に注入して再移植した14日後における根管内部の象牙質壁の高倍像図である。

[図6C] 図6 Cは、抜歯後、生体外で抜髓後根管拡大して、I型・III型混合コラーゲンにSDF_1及びCD105陽性細胞を吸着させて、根管内に注入して再移植した14日後における歯根外側の象牙質・セメント質壁の高倍像

図である。

[図7糾 図7 Aは、抜歯せず生体内で抜髓後根管拡大して、I型・III型混合コラーゲンにSDF_1及びCD105陽性細胞を吸着させて、根管内に注入した14日後を説明する図である。

[図7B] 図7 Bは、抜歯せず生体内で抜髓後根管拡大して、I型・III型混合コラーゲンにSDF_1及びCD105陽性細胞を吸着させて、根管内に注入した14日後における根管内部の象牙質壁の高倍像図である。

[図8糾 図8 Aは、抜歯せず生体内で抜髓後根管拡大して、I型・III型混合コラーゲンにSDF_1及びCXCR4陽性細胞を吸着させて、根管内に注入した14日後を説明する図である。

[図8B] 図8 Bは、抜歯せず生体内で抜髓後根管拡大して、I型・III型混合コラーゲンにSDF_1及びCXCR4陽性細胞を吸着させて、根管内に注入した14日後における根管内部の象牙質壁の高倍像図である。

[図9A] 図9 Aは、イヌ永久歯歯髄組織から分離したフローサイトメトリーによる歯髄由来のCD105陽性細胞の割合を示す図である。

[図9B] 図9 Bは、イヌ脂肪組織から分離したフローサイトメトリーによる脂肪由来のCD105陽性細胞の割合を示す図である。

[図9C] 図9 Cは、イヌ永久歯歯髄組織から分離した培養3日目の初代歯髄CD105陽性細胞を示す図である。

[図9D] 図9 Dは、イヌ永久歯歯髄組織から分離した培養10日目の初代歯髄CD105陽性細胞を示す図である。

[図9E] 図9 Eは、脂肪組織から分離した培養3日目の初代脂肪CD105陽性細胞を示す図である。

[図9F] 図9 Fは、脂肪組織から分離した培養10日目の初代脂肪CD105陽性細胞を示す図である。

[図10A] 図10 Aは、30日目において、歯髄CD105陽性細胞の脂肪誘導能を示す図である。

[図10B] 図10 Bは、30日目において、未分取のトータル歯髄細胞の脂肪誘

導能を示す図である。

[図 10G] 図 10C は、30 日目において、脂肪 CD105 陽性細胞の脂肪誘導能を示す図である。

[図 10D] 図 10D は、歯髄 CD105 陽性細胞、未分取のトータル歯髄細胞、及び脂肪 CD105 陽性細胞の脂肪誘導能の遺伝子発現比較を示す図である。

[図 10E] 図 10E は、12 時間後において、歯髄 CD105 陽性細胞の血管誘導能を示す図である。

[図 10F] 図 10F は、12 時間後において、未分取のトータル歯髄細胞の血管誘導能を示す図である。

[図 10G] 図 10G は、12 時間後において、脂肪 CD105 陽性細胞の血管誘導能を示す図である。

[図 10H] 図 10H は、14 日目において、歯髄 CD105 陽性細胞の Neurosphere 形成能を示す図である。

[図 10I] 図 10I は、14 日目において、未分取のトータル歯髄細胞の Neurosphere 形成能を示す図である。

[図 10J] 図 10J は、28 日目において、歯髄 CD105 陽性細胞のニューロフィラメントによる免疫染色を示す図である。

[図 10K] 図 10K は、歯髄 CD105 陽性細胞のニューロフィラメント、neuromodulin 及び電位依存性ナトリウムチャネル、type Ia (Scn1A) mRNA 発現を示す図である。

[図 10L] 図 10L は、28 日目において、歯髄 CD105 陽性細胞の象牙質・骨形成誘導能を示す図である。

[図 10M] 図 10M は、28 日目において、未分取のトータル歯髄細胞の象牙質・骨形成誘導能を示す図である。

[図 10N] 図 10N は、28 日目において、脂肪 CD105 陽性細胞の象牙質・骨形成誘導能を示す図である。

[図 10O] 図 10O は、歯髄 CD105 陽性細胞、未分取のトータル歯髄細胞、

及び脂肪 C D 1 0 5 陽性細胞の象牙芽細胞への分化能の比較を示す図である。

[図 10P] 図 10P は、 S D F - 1 最終濃度 50ng/ml を添加した歯髄 C D 1 0 5 陽性細胞、分取していないトータル歯髄細胞及び脂肪 C D 1 0 5 陽性細胞の増殖能を示す図であり、培養 2, 12, 24, 及び 36 時間後の細胞数である。

[図 11A] 図 11A は、イヌの抜髓後、14 日目における、空洞の根管内に S D F - 1 とともに歯髄 C D 1 0 5 陽性細胞を自家移植することによる歯髄再生を示す図である。

[図 11B] 図 11B は、イヌの抜髓後、14 日目における、空洞の根管内に S D F - 1 とともに歯髄 C D 1 0 5 陽性細胞を自家移植することによる歯髄再生のうちの一部拡大図である。

[図 11C] 図 11C は、イヌの抜髓後、14 日目における、空洞の根管内に S D F - 1 とともに歯髄 C D 1 0 5 陽性細胞を自家移植することによる歯髄再生のうちの一部拡大図である。

[図 11D] 図 11D は、イヌの抜髓後、14 日目における、空洞の根管内に S D F - 1 とともに歯髄 C D 1 0 5 陽性細胞を自家移植することによる歯髄再生における象牙芽細胞分化を示す図である。

[図 11E] 図 11E は、イヌの抜髓後、14 日目における、空洞の根管内に歯髄 C D 1 0 5 陽性細胞のみを自家移植することによる歯髄再生を示す図である。

[図 11F] 図 11F は、イヌの抜髓後、14 日目における、空洞の根管内に S D F - 1 のみを移植することによる歯髄再生を示す図である。

[図 11G] 図 11G は、イヌの抜髓後、90 日目における、空洞の根管内に S D F - 1 とともに歯髄 C D 1 0 5 陽性細胞を自家移植することによる歯髄再生を示す図である。

[図 11H] 図 11H は、イヌの抜髓後、90 日目における、空洞の根管内に S D F - 1 とともに歯髄 C D 1 0 5 陽性細胞を自家移植することによる歯髄再生

を示す図であり、再生組織上部の新生血管を示す。

[図11I] 図11Iは、イヌの抜髓後、90日目における、空洞の根管内にSDF-1とともに歯髄CD105陽性細胞を自家移植することによる歯髄再生を示す図であり、再生組織中央部の新生血管を示す。

[図11J] 図11Jは、正常歯髄組織の細胞を示す図である。

[図11K] 図11Kは、イヌの抜髓後、空洞の根管内にSDF-1とともに歯髄CD105陽性細胞を自家移植して、90日目における、象牙質側壁に沿つて新しく形成された骨様・細管象牙質(OD)に並列する象牙芽細胞を示す図である。

[図11L] 図11Lは、イヌの抜髓後、空洞の根管内にSDF-1とともに歯髄CD105陽性細胞を自家移植して、90日目における、In situ hybridization分析による象牙芽細胞分化を示す図であり、Enamelysin/MMP20である。

[図11M] 図11Mは、イヌの抜髓後、空洞の根管内にSDF-1とともに歯髄CD105陽性細胞を自家移植して、90日目における、In situ hybridization分析による象牙芽細胞分化を示す図であり、Dentin sialophosphoprotein(Dspp)である。

[図11N] 図11Nは、イヌの抜髓後、14日目における、空洞の根管内にSDF-1とともにトータル歯髄細胞を移植することによる歯髄再生を示す図である。

[図11O] 図11Oは、イヌの抜髓後、14日目における、空洞の根管内にSDF-1とともにトータル歯髄細胞を移植することによる歯髄再生における血管新生を示す拡大図である。

[図11P] 図11Pは、イヌの抜髓後、90日目における、空洞の根管内にSDF-1とともにトータル歯髄細胞を移植することによる歯髄再生を示す図である。

[図11Q] 図11Qは、イヌの抜髓後、90日目における、空洞の根管内にSDF-1とともにトータル歯髄細胞を移植することによる歯髄再生を示す拡大図である。

[図11R] 図11Rは、イヌの抜髓後、14日目における、空洞の根管内にSDF-1とともに脂肪CD105陽性細胞を移植することによる歯髄再生を示す図である。

[図11S] 図11Sは、14日目の新生再生組織の根管表面積に対する割合を示す図であり、データは5サンプルで平均値±SDで表したものである。

[図11T] 図11Tは、BS-1 Lectinによる免疫染色を示す図である。

[図11U] 図11Uは、ホールマウントlectin染色による新生血管の三次元解析であり、移植歯髄CD105陽性細胞が新生毛細血管周囲に存在していることを示す図である。

[図11V] 図11Vは、ホールマウントlectin染色による新生血管の三次元解析であり、14日目における再生組織の誘導血管の三次元像を示す図である。

[図11W] 図11Wは、ホールマウントlectin染色による新生血管の三次元解析であり、DiIラベルの移植細胞が再生組織全体に散在していることを示す図である。

[図11X] 図11Xは、正常歯髄組織を示す図である。

[図11Y] 図11Yは、14日目の新生再生組織のPGP 9.5.免疫染色を示す図である。

[図11Z] 図11Zは、下顎第三切歯に再生された歯髄組織のDiIラベルを示す図である。

[図12A] 図12Aは、正常歯髄組織の二次元電気泳動を示す図である。

[図12B] 図12Bは、再生歯髄組織の二次元電気泳動を示す図である。

[図12C] 図12Cは、正常歯髄組織の二次元電気泳動と再生歯髄組織の二次元電気泳動とを重ね合わせた図である。

[図12D] 図12Dは、正常歯髄組織の二次元電気泳動を示す図である。

[図12E] 図12Eは、歯根膜組織の二次元電気泳動を示す図である。

[図12F] 図12Fは、正常歯髄組織の二次元電気泳動と歯根膜組織の二次元電気泳動とを重ね合わせた図である。

[図13A] 図13Aは、イヌの感染根管治療後、14日目における、抜歯した根

管内に SDF_1とともに歯髄 CD105陽性細胞を自家移植することによる歯髄再生を示す図である。

[図13B] 図13Bは、イヌの感染根管治療後、14日目における、抜歯していない根管内にSDF_1とともに歯髄 CD105陽性細胞を自家移植することによる歯髄再生を示す図である。

[図13G] 図13Gは、イヌの感染根管治療後、14日目における、抜歯していない根管内にSDF_1とともに歯髄 CD105陽性細胞を自家移植することによる歯髄再生を示す一部拡大図である。

[図14A] 図14Aは、イヌの抜髓後、14日目における、抜歯した根管内にG-CSFとともに歯髄 CD105陽性細胞を自家移植することによる歯髄再生を示す図である。

[図14B] 図14Bは、イヌの抜髓後、14日目における、抜歯していない根管内にG-CSFとともに歯髄 CD105陽性細胞を自家移植することによる歯髄再生を示す図である。

[図14G] 図14Gは、イヌの抜髓後、14日目における、抜歯していない根管内にG-CSFとともに歯髄 CD105陽性細胞を自家移植することによる歯髄再生を示す一部拡大図である。

発明を実施するための形態

[0040] 《第1実施形態》

以下、添付の図面を参照して本発明の実施形態について具体的に説明する。本実施形態に係る非抜歯根管充填材は、歯髄幹細胞及び細胞外基質を有し、抜髓後又は感染根管の根管拡大清掃後、非抜歯の根管の根尖側に挿入される。

[0041] 図1は、本実施形態に係る非抜歯根管充填材200の説明図である。非抜歯根管充填材200は、細胞外基質210に歯髄幹細胞220を付着させて形成される。歯髄幹細胞220は、非抜歯根管充填材200の根管の根尖側に付着される。

[0042] 歯髄幹細胞は、永久歯又は乳歯由来の歯髄幹細胞である。歯髄幹細胞は、

歯髄 C X C R 4 陽性細胞、S S E A _ 4 陽性細胞、F L K _ 1 陽性細胞、C D 1 0 5 陽性細胞、歯髄 S P 細胞、C D 3 1 陰性かつ C D 1 4 6 陰性細胞、C D 2 4 陽性細胞、C D 1 5 0 陽性細胞、C D 2 9 陽性細胞、C D 3 4 陽性細胞、C D 4 4 陽性細胞、C D 7 3 陽性細胞、及び C D 9 0 陽性細胞のうち少なくとも何れか一つを含む。例えばイヌ永久歯歯髄細胞は、C X C R 4 細胞陽性を 0 . 8 % 含み、血管新生能等の組織再生能力が高い。

[0043] 歯髄 S P 細胞は、C X C R 4 陽性、S S E A _ 4 陽性、F L K _ 1 陽性、C D 3 1 陰性かつ C D 1 4 6 陰性、C D 2 4 陽性、C D 1 0 5 陽性、C D 1 5 0 陽性、C D 2 9 陽性細胞、C D 3 4 陽性細胞、C D 4 4 陽性細胞、C D 7 3 陽性細胞、又は C D 9 0 陽性細胞の何れかとすることが好ましい。

[0044] なお、GD31/GD1 46- side population (S P) 細胞は、マウス下肢虚血部に移植すると血流回復・血管新生が促進され、ラット脳梗塞虚血部に移植すると神経細胞の分化促進、運動麻痺が回復する。また、イヌの生活歯髄切断面上に移植すると生活歯髄切断面上の窩洞内に血管新生・神経再生・歯髄再生が見られる。このように、歯髄幹細胞として GD31/GD1 46- S P 細胞を用いる場合、歯髄再生能力は高いと考えられるが、S P 細胞を分取するためには、DNA 結合蛍光色素である Hoechst 33342 で細胞をラベルする必要があり、臨床応用をする際、安全性に問題を生じる可能性がある。

[0045] しかしながら、歯髄 C X C R 4 陽性細胞は、コンタミネーションの可能性があるため臨床で使用できないフローサイトメトリー法や高価で使用が限定されている抗体ビーズ法を用いずに、S D F - 1 や A M D 3 1 0 0 、あるいは G _ C S F 等を用いた遊走法により分取できるので、安全且つ安価に分取することができる。そのため、歯髄幹細胞として C X C R 4 陽性細胞を用いる場合は、臨床にて即座に使用することができ、且つ、経済的であるという重大な利点がある。

[0046] 歯髄幹細胞は、歯組織再生の処置を受ける対象動物自身から抽出した自家細胞でもよいし、また、歯組織再生の処置を受ける対象動物以外の動物から抽出した同種細胞でもよい。

- [0047] 非抜歯根管充填材 200 における歯髄幹細胞の含有率は、 1×10^3 セル／パト上 1×10^6 セル／パト下とすることが好ましい。歯髄幹細胞の含有率が、 1×10^3 セル／ μ より少ないと、根管内の歯組織の再生が不十分なものとなる可能性があるからである。一方、歯髄幹細胞の含有率が、 1×10^6 セル／ μ よりも多いと、対象の歯に対して予期せぬ副作用が生じる可能性があるからである。
- [0048] 細胞外基質 (Scaffold) 210 は、コラーゲン、人工プロテオグリカン、ゼラチン、ハイドロゲル、フィブリン、フォスフォホリン、ヘパラン硫酸、ヘパリン、ラミニン、フィブロネクチン、アルギン酸、ヒアルロン酸、キチン、PLA (ポリ乳酸)、PLGA (乳酸グリコール酸共重合体)、PEG (ポリエチレンリコール)、PGA (ポリグルコール酸)、PDLLA (ポリ-DL-乳酸)、PCL (ポリカプロラクトン)、ハイドロキシアパタイト、 β -TCP、炭酸カルシウム、チタン及び金のうち少なくとも何れか一つを含む生体親和性材料から構成されていることが好ましい。なお、プロテオグリカンは、タンパク質と糖鎖 (グリコサミノグリカン) が共有結合した複合糖質の一種である。また、細胞外基質は、熱可塑性高分子等の高分子体で作製された数平均直径が $1 \text{ nm} \sim 1000 \text{ nm}$ のナノファイバーからなるスponジ状の三次元構造体も使用できる。そのような三次元構造体の空隙率は $80\% \sim 99.99\%$ とすることが好ましい。
- [0049] 細胞外基質として使用されるコラーゲンは、I型コラーゲンとIII型コラーゲンとの混合であるI型・III型混合コラーゲンを用いることが好ましい。I型コラーゲンとは、基本的コラーゲンであり、線維性コラーゲンである。III型コラーゲンは、コラーゲン線維とは別の、細網線維と呼ばれる細い網目状の構造を形成し、細胞等の足場を作る。
- [0050] 上述の混合コラーゲンにおける、III型コラーゲンの割合は 10 重量 % 以上 50 重量 % 以下とすることが好ましい。III型コラーゲンの割合が 50 重量 % よりも多くなると、混合コラーゲンが固化できないおそれがあるからである。一方、III型コラーゲンの割合が 10 重量 % よりも少なくなると、I型コラ

ーゲンの割合が多くなり、後述するような血管新生が起こるのではなく、象牙質が再生される可能性があるからである。

[0051] 次に、図2を用いて、本実施形態に係る非抜歯根管充填材200の製造方法を説明する。図2は、非抜歯根管充填材200の製造方法を説明する説明図である。

[0052] 非抜歯根管充填材200は、細胞外基質210の根尖側に歯髄幹細胞220を付着させて形成される。歯髄幹細胞220は非抜歯根管充填材200の根尖部の1/4～2/3に付着されているのが望ましく、より望ましくは根尖部の1/3である。根管充填材の製造方法の一具体例としては、まず、トータルで20〃リットルとし、ピペットマンのチップ等に10〃リットル～13パリットルのI型・III型混合コラーゲンを吸い込み、次に、歯髄幹細胞を混合させたI型・III型混合コラーゲン（例えばコラーゲンXYZ（新田ゼラチン））を7〃リットル～10〃リットル吸い込む。ピペットマンのチップ等に吸い込む際には気泡が発生しないように吸引速度は緩やかにすることが好ましい。根管充填材内部に気泡が発生すると、発生した気泡が細胞の遊走を妨げて歯組織再生の促進が損なわれるからである。ピペットマンのチップの内径は細いものが好ましく、例えばチップの下内径が0.5～0.7mmのものが使用でき、例えばQSP社のH-010-96RSマイクロキヤピラリーチップを使用できる。非抜歯根管充填材の形状は、特に限定されるものではなく、例えば円錐、円錐台、円柱等である。

[0053] 次に、図3A～図3Fを用いて、非抜歯根管充填材200を使用する歯組織再生方法について説明する。

[0054] 本実施形態に係る歯髄組織再生方法は、図3Aに示すように、例えば歯髄炎が発生している対象となる歯100について、非抜歯にて歯組織再生を行う。対象となる歯とは、う蝕、歯髄炎等により、細菌感染が冠部歯髄又は根部歯髄まで波及している歯をいう。

[0055] 対象となる歯100について、図3Bに示すように、抜髄又は感染根管の根管拡大清掃が行われる。抜髄とは、歯牙の内部に存在する歯髄を取り去る

行為である。また、感染根管とは、細菌が歯髄に到達後、根管壁の象牙質に及んでいる場合の根管をいい、根管拡大清掃後とは、感染根管における細菌を除去した後をいう。

[0056] 抜髓後は、対象となる歯の根管を拡大することで、根尖部の根管の大きさを所定の太さにすることが望ましい。なぜならば、後述するように、抜髓あるいは感染根管治療した根管内に非抜歯根管充填材200を充填する際に、根管を拡大しておくほうが非抜歯根管充填材200を充填しやすいからであり、また根尖歯周組織から血管及び神経が進入しやすいからである。ここで、根尖とは、対象となる歯の歯槽骨に結合される端部（歯根の先端部分）をいう。

[0057] 例えば、図3Bにおいて、根尖部の根管の太さdは、根管の直径において0.7mm以上1.5mm以下とすることが望ましい。根管の太さdが0.7mmよりも小さると、血管及び神経が根尖歯周組織から進入しにくく、また非抜歯根管充填材200の充填が難しいおそれがあるからであり、一方、根管の太さが1.5mmよりも大きいと、対象となる歯に対して必要以上の負担を与えて割れやすくなるおそれがあるからである。

[0058] 次に、図3Cに示されるように、根管の根尖側にピンセット等により非抜歯根管充填材200を充填する。非抜歯根管充填材200は、生物学的材質を含有するので、生物学的根管充填材とすることもできる。非抜歯根管充填材200は、根管内の歯髄が存在した場所である歯髄相当部位に充填することが望ましい。なお、細胞外基質210がゲル状の場合はピンセット等でつまむことができないので、ピペットマン、注射等により注入することになる。

[0059] 根管の根尖側に非抜歯根管充填材200を注入した後は、図3Dに示されるように、非抜歯根管充填材200の上部にゼラチン610を注入し、レジン620により蓋をする。

[0060] これにより、根管内の歯組織が再生される。再生される歯組織は、図3Eに示されるように、例えば根管内の歯髄固有組織、血管400、神経等であ

る。また、BMPs等の形態形成因子を用いることにより、再生される歯組織としては象牙質がある。更に、感染根管に対して非抜歯根管充填材200を充填する場合は、再生される歯組織として歯根膜（歯槽骨に歯を植立する歯周組織）やセメント質等の歯周組織がある。

[0061] その後は、レジン620を一度除去して、図3Fに示すように、BMPs等の形態形成因子630又は象牙質形成因子を歯冠部歯髄に塗布し、レジン620により蓋をする。形態形成因子630又は象牙質形成因子を歯冠部歯髄に塗布したことにより、図3Gに示されるように象牙質500も再生される。

[0062] 更に、本実施形態に係る非抜歯根管充填材200を用いる歯組織再生では、再生組織に内部吸収及び外部吸収が見られず、且つ、破歯細胞も見られずに、象牙質壁に象牙芽細胞が滑らかに並んでいる。また、出血による血餅が多量に存在すると歯髄組織再生の障害になると考えられるところ、本実施形態に係る発明は非抜歯であるため、血餅の発生を低く抑えられ、効率的に歯組織再生を促進させることができる。また、本実施形態に係る発明は非抜歯であるので、根管拡大後の出血や症状が消失するまで根管貼薬して根管充填を待つことができ、実際の臨床治療に近接させることができる。

[0063] なお、上述したように、対象となる歯100は、う蝕、歯髄炎等により、細菌感染が冠部歯髄又は根部歯髄まで波及している歯であつたが、これに限らず、対象となる歯100には神経機能が低下して咬合感覚が弱くなっている歯も含まれる。係る場合は、抜髄後に、非抜歯根管充填材200を充填することにより、歯髄を再生させることで咬合感覚を向上させることができる。また、図3Hに示すように、対象となる歯100には、細菌感染が根尖歯周組織まで波及している歯（細菌が歯髄に到達後、根管壁の象牙質及び根尖歯周組織に及んでいる歯）も含まれる。このような歯は根尖性歯周炎110を伴うことが多い。感染根管の根管拡大清掃後に、非抜歯根管充填材200が注入される。

[0064] 《第2実施形態》

図4 A 及び図4 B は、本発明の第2実施形態に係る非抜歯根管充填材200 の説明図である。図4 A に示すように、非抜歯根管充填材200 は、歯髄幹細胞220 を根管の根尖側に付着させるとともに、根管の歯冠側（例えば根管の上部1／2～2／3）に細胞遊走因子、細胞増殖因子、神経栄養因子及び血管新生因子のうち少なくとも何れか一つを含む遊走因子230 を付着させている。

[0065] 歯髄幹細胞220 を根管の根尖側に付着させ、根管の歯冠側に遊走因子230 を付着させる理由は、歯髄幹細胞220 を根管の歯冠側にまで付着させても組織からの栄養が供給されずに壊死する可能性があるからであり、また、根管の根尖側に付着している歯髄幹細胞220 が根管の歯冠側に付着している遊走因子に引っぱられて歯組織再生が促進されやすいからである。なお、図4 B に示すように、非抜歯根管充填材200 の根管の歯冠側に細胞外基質210 を残しておくことも可能である。

[0066] 細胞遊走因子とは、それが受容体に結合することによって細胞の遊走に関わる信号伝達系が活性化する分子を意味する。また、細胞増殖因子とは、それが受容体に結合することによって細胞の増殖に関わる信号伝達系が活性化する分子を意味する。そして、神経栄養因子とは、それが受容体に結合することによって細胞の生存に関わる信号伝達系が活性化する分子を意味する。血管新生因子とは、それが受容体に結合することによって血管内皮細胞の増殖・遊走・抗アポトーシスに関わる信号伝達系が活性化する分子を意味する。

[0067] 細胞遊走因子は、SDF_1、VEGF、G-CSF、SCF、MMP3、Silt 及びGM-CSF のうち少なくとも何れか一つを用いることが好みしい。特に、MMP3 は、細胞遊走能が高く好適に使用することができる。

[0068] 細胞増殖因子は、IGF、bFGF 及びPDGF の少なくとも何れか一つを用いることが好みしい。

[0069] 神経栄養因子は、GDNF、BDNF、NGF、Neuropeptide Y 及びNeuro

troph in 3のうち少なくとも何れか一つを用いることが好ましい。

[0070] 血管新生因子は、E-selectin、VGAM1、EGSGR及びSLG6A6のうち少なくとも何れか一つを用いることが好ましい。

[0071] 遊走因子を付着させた細胞外基質における、遊走因子の含有率は、0.1 ng/ μ l以上500 ng/ μ l以下とすることが好ましい。遊走因子の含有率が0.1 ng/ μ lよりも少ないと、遊走の程度が少なくなる可能性がありうるからである。一方、遊走因子の含有率が500 ng/ μ lよりも多いと、対象となる歯100に対して予期せぬ副作用が生じる可能性があり得るからである。

[0072] 次に、図5を用いて、本実施形態に係る非抜歯根管充填材200の製造方法を説明する。図5は、根管の歯冠側に遊走因子230を付着させる非抜歯根管充填材200の製造方法を説明する説明図である。

[0073] 実施形態2に係る非抜歯根管充填材200の製造方法の一具体例としては、まず、トータルで20"リットルとし、ピペットマンのチップ等に遊走因子を混合させたI型・III型混合コラーゲン(I型コラーゲンとIII型コラーゲンとの混合割合は1:1)を10リリットル～13リリットル吸い込む。次に、歯髄幹細胞を混合させたI型・III型混合コラーゲンを7パリットル～10パリットル吸い込む。実施形態2においても、ピペットマンのチップ等に吸い込む際には気泡が発生しないように吸引速度は緩やかにすることが好ましい。また、ピペットマンのチップの内径は細いものが好ましい。このようにして、図4Aに示す根管充填材200が製造される。

[0074] 実施形態2に係る非抜歯根管充填材200の使用形態は、実施形態1と同様に、抜髄後又は感染根管の根管拡大清掃後の非抜歯の根管の根尖側に充填される。

[0075] 本実施形態に係る非抜歯根管充填材200によれば、遊走因子を有してい るため更に効率的に、歯組織再生を行うことができ、再生組織には、内部吸 収は無く、破歯細胞も見られずに、象牙質壁に象牙芽細胞が滑らかに並んで いる。

[0076] 《第3実施形態》

上述の第1実施形態では、歯髄幹細胞220が非抜歯根管充填材200の根管の根尖側に付着されて非抜歯根管充填材200は構成されていた。しかし、そのような実施形態に限定されることはなく、歯髄幹細胞220は、非抜歯根管充填材200の全体に均一に混合させていても良い。このような非抜歯根管充填材200も、歯根完成歯に対して、内部吸収や外部吸収を発生させず、破歯細胞が見られず、象牙質壁に象牙芽細胞が滑らかに並ぶ歯組織再生を図ることができる。

[0077] このような非抜歯根管充填材200は、例えば、歯髄幹細胞と、I型・III型混合コラーゲン（例えばコラーゲンXYZ（新田ゼラチン））とを気泡を発生させないように均一に混合させることにより製造される。

[0078] また、上述の第2実施形態では、歯髄幹細胞220を根管の根尖側に付着させるとともに、根管の歯冠側に遊走因子230を付着させて、非抜歯根管充填材200は構成されていた。しかし、そのような実施形態に限定されることはなく、歯髄幹細胞220及び遊走因子230は共に非抜歯根管充填材200の全体に均一に混合させていても良い。このような非抜歯根管充填材200も、歯根完成歯に対して、内部吸収や外部吸収を発生させず、破歯細胞が見られず、象牙質壁に象牙芽細胞が滑らかに並ぶ歯組織再生を図ることができる。

[0079] この非抜歯根管充填材200は、例えば、歯髄幹細胞と、遊走因子と、I型・III型混合コラーゲン（例えばコラーゲンXYZ（新田ゼラチン））とを気泡を発生させないように均一に混合させることにより製造される。

実施例

[0080] 《実施例1》

〈細胞分取と特徴化〉

ヒト歯髄を摘出後、37°Cで1時間半、コラーゲナーゼで酵素消化して歯髄細胞を分離した後、2%血清を含むD MEM中に 1×10^6 cells/mlで細胞を分散させ、CXCR4抗体を用いて4°Cで30分ラベル後、フロ

—サイトメトリーを行った。ヒト歯髄由来の CXCR4 陽性細胞は全体の 20 % を占めた。

[0081] 表 1 にフローサイトメトリーの結果を示す。CD29 及び CD44 については、CXCR4 陽性細胞は、CD105 陽性細胞と同様に 90 % 以上であった。また、CD105 については、CD105 陽性細胞は 90.0 % であったが、CXCR4 陽性細胞は 1.7 % であった。CD146 については、CXCR4 陽性細胞は CD105 陽性細胞と同様に低い値であった。また、より未分化な幹細胞のマーカーの CD150 については、CXCR4 陽性細胞は、CD105 陽性細胞に比べてやや高い値を示した。

[0082] [表 1]

	イヌ歯髄 CXCR4 陽性細胞	イヌ歯髄 CD105 陽性細胞	イヌトータル 歯髄細胞
CD29	99.4%	90.6%	95.6%
CD34	61.6%	45.5%	47.1%
CD44	99.8%	96.2%	99.9%
CD90	0.5%	0.6%	1.6%
CD105	1.7%	90.0%	4.6%
CD146	0.5%	0.8%	0.9%
CD150	3.6%	2.3%	0.9%
MHC class I	82.8%	36.0%	73.8%

[0083] Real-time RT-PGRにて、歯髄由来 CXCR4 陽性細胞と歯髄由来 CD105 陽性細胞を表 2 及び表 3 に示すプライマーを用いて RNA 発現を比較すると、前血管誘導因子 VEGF_A はほぼ同様の発現量を示し、サイトカイン GM-CSF は CXCR4 陽性細胞が 2.5 倍高く、神経栄養因子 NGF は CD105 陽性細胞の方が 2 倍高く、Neuropeptide Y, Neurotrophin 3 及び BDNF は CXCR4 陽性細胞がやや高く、幹細胞マーカー SOX2 は CXCR4 陽性細胞の方が高く、Stat3 及び Rex1 発現はほぼ同等であった。

[0084]

Gene	5'→DNA Sequence→3'	Product	Accession number
CXC ₄	Foward	CTGGCCAAACGGTACTC	XM_84672
	Reverse	TCAACAGGAGGGCAGGTAC	NM_001048026
Sox ₂	Foward	AGCTAGTCCTCAAAGCGACA	XM_545216
	Reverse	CCACGTTGCAACGTCTTA	
Stat ₃	Foward	GTTGTAACGGAGAGCACCA	
	Reverse	TTCGTCTGGTCACCGAACGA	
Bmi ₁	Foward	CACTCGGTCACTCTCC	
	Reverse	CCAGATGAGATTGCTGACGA	XM_544225
Rex ₁	Foward	TGGCACGCTCGTCTCC	
	Reverse	CTCGGATCTCCAGATCAC	XM_533958
MM ₃	Foward	CCCTCTGATTCCCAATGAA	
	Reverse	GGATGGCCAAATAATGAGGA	AY183143
VEGF-A	Foward	CTACCTCCAACCACGCCAAGT	
	Reverse	ACGCCAGGATGGCTTGAGAGT	NM_001003175
GM-CSF	Foward	GCAAGACCTGCTTCTGG	S49738
	Reverse	CCCTCAGGCTCAAAACCTTC	
SDF-1	Foward	GCCTAGAACGCCAACAGTC	
	Reverse	CTTGTTCAGAGCTTCCAGT	DQ182700
BDNF	Foward	GTTGGCCGACACATTGAAAC	
	Reverse	CTCTACATGCCAGTTCAG	NM_001002975
Neuropeptide Y	Foward	ATCACCAAGGCCAGGTATGG	
	Reverse	TGGGAGGATAGGCCAGATT	XM_532492
Neurotrophin 3	Foward	CCCCCTCCCTGTTACCTCAT	
	Reverse	CGTAGGTTGGAGCGTTTG	XM_532492
E-selectin	Foward	GTTATGCGCTTGCATGTC	
	Reverse	CAGGAGCCAGAGGAAGATTG	1L23087
VCAM-1	Foward	GGGATTAACCAAGGCTGAAAT	
	Reverse	TGCTCCCGTCCTGCTT	CFU32086
Rhomboatin-2	Foward	GGCCGCCTCTACAGCTG	
	Reverse	TATCTGTCCGCCACACAGAA	XM_846184

[表2]

[図 3]

Gene		5'←DNA Sequence→3'	product size	Accession number
<i>ECSCR</i>	Forward	CCCCAGGTGTTATCAGCTTC	169bp	XM_549577
	Reverse	TCTTCTCTCCGGTGGCTGT		
<i>SLC6A6</i>	Forward	CACGTCCCTGGTCGATCTTT	188bp	NM_001003311
	Reverse	AGAACATGCAACCCACAAAAGG		
<i>ap2</i>	Forward	CGGATGACAGAAAAGTCAAG	194bp	XM_543759
	Reverse	TTCAGCTTGATGTCCCTTGG		
<i>Neurofilament</i>	Forward	GCTGGACCGACTATCAGAGG	196bp	NM_001003352
	Reverse	CTGGTAGGATGCGATGTCAAG		
<i>Neuromodulin</i>	Forward	ACAAGATGGCATCAAACCAAG	181bp	XM_535747
	Reverse	CTTCTTCTCCAGGCCATCAG		
<i>Enamelysin</i>	Forward	TATTCAACCCTTGCTGCTCAC	151bp	XM_849546
	Reverse	TACAATGCCTGGATCCCTTT		
<i>Osteocalcin</i>	Forward	GGCAGCGAGGTGGTGAGGAG	180bp	AF205942
	Reverse	CTAGACCGGGCCATAGAAAG		
<i>DSPP</i>	Forward	GTCCTAGTGGGAATGGAGCA	190bp	XM_544971
	Reverse	TCTTCAGGGCCATCATCTTC		
<i>Axin2</i>	Forward	GAAAGGGTCAGGTACACAAA	190bp	XM_548025
	Reverse	CATTGTCCCTCTCCAGGAA		
<i>Periostin</i>	Forward	AAACCATTGGAGGCAAACAG	209bp	XM_534490
	Reverse	TGCAGCTTCAAGTAGGCTGA		
<i>PLAP-1</i>	Forward	TCCCAGTCAGGATTACAGGAG	210bp	XM_848228
	Reverse	GAACGCTCATTCTGCTCACA		
<i>Tenascin-C</i>	Forward	TGGCTGTCTGGACACAGAG	181bp	XM_538811
	Reverse	GAECTCCAGAGTTGGGTCTG		
<i>Syndecan 3</i>	Forward	TCATGCAGGACAGCTTCAAC	186bp	XM_544449
	Reverse	AGGGCTGGAATCTAGGGAAA		
<i>collagenα1(I)</i>	Forward	CTTCCTGGAATGAAGGGACA	205bp	NM_001003090
	Reverse	CAGTAGCACCATCGTTCCA		
<i>collagenα1(III)</i>	Forward	AGGGCTCTGCTGGAAAGAAT	199bp	XM_857956
	Reverse	GGAACCTCCAGGTGAACCAGA		
<i>β-actin</i>	Forward	AAGTACCCCATTGAGCACGG	257bp	Z70044
	Reverse	ATCACGATGCCAGTGGTGC		

[0086] <イヌ抜髓後の歯髄再生>

次に、CD105陽性細胞及びCXCR4陽性細胞を用いたイヌ抜髓後の歯髄再生を示す。

[0087] イヌ歯髄組織よりCD105陽性細胞及びCXCR4陽性細胞を分取した。トータルで60mlリットルとし、ピペットマンのチップSDF-1(200ng)を混合させたコラーゲンXYZ(新田ゼラチンI型・II型混合コラーゲン)を40パリットル吸い込み、次に、 1×10^6 個のCD105陽性

細胞を混合させたコラーゲンXYZ（新田ゼラチンI型・III型混合コラーゲン）を20パリットル吸い込むことにより、抜歯根管への挿入用の根管充填材を作成した。イヌ上顎前歯を抜去後、培地内で歯髄を除去して#70まで拡大し、根尖部の根管の太さを0.7mm以上にした。抜去後30分以内に上記の根管充填材を、拡大した根管内の歯髄が存在した場所である歯髄相当部位に充填した。30分以内にイヌの抜歯窩に再移植し、上部は燐酸セメント及び化学重合レジンで封鎖した。14日後、抜歯し、パラフィン標本を作製した。この結果を図6Aに示す。また、根管内象牙質壁の高倍像図を図6Bに示す。更に、歯根外側の象牙質・セメント質壁の高倍像図6Cに示す。図6A、図6B及び図6CはH・E染色である。

[0088] 次に、トータルで20mlリットルとし、ピペットマンのチップSDF-1(200ng)を混合させたコラーゲンXYZ（新田ゼラチンI型・III型混合コラーゲン）を13パリットル吸い込み、次に、1×10⁶個の○O105陽性細胞を混合させたコラーゲンXYZ（新田ゼラチンI型・III型混合コラーゲン）を7パリットル吸い込むことにより、非抜歯根管充填材200を作成した。この非抜歯根管充填材200は、根管の歯冠部2/3にSDF-1が付着されており、根管の根尖側1/3にCD105陽性細胞が付着されていた。イヌ上顎前歯を抜去しないで、そのまま歯髄を除去して#70まで拡大し、根尖部の根管の太さを0.7mm以上にした。抜去後30分以内に上記の非抜歯根管充填材200を、拡大した根管内の歯髄が存在した場所である歯髄相当部位に充填した。30分以内に上部は燐酸セメント及び化学重合レジンで封鎖した。14日後、抜歯し、パラフィン標本を作製した。この結果を図7Aに示す。また、根管内象牙質壁の高倍像図を図7Bに示す。図7A及び図7BはH・E染色である。

[0089] 次に、トータルで20mlリットルとし、ピペットマンのチップSDF-1(200ng)を混合させたコラーゲンXYZ（新田ゼラチンI型・III型混合コラーゲン）を13パリットル吸い込み、次に、1×10⁶個の○父○R4陽性細胞を混合させたコラーゲンXYZ（新田ゼラチンI型・III型混合

コラーゲン)を7パリットル吸い込むことにより、非抜歯根管充填材200を作成した。この非抜歯根管充填材200は、根管の歯冠部2/3にSDF-1が付着されており、根管の根尖側1/3にCXCR4陽性細胞が付着されていた。イヌ上顎前歯を抜去しないで、そのまま歯髄を除去して#70まで拡大し、根尖部の根管の太さを0.7mm以上にした。抜去後30分以内に上記の非抜歯根管充填材200を、拡大した根管内の歯髄が存在した場所である歯髄相当部位に充填した。30分以内に上部は燐酸セメント及び化学重合レジンで封鎖した。14日後、抜歯し、パラフィン標本を作製した。14日後、抜歯し、パラフィン標本を作製した。この結果を図8Aに示す。また、根管内象牙質壁の高倍像図を図8Bに示す。図8A及び図8BはH・E染色である。

[0090] 新生歯髄組織では、抜歯した場合(図6A・図6B・図6C)は、抜歯しない場合(図7A・図7B及び図8A・図8B)と比較して、血餅が残存しやや炎症がみられた。特に、図6Aには、再生された歯髄組織内の図中上部に血塊が見られ、更に再生された歯髄組織内の全般に小径の血塊が多数点在している状態が見られた。また、抜歯した場合の根管内象牙質壁には破歯細胞がみられ、内部吸収が見られた(図6B)。また、歯根外側の象牙質-セメント質に外部吸収が見られた(図6C)。内部吸収及び外部吸収は、いずれも軽度で吸収が終息している場合は生活に支障が出ないものの、吸収が高度に進行した場合は、歯の動搖、脱落等の危険性が高まり、また虫歯や歯周病に対するリスクも高まる。

[0091] 一方、抜歯しない場合の根管内象牙質壁には破歯細胞が見られず、内部吸収及び外部吸収も見られず、更に、象牙質壁に象牙芽細胞が滑らかに並んでいた(図7B、図8B)。また、歯髄幹細胞として、CD105陽性細胞を用いる場合と、CXCR4陽性細胞を用いる場合とでは、再生歯髄の新生毛細血管、神経及び固有歯髄組織の程度は両者に差は見られなかった。

[0092] 以上の結果より、抜歯した根管に充填する場合より、非抜歯の根管に充填する場合の方が、明らかに歯髄再生に有利であることが判明した。また、歯

髓由来の CXCR4 陽性細胞は、CD105 陽性細胞と同様に、歯髄再生に有効であることが判明した。

[0093] 《実施例 2》

次に、実施例 2 では、非抜歯根管充填材の歯組織再生能をより詳細に検証する。

〈フローサイトメトリーによる細胞分取〉

歯髄細胞を上顎犬歯より分離した。初代脂肪細胞は同一個体のイヌの脂肪組織よりコントロールとして分離した。細胞をマウス IgG1 陰性コントロール (W3/25) (AbD Serotec Ltd., Oxford, UK) として免疫染色した。細胞は、mouse IgG1 negative control (Phycoerythrin, PE) (MCA928PE) (AbD Serotec) 及び mouse anti-human CD105 (PE) (43A3) (BioLegend, San Diego, CA, USA) で 4 °C、90 分免疫染色した。2 μg/ml propidium iodide 含有 HEPES buffer (Sigma) に、再溶解し、JSAN (Bay Bioscience, Kobe, Japan) にて分取した。歯髄及び脂肪由来の CD105 陽性細胞、CD105 陰性細胞及び、分取していないトータル歯髄細胞は 35% collagen type I コートデイッシュ (Asahi Technoglass Corp., Funabashi, JAPAN) に播種し、10 ng/ml IGF (Cambrex Bio Science)、5 ng/ml EGF (Cambrex Bio Science) 及び 10% fetal bovine serum (Invitrogen Corporation, Carlsbad, CA, USA) を添加した EBM 2 (Gambrex Bio Science, Walkersville, Maryland, USA) 中で培養し、細胞の形質を維持した。培地は 4 ~ 5 日に一度交換し、60 ~ 70% コンフレントに達した後、37 °C、10 分、0.02% EDTA で反応させ、細胞を剥離し、1 : 4 希釈にて継代した。

[0094] 歯髄 CD105 陽性細胞は、更に三代目にて特徴化し、脂肪 CD105 陽性細胞及び未分取のトータル歯髄細胞と比較した。mouse IgG1 negative control (AbD Serotec Ltd.) 及び mouse IgG1 negative control (fluorescein isothiocyanate, FITC) (MCA928F) (AbD Serotec), mouse IgG1 negative control (Phycoerythrin, PE-Cy5) (MCA928C) (AbD Serotec), mouse IgG1 negative control (Alloexa 647) (MRC OX-34) (AbDSerotec), 及び GD24 (Alloexa Fluor

647) (ML5) (BioLegend) , CD29 (PE-Cy5) (MEM-1 01A) (eBioscience) , CD31 (FITC) (Qbend 1 O) (Dako) , CD33 (FITC) (HIM3-4) (BD Bioscience) , CD34 (Allophycocyanin, APC) (1H6) (R&D Systems, Inc., Minneapolis, MN, USA) , CD44 (Phycoerythrin-1n-Gy7, PE-Cy7) (IM7) (eBioscience) , CD73 (APC) (AD2) (BioLegend) , CD90 (FITC) (YKI X337. 217) (AbD Serotec) , CD146 (FITC) (sc-18837) (Santa Cruz Biotech, Santa Cruz, CA, USA) , CD150 (FITC) (A12) (AbD Serotec) , MHC class I (R-PE) (3F10) (Ancell Corporation, Bayport, MN, USA) , MHC class II (APC) (TDR31.1) (Ancell) , 及び GXGR4 (FITC) (12G5) (R&D) に対する抗体でそれぞれ染色した。

[0095] <幹細胞マーカー、血管新生、神経栄養因子のReal time RT-PGRによる発現分析>

細胞画分の形質を更に特徴化するために、Trizol (Invitrogen) を用いて三代目の歯髄及び脂肪CD105陽性細胞及びトータル歯髄細胞からトータルRNAを分離した。それぞれの実験において細胞数は 5×10^4 個に標準化した。First-strand cDNA合成はReverTra Ace-Ⅱ (Toyobo, Tokyo, Japan) を用いてトータルRNAから合成し、Light Cycler-Fast Start DNAmaster SYBR Green I (Roche Diagnostics, Pleasanton, GA) を用いてLight Cycler (Roche Diagnostics) にて95°Cで10秒, 62°Cで15秒, 72°Cで8秒のプログラムで、上記表2及び表3に示す幹細胞マーカーのイヌCXCR4, Sox2, Stat3, Bmi1及びRex1のReal time RT-PGRを行った。oligonucleotideプライマーは、公表されているイヌcDNAシークエンスを用いて作成した。イヌシークエンスが登録されていない場合、ヒトシークエンスを用いた。血管新生因子及び神経栄養因子のmRNA発現を検討するため、イヌmatrix metalloproteinase (MMP)-3, VEGF-A, granulocyte-monocyte colony-stimulating factor (GM-CSF), SDF-1, NGF, BDNF, Neurotrophin-3, E-selectin, VCAM-1, rhombotin-2, ECSCR 及びSLC6A6のreal time RT-PGRを行った。RT-PGR産物は登録されたcDNAシークエンスを用いて確定した。三代目歯髄CD105陽性細胞及び脂肪C

D 105 陽性細胞は、 β -actinで標準化してトータル歯髄細胞と比較した。

[0096] 〈増殖及び遊走分析〉

stroma I cell derived factor_1 (SDF-1) (Acris, Herford, Germany)

に対する歯髄 CD 105 陽性細胞の増殖能を、0.2% bovine serum albumin (Sigma) 及び SDF-1 (50 ng/ml) 添加 EBM2 中で 96 well plate に 10³ 個播種し、トータル歯髄細胞及び脂肪 CD 105 陽性細胞と、四代目において比較した。10% Tetra-co Lorone (登録商標、Seikagaku Kogyo, Co., Tokyo, JAPAN) を 96 well plate に添加し、細胞数を吸光度 450 nm にて吸光度計を用いて 2, 12, 24 及び 36 時間後に計測した。細胞を入れてないサンプルを negative control とした。

[0097] 歯髄 CD 105 陽性細胞の SDF-1 に対する遊走能を、水平化学走化性分析法にてトータル歯髄細胞及び脂肪 CD 105 陽性細胞と比較した。TAXI Scan-FL (Effector Cell Institute, Tokyo, JAPAN) を用いて real time 水平化学走化性分析を行った。TAXI Scan-FL は 6 μm の孔のあいた silicon 及びガラスプレートの間に、細胞の大きさに最適化したチャンネルを形成し、チャンネル内の一端に細胞 (10⁵ 個/ml を 1 パル) を入れ、もう一端に 10 ng/ パルの SDF-1 を一定濃度勾配に形成させるように投入して、遊走する細胞を顕微鏡下で 6 時間撮影した。

[0098] 〈歯髄及び脂肪由来 CD 105 陽性細胞の分取及び特徴化〉

CD 105 抗体を用いてイヌ永久歯歯髄組織からフローサイトメトリーにより分離した歯髄由来の CD 105 陽性細胞及び同一個体の脂肪組織由来の CD 105 陽性細胞は、図 9 A 及び図 9 B に示すように、それぞれトータル細胞の 6% 及び 5.8% であった。また、図 9 C、図 9 D、図 9 E 及び図 9 F に示すように、歯髄及び脂肪 CD 105 陽性細胞は、ともに星状で長い突起を有していた。図示しないが、歯髄 CD 105 隆性細胞は、不規則な形で短い突起を有していた。IGF1, EGF 及び 10% ウシ胎児血清を EBM2 に添加すると、CD 105 陽性細胞の形質が維持され、6 代目でも 98% 以上 CD 105 が陽性であった。35 mm collagen type I コートデイッシュに CD 105

陽性細胞を一個播種すると、10日でコロニーを形成し、この細胞のコロニー形成能を示した。歯髄、脂肪CD105陽性細胞及び歯髄CD105陰性細胞の細胞付着及び増殖効率はそれぞれ8%，3.7%，1%であった。三代目で限界希釈法により、コロニー形成ユニット(GFU)は、歯髄CD105陽性細胞では、80%であり、トータル歯髄細胞では30%、脂肪CD105陽性細胞では50%であった。

[0099] 歯髄CD105陽性細胞の特徴化を進めるために細胞表面抗原マーカーを用いて、フローサイドメトリーを行い、歯髄CD105陽性細胞を脂肪CD105陽性細胞及びトータル歯髄細胞と比較した。歯髄CD105陽性細胞、脂肪CD105陽性細胞及びトータル歯髄細胞は三代目でCD29、CD44、CD90及びCD105が陽性であり、CD31が陰性であった。下記の表4に示すように、歯髄CD105陽性細胞は、脂肪CD105陽性細胞及びトータル歯髄細胞に比べてCD73、CD150及びCXCR4を強く発現していることは特筆すべきことである。

[0100] [表4]

	歯髄 CD105陽性 細胞	脂肪 CD105陽性 細胞	トータル 歯髄細胞
CD24	1.8%	1.7%	0.3%
CD29	95.9%	90.5%	99.2%
CD31	0%	0%	0%
CD33	3.7%	0%	0.2%
CD34	45.5%	0.1%	47.1%
CD44	96.2%	92.3%	99.9%
CD73	97.2%	0.8%	22.3%
CD90	98.1%	95.6%	97.5%
CD105	98.5%	74.0%	4.6%
CD146	0.8%	0.2%	0.9%
CD150	2.3%	0.2%	0.9%
MHC class I	36.0%	80.0%	73.8%
MHC class II	0.4%	0%	0.4%
CXCR4	12.2%	5.9%	5.3%

[0101] 齒髄 C D 1 0 5 陽性細胞においては、トータル歯髄細胞に比べ、C X C R 4, S o x 2 及び B m i 1 m R N A 等の幹細胞マーカーを 16.8, 64 及び 3.5 倍高く発現しており、歯髄 C D 1 0 5 陽性細胞の幹細胞としての性質が示唆された。C X C R 4, S o x 2 及び B m i 1 m R N A は歯髄 C D 1 0 5 陽性細胞において脂肪 C D 1 0 5 陽性細胞に比べて高く発現していた。表 5 に示すように、V E G F—A, G M—C S F, nerve growth factor (N G F), brain-derived neurotrophic factor (B D N F), neuropeptide Y, neurotrophin 3, E-selectin 及び V C A M—1 等の血管新生因子あるいは神経栄養因子は、脂肪 C D 1 0 5 陽性細胞に比べ歯髄 C D 1 0 5 陽性細胞において高く発現していた。

[0102] [表5]

	歯髄 C D 1 0 5 陽性細胞 /トータル歯髄細胞	脂肪 C D 1 0 5 陽性細胞 /トータル歯髄細胞
CXCR4	16.8	7.0
Sox2	64.0	16.0
Stat3	0.8	0.1
Bmi1	3.5	0.1
Rex1	0.9	1.9
MMP3	26.1	11.6
VEGF-A	3.6	1.6
GM-CSF	5.8	1.9
SDF-1	1.7	1.8
NGF	4.1	0.5
BDNF	16.0	0.5
Neuropeptide Y	5.2	0.1
Neurotrophin 3	5.3	0.2
E-selectin	18.1	1.1
VCAM-1	54.6	18.7
Rhombotin-2	23.8	1.7
ECSCR	28.5	0.8
SLC6A6	12.7	1.5

[0103] <in vitro における多分化能>

三代目から五代目において歯髄 CD105陽性細胞の脂肪、血管、神経、及び象牙質／骨への分化誘導を行い、脂肪 CD105陽性細胞及び未分取の歯髄細胞と比較した。

[01 04] 図10A及び図10Dに示すように、歯髄幹細胞は脂肪細胞への分化能を示した。また、図10Eに示すように、歯髄幹細胞は血管内皮細胞への分化能を示した。また、図10H、図10J及び図10Kに示すように、歯髄幹細胞は神経細胞への分化能を示した。また、図10L及び図10Oに示すように、歯髄幹細胞は、象牙芽細胞あるいは骨芽細胞系譜への分化能を示した。

[01 05] しかしながら、図10L及び図10Mに示すように、歯髄 CD105陽性細胞に比べてトータル歯髄細胞においては石灰化基質が多く認められた。また、図10C、図10D、図10N、図10O及び図10Gに示すように、脂肪 CD105陽性細胞は脂肪誘導能及び骨誘導能はあるが、血管誘導能あるいは神経誘導能は見られなかった。図10Pに示すように、SDF-1による増殖活性は、歯髄 CD105陽性細胞においてトータル歯髄細胞及び脂肪 CD105陽性細胞に比べて高かった。なお、図10Pにおいて、データは4サンプルで平均値±SDで表しており(*P<0.01)、実験は3回繰り返し行つた典型例を示したものである。TAXI Scan-FLにおいて示されるように、SDF-1による遊走活性は歯髄 CD105陽性細胞においてトータル歯髄細胞及び脂肪 CD105陽性細胞よりも高かった。

[01 06] 〈幹細胞ノ前駆細胞の抜髓後根管内自家移植〉

イヌ (Narc, Chiba, Japan) 永久歯完全根尖完成歯を全部歯髄除去し、細胞画分を移植して歯髄を再生させる実験的モデルを確立した。sodium pentobarbital (Scherzing-Pough, Germany) で全身麻酔後、上顎第二切歯及び下顎第三切歯の完全歯髄除去を行い、根尖部を#70K-file (MANI, Tochigi, Japan) を用いて0.7mmに拡大した。細胞外基質としてcollagen XYZを用い、根尖側に歯髄幹細胞を付着させると共に歯冠側にSDF-1を付着させた根管充填材を用いた。即ち、 1×10^6 個の、三代目から四代目の歯髄 CD105

陽性細胞、脂肪 C D 1 0 5 陽性細胞あるいはトータル歯髄細胞をcollagen XYZ (新田ゼラチン, Osaka, Japan) とともにDilラベリング後、根管内の下部に自家移植した。根管上部は更にcollagenXYZとともに最終濃度 1 5 ng/リの 3 0 F - 1 を移植した。窩洞はリン酸亜鉛セメント (EeliteGement, GC, Tokyo, Japan) 及びボンディング材 (Glearf ill Mega Bond, Kuraray) で処理した後、コンポジットレジン (Glearf ill FII, Kurashiki, Japan) で修復した。15匹のイヌ 6 0 歯を用いた。10 歯は歯髄 C D 1 0 5 陽性細胞及び S D F - 1 、5 歯は脂肪 C D 1 0 5 陽性細胞及び S D F - 1 、5 歯はトータル歯髄細胞及び S D F - 1 、5 歯は細胞を入れず S D F - 1 のみ、5 歯は S D F - 1 を入れず歯髄 C D 1 0 5 陽性細胞のみ、5 歯は細胞を入れず scaffold のみ注入し、14 日後に標本を作製した。6 歯は歯髄 C D 1 0 5 陽性細胞及び S D F - 1 を注入し、28 日後に二次元電気泳動分析した。4 歯に、歯髄 C D 1 0 5 陽性細胞及び S D F - 1 、脂肪 C D 1 0 5 陽性細胞及び S D F - 1 、並びに、トータル歯髄細胞及び S D F - 1 を注入し、90 日後に標本を作製した。7 歯の正常歯をcontrolとして用いた。形態分析のために 4 % paraformaldehyde (PFA) (Nakarai Tesque, Kyoto, Japan) で 4 °C—晩固定し、10 % 蔗糖にて脱灰後、paraffin wax (Sigma) に包埋した。paraffin 切片 (厚さ 5 μm) を hematoxylin-eosin (HE) 染色し、形態学的に観察した。

[0107] 血管染色のため、5 μm 厚みの paraffin 切片を脱パラフィンし、Fluorescein Griffonia (Bande iraea) Simplicifolia Lectin 1/fluorescein-galanthus nivalis (snowdrop) lectin (20 μg/ml, Vector Laboratories, Inc., Youngstown, Ohio) にて 15 分染色し、fluorescence microscope BIOREVO, BZ-9000 (KEYENCE, Osaka, Japan) にて新生血管に対する移植細胞の存在及び局在性を観察した。移植後 14 日後の再生歯髄と正常歯髄を 4 % paraformaldehyde で 45 分固定した後、0.3 % Triton X 含有 PBS で処理後、ブロッキングを行い、GS-IB4 (Griffonia simplicifolia, Alexa Fluor 488) レクチンにて 12 時間 4 °C にてホールマウント免疫染色した。新生血管と移植細胞は二光子顕微鏡 FV1000MPE (Olympus) にて三次元的に撮影した。

- [01 08] 新生神経の染色は、5 μm厚みのparaffin切片を脱パラフィンし、3% Triton X 含有PBSで処理後、2%ヤギ血清でブロッキングを行い、PGP-9.5にて12時間4°Cにて一次染色した。三回PBSで洗浄した後、biotinylated goat anti-rabbit IgG (Vector) (1:200) で二次染色を1時間室温で行った。ABC reagent (VectorLaboratories, Burlingame, CA) にて処理した後、DABにて10分間発色させた。
- [01 09] 新生神経突起が下歯槽神経とつながっていることの確認のため、歯髄CD105陽性細胞をDiIラベルせずに下顎第三切歯に移植し、移植後に14日目にDiIを再生歯髄上に適用し、移植後17日目に下顎骨を摘出し、蛍光顕微鏡(Leica, M 205 FA, Wetzlar, Germany)にて観察した。
- [01 10] 14日目における再生歯髄の再生量を統計学的に解析するため、歯髄CD105陽性細胞及びSDF-1、脂肪CD105陽性細胞及びSDF-1、トータル歯髄細胞及びSDF-1、細胞を入れずSDF-1のみ、SDF-1を入れず歯髄CD105陽性細胞のみ、並びに、細胞を入れずscallopedのみの標本から5本ずつ150 μm間隔で実体顕微鏡にて(Leica, M 205 FA)撮影、Leica Application Suite software を用いて解剖した。根管の表面積に対する新生再生組織の割合はそれぞれの歯牙の三か所を平均して計算した。統計計算はスチューデントt検定を用いて行った。
- [01 11] 生体内における象芽細胞分化マーカーであるdentin-specific phosphoprotein (DSP) とenamelysinの発現は、歯髄CD105陽性細胞及びSDF-1移植後90日目の5 μm paraffin切片において、in situ hybridizationにて根管の側壁において観察した。イヌDSP (183 bp) 及びenamelysin (195 bp) のcDNAをそれぞれNco I 及びSpe I にて切断して線状にリニアライズし、anti-sense probesを作製した。プローブはPGR productをsubcloning後プラスミドから作成し、real time RT-PGRで用いた表2及び表3記載のプライマーから作成した。DIGシグナルはTSAsystem (PerkinElmer, Waltham, MA, USA)にて検出した。
- [01 12] <歯髄CD105陽性細胞の抜髓後根管内移植による歯髄再生>

次に、上述の図3に示したような手順にて、イヌにおいて永久歯の完全根尖完成歯の抜髓後根管内に、歯髄CD105陽性細胞を30「_1とともに自家移植した。図11Aは、SDF-1及び歯髄CD105陽性細胞による歯髄再生を示す図である。図11Bは、図11AにおけるエリアBの拡大図である。図11Cは、図11AにおけるエリアCの拡大図である。図11A、図11B及び図11Cに示すように、歯髄CD105陽性細胞をSDF-1とともに移植すると、歯髄様組織が14日までに形成された。図11Eに示すように、CD105陽性細胞のみを移植しても歯髄様組織が形成されたかSDF-1とともに移植したほうが歯髄様組織の形成が促進された。一方、図11Fに示すように、SDF-1のみを移植すると、極めて少量の歯髄しか形成されなかつた。図11Sに示すように、non_pairedスチューデントt検定で統計学的解析を行うと、歯髄CD105陽性細胞を30「_1とともに移植すると、CD105陽性細胞のみあるいはSDF-1のみと比べて、再生された面積は有意に増加した（それぞれ3.3倍及び4.2倍）。図11Dに示すように、象牙芽細胞様細胞は、根管の象牙質壁に付着し、細管内に突起を伸ばしていた。図11Gに示すように、歯髄様組織は、歯髄CD105陽性細胞を30「_1とともに移植すると、90日後にはセメント工ナメル質境まで達していた。図11Hに示すように、再生組織の上部に存在する細胞は、紡錘形であり、また図11Iに示すように、中央部では星状であった。これらの再生組織は、図11Jに示す正常歯髄組織の細胞に類似していた。図11G及び図11Kに示すように、象牙質側壁に沿って、細管象牙質が観察されたのは特筆すべきことである。図11L及び図11Mに示すように、象牙異質側壁に並んで存在する象牙芽細胞は、象牙芽細胞の二つ（マーラー）であるRename lysin/matrixmetalloproteinase（ MMP）20及びDsp^p陽性であった。

[0113] しかしながら、図11N及び図11Oに示すように、CD105陽性細胞の代わりに、未分取のトータル歯髄細胞を移植した場合には、より少量の歯髄組織しか再生されず、図11Pの矢印に示す石灰化組織及び図11Qに○

Dにて示す骨様象牙質のように、90日後には石灰化がみられた。図11Rに示すように、同様に脂肪由来のCD105陽性細胞を移植した場合にも、より少量の再生組織しか見られなかつた。図11Sに示すように、更に、統計学的解析により、歯髄CD105陽性細胞をSDF-1とともに移植した場合、脂肪CD105陽性細胞をSDF-1とともに移植、あるいはトータル歯髄細胞をSDF-1とともに移植した場合よりも、14日目で、根管の表面積に対する新生再生組織の割合は、有意に高いことが分かつた(51.6倍及び2.2倍)。図11Tに示すように、凍結切片をBS-1 lectinで染色後、共焦点レーザー顕微鏡分析により、再生組織における血管新生が認められた。図11Uに示すように、二光子顕微鏡分析により、DiIでラベルした移植歯髄CD105陽性細胞の多くが、新生毛細血管の近くに観察され、血管新生におけるこれらの細胞の血管新生因子を放出する役割が示唆された。図11Vに示すように、14日目における再生組織の誘導血管の三次元像は、図11Xに示される正常歯髄の像と、密度及び方向性において類似していた。図11Wに示すように、移植したCD105陽性細胞は、新しく再生された歯髄のあらゆるところに観察され、SDF-1により、上部に遊走する能力を歯髄CD105陽性細胞が持つことが示唆された。図11Yに示すように、PGP9.5抗体で染色される神経突起は、根尖孔から新しく再生された組織中に伸長していた。図11Zに示すように、下顎第三切歯に再生された歯髄組織をDiIラベルしたところ、新生歯髄組織(点線で示す)において再生された神経は下歯槽神経とつながっていることが明らかとなつた。

[0114] <歯髄再生の二次元電気泳動分析及び遺伝子発現分析>

再生組織の二次元電気泳動分析のために、28日目の再生歯髄様組織、正常歯髄組織、及び歯根膜組織を細切し、lysis buffer(6M urea, 1.97M thiourea, 2% (w/v) CHAPS, 64.8 mM DTT, 2% (v/v) Pharmalyte)に溶解し、超音波をかけた。15,000rpmで15分、4°Cで遠心し、上清を二次元電気泳動した。等電点電気泳動(IEF)はGel Phorester2-DE systemにて行った。IPG strips(Immobiline DryStrips, pH 4~7, 18cm, GE)はmanu

facturer の指示に従って用いた。IPGstripsはrehydratation solution (6 M urea, 1.97 M thiourea, 2% (v/v) TritonX-100, 13 mM DTT, 2% (v/v) Pharmalyte, 2.5 mM Cetac acid, 0.0025% BPB)により一晩20°Cにて再度水和した。等電点電気泳動(IEF)は500V、2時間、700-3000V、1時間、及び3500V、24時間の電圧を徐々に上昇させる方法で行った。等電点電気泳動後、IPGstripsは平衡緩衝液equilibration buffer (6 M urea, 2.4 mM DTT, 5 mM Tris-HCl, pH 6.8, 2% (w/v) SDS, 0.0025%BPB, 30% (v/v) Glycero)にて30分室温にて反応させた。IPGstripsは更に5mM Tris-HCl, pH 6.8, 2% (w/v) SDS, 0.0025%BPB, 30% (v/v) Glyceroし243 mM iodoacetamideにて20分室温にて平衡化させた。その後、二次元目は12.5% SDS-PAGEgel (20cmx20cm)にて25mA/gelで15分、その後30mA/gelで泳動した。GelはFlamingo Fluorescent Gel Stain (Bio-Rad Laboratories, GA, USA)で染色し、Fluorophore ester 3000, Anatech, Tokyo, Japan)にてscanした。GelイメージはProgenes is (Non Linear Dynamics, NC, USA)を用いて分析し、それぞれのパターンを比較した。

[0115] 歯根膜に特異的なイヌaxin2、periostin、及びasporin/periodontal ligament-associated protein 1 (PLAP-1)を用いてReal time RT-PCR分析を行った。再生組織におけるCollagen type I (I)、syndecan3、及びtenascin Gの発現を正常歯髄並びに歯根膜と比較した。

[0116] <再生歯髄の二次元電気泳動によるタンパク化学分析及び遺伝子発現解析>

図12A、図12B及び図12Cに示すように、二次元電気泳動分析により、再生歯髄組織は28日目において同一個体由来の正常歯髄組織に定性及び定量的にタンパク発現/パターンが類似していることが明らかとなった。正常及び再生歯髄組織両方に見られるタンパクスポットは85.5% (123 spots) であった。一方、図12D、図12E及び図12Fに示すように、正常歯髄組織のタンパクスポットは、歯根膜組織と比べて、違いがみられた。従って、二次元電気泳動分析により、再生組織は機能的に正常歯髄組織であ

ることが判明した。

[0117] 齒髄組織に特異的なマーカーはこれまでに見つかっていない。従って、再生組織が正常の歯髄組織であることを証明するために、歯根膜組織に特異的なマーカーとして、*axin2*, *periostin*及び*asporigin/periodontal ligament-associated protein 1* (PLAP-1) を更に用いた。*axin2*, *periostin*及びPLAP-1 mRNA発現は、正常歯根膜において再生歯髄組織のそれに比べて28日目でそれぞれ25.531倍、179倍及び11倍と高い発現がみられた。表6に示すように、これらの遺伝子は、正常歯髄で再生組織と比べて、ほぼ同程度（0.4倍、0.4倍、及び2.4倍）に発現がみられた。

[0118] [表6]

	正常歯髄/再生歯髄組織	正常歯根膜/再生歯髄組織
<i>Axin2</i>	0.4	25531.7
<i>Periostin</i>	0.4	178.5
<i>PLAP-1</i>	2.4	11.2
<i>Tenascin C</i>	1.0	0.01
<i>Syndecan 3</i>	2.0	0.07
<i>collagenα1(I)</i>	2.3	9.3

[0119] 表6に示すように、*Gol13g6*及び¹⁽¹⁾は歯根膜において再生組織よりも9.3倍多く発現し、正常歯髄と再生歯髄の間ではほとんど違いが認められなかつた。*Syndecan 3*及び*Tenascin G*は歯髄組織で高く発現していることが知られており、再生組織においては歯根膜組織と比較して、14.3倍及び50.0倍高く発現が見られた。従って二次元電気泳動分析及び、遺伝子発現分析により、再生組織は機能的に正常歯髄組織であることが判明した。

[0120] <歯髄CD105陽性細胞の感染根管治療後根管内自家移植による歯髄再生>

イヌ永久歯完全根尖完成歯を全部歯髄除去し、根尖部をK-fileにて#30まで拡大し、そのまま根管を開放し2週間放置し、感染根管歯モデルを作製した。その後、次亜塩素酸ソーダおよびオキシドールにて交互洗浄し、さら

にスメアクリーンを根管内に30秒間入れた後、生理食塩水にてさらに洗浄した。さらにFG（ホルムクレゾール）を根管内に一週間貼薬し、根管内の無菌化を図った。その後、再度、生理食塩水にて洗浄し、根管内をペーパーポイントにて乾燥させた。細胞外基質としてcollagenXYZを用い、根尖側に歯髄幹細胞を付着させると共に歯冠側にSDF-1を付着させた根管充填材を用いた。即ち、抜髓後の根管内自家移植と同様の方法にて、 1×10^6 個の、三代目から四代目の歯髄CD105陽性細胞をcollagen XYZとともに、根管内の下部に自家移植した。根管上部は更にcollagenXYZとともに最終濃度15ng/μlの30「_」1を移植し、窓洞をリン酸亜鉛セメント及びコンポジットレジンで修復した。14日後に標本を作製した。通法にて形態学的に観察した。

[0121] 図13Aは、SDF-1及び歯髄CD105陽性細胞による歯髄再生を示す図である。図13Bは、図13Aにおける根管内に再生された歯髄組織の中央部の拡大図である。図13Cは、図13Aにおける根管内に再生された歯髄組織の象牙質側壁に接する部位の拡大図である。図13A、図13B及び図13Cに示すように、歯髄CD105陽性細胞をSDF-1とともに移植すると、歯髄様組織が13日までに形成された。図13Bに示すように、歯髄組織内は血管が新生され、歯髄細胞がみられたが、炎症性細胞も若干散在していた。図13Cに示すように、象牙芽細胞様細胞は、根管の象牙質側壁に付着し、並列して存在していた。

[0122] 実施例3》

次に、実施例3では、遊走因子G-CSF及び歯髄CD105陽性細胞を用いて、抜歯した根管に充填する場合と非抜歯の根管に充填する場合との比較を行った。

[0123] 上述の実施例1及び実施例2と同様に、イヌ前歯を抜歯した後、scallo Idとしてcollagen XYZとともに歯髄CD105陽性細胞を 5×10^5 cells($10 \mu l$)を根管内下部に、そして遊走因子としてG-CSFを200ng($10 \mu l$)を根管内上部に移植して、14日経過させた。その結果を図14Aに示す。図14Aに示されるように、歯髄様組織は少量しか形成せず、矢印で

示すように、強い炎症像及び外部吸収がみられた。

[0124] 次に、イヌ前歯を抜歯せずに、scaffo ldとしてcollagenXYZとともに歯髄C D 1 0 5陽性細胞を 5×10^5 cells($10\mu\text{m}$)を根管内下部に、そして遊走因子としてG—CSFを200ng($10\mu\text{m}$)を根管内上部に移植して、14日経過させた。その結果を図14Bに示す。図14Bに示されるように、歯髄様組織が著明に形成され、炎症像はみられなかった。また外部吸収もみられなかった。図14Cは、図14Bに示した矢印部分の歯髄様組織の拡大図である。図14Cに示すように、再生歯髄様組織中には、細長い紡錘形の線維芽細胞様の歯髄細胞が存在し、炎症性細胞はみられなかった。

符号の説明

[0125] 100 :対象となる歯

110 :根尖性歯周炎

200 :非抜歯根管充填材

210 :細胞外基質

220 :歯髄幹細胞

230 :遊走因子

400 :血管

500 :象牙質

610 :ゼラチン

620 :レジン

630 :形態形成因子

配列表フリーテキスト

[0126] 配列番号1～64 :プライマー

請求の範囲

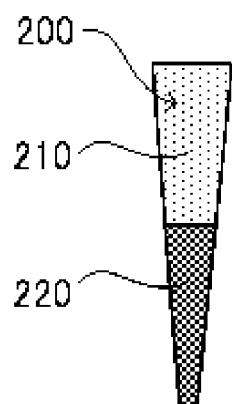
- [請求項1] 抜髓後又は感染根管の根管拡大清掃後、非抜歯の根管の根尖側に挿入される、歯髄幹細胞及び細胞外基質を有することを特徴とする非抜歯根管充填材。
- [請求項2] 前記歯髄幹細胞は、歯髄CXCR4陽性細胞、SSEA—4陽性細胞、FLK—1陽性細胞、CD105陽性細胞、歯髄SP細胞、CD31陰性かつCD146陰性細胞、CD24陽性細胞、CD150陽性細胞、CD29陽性細胞、CD34陽性細胞、CD44陽性細胞、CD73陽性細胞、及びCD90陽性細胞のうち少なくとも何れか一つを含むことを特徴とする請求項1記載の非抜歯根管充填材。
- [請求項3] 前記歯髄SP細胞が、CXCR4陽性、SSEA—4陽性、FLK—1陽性、CD31陰性かつCD146陰性、CD24陽性、CD105陽性、CD150陽性、CD29陽性細胞、CD34陽性細胞、CD44陽性細胞、CD73陽性細胞、又はCD90陽性細胞の何れかであることを特徴とする請求項2記載の非抜歯根管充填材
- [請求項4] 前記歯髄幹細胞を根管の根尖側に付着させるとともに、根管の歯冠側に細胞遊走因子、細胞増殖因子、神経栄養因子及び血管新生因子のうち少なくとも何れか一つを含む遊走因子を付着させていることを特徴とする請求項1に記載の非抜歯根管充填材。
- [請求項5] 前記細胞遊走因子が、SDF—1、VEGF、G—CSF、SCF、MMP3、S—lit及びGM—CSFのうち少なくとも何れか一つであることを特徴とする請求項4記載の非抜歯根管充填材。
- [請求項6] 前記細胞増殖因子が、IGF、bFGF及びPDGFのうち少なくとも何れか一つであることを特徴とする請求項4記載の非抜歯根管充填材。
- [請求項7] 前記神経栄養因子が、GDNF、BDNF、NGF、Neuropeptide Y及びNeurotrophin 3のうち少なくとも何れか一つであることを特徴とする請求項4記載の非抜歯根管充填材。

- [請求項8] 前記細胞外基質が、コラーゲン、人工プロテオグリカン、ゼラチン、ハイドロゲル、フィブリン、フォスフォホリン、ヘパラン硫酸、ヘパリン、ラミニン、フィブロネクチン、アルギン酸、ヒアルロン酸、キチン、PLA、PLGA、PEG、PGA、PDLLA、PCL、ハイドロキシアパタイト、 β -TCP、炭酸カルシウム、チタン及び金のうち少なくとも何れか一つを含む生体親和性材料から構成されていることを特徴とする請求項1に記載の非抜歯根管充填材。
- [請求項9] 前記細胞外基質における前記歯髄幹細胞の含有率は、 1×10^3 セル/ μ l以上 1×10^6 セル/ml以下であることを特徴とする請求項1に記載の非抜歯根管充填材。
- [請求項10] 抜髓後又は感染根管の根管拡大清掃後の非抜歯の根管の根尖側に、歯髄幹細胞及び細胞外基質を有する非抜歯根管充填材を注入することで、根管内の歯組織を再生することを特徴とする非抜歯による歯組織再生方法。
- [請求項11] 前記歯髄幹細胞は、歯髄CXCR4陽性細胞、SSEA-4陽性細胞、FLK-1陽性細胞、CD105陽性細胞、歯髄SP細胞、CD31陰性かつCD146陰性細胞、CD24陽性細胞、CD150陽性細胞、CD29陽性細胞、CD34陽性細胞、CD44陽性細胞、CD73陽性細胞、及びCD90陽性細胞のうち少なくとも何れか一つを含むことを特徴とする請求項10記載の非抜歯による歯組織再生方法。
- [請求項12] 前記歯髄SP細胞が、CXCR4陽性、SSEA-4陽性、FLK-1陽性、CD31陰性かつCD146陰性、CD24陽性、CD105陽性、CD150陽性、CD29陽性細胞、CD34陽性細胞、CD44陽性細胞、CD73陽性細胞、又はCD90陽性細胞の何れかであることを特徴とする請求項11記載の非抜歯による歯組織再生方法。
- [請求項13] 前記非抜歯根管充填材は、歯髄幹細胞を根管の根尖側に付着させる

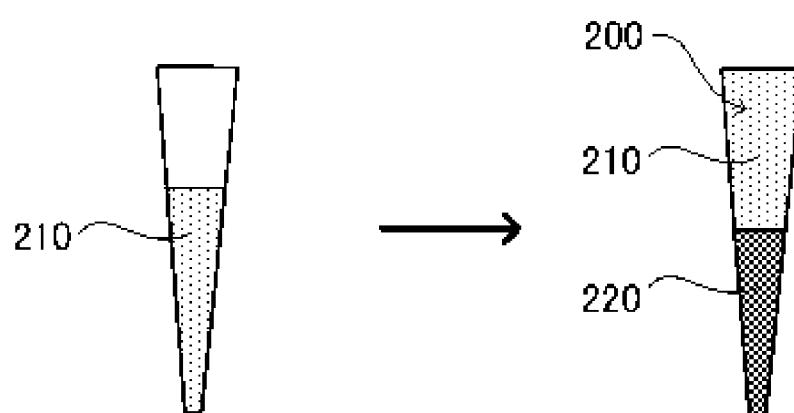
とともに、根管の歯冠側に細胞遊走因子、細胞増殖因子、神経栄養因子及び血管新生因子のうち少なくとも何れか一つを含む遊走因子を付着させていることを特徴とする請求項 10 に記載の非抜歯による歯組織再生方法。

- [請求項14] 前記細胞遊走因子が、 SDF_1、 VEGF、 G-CSF、 SCF、 MMP3、 Silt 及び GM-CSF のうち少なくとも何れか一つであることを特徴とする請求項 13 記載の非抜歯による歯組織再生方法。
- [請求項15] 前記細胞増殖因子が、 IGF、 bFGF 及び PDGF のうち少なくとも何れか一つであることを特徴とする請求項 13 記載の非抜歯による歯組織再生方法。
- [請求項16] 前記神経栄養因子が、 GDNF、 BDNF、 NGF、 Neuropeptide Y 及び Neurotrophin 3 のうち少なくとも何れか一つであることを特徴とする請求項 13 記載の非抜歯による歯組織再生方法。
- [請求項17] 前記細胞外基質が、コラーゲン、人工プロテオグリカン、ゼラチン、ハイドロゲル、フィブリン、フォスフォホリン、ヘパラン硫酸、ヘパリン、ラミニン、フィブロネクチン、アルギン酸、ヒアルロン酸、キチン、PLA、PLGA、PEG、PGA、PDLLA、PCL、ハイドロキシアパタイト、 β -TCP、炭酸カルシウム、チタン及び金のうち少なくとも何れか一つを含む生体親和性材料から構成されていることを特徴とする請求項 10 に記載の非抜歯による歯組織再生方法。
- [請求項18] 前記根管充填材を前記根管の根尖側に注入する前に、前記根管を拡大することで根尖部の根管の太さを所定の大きさにすることを特徴とする請求項 10 に記載の非抜歯による歯組織再生方法。
- [請求項19] 前記細胞外基質における前記歯髄幹細胞の含有率は、 1×10^3 セル/ μ l 以上 1×10^6 セル/ μ l 以下であることを特徴とする請求項 10 に記載の非抜歯による歯組織再生方法。

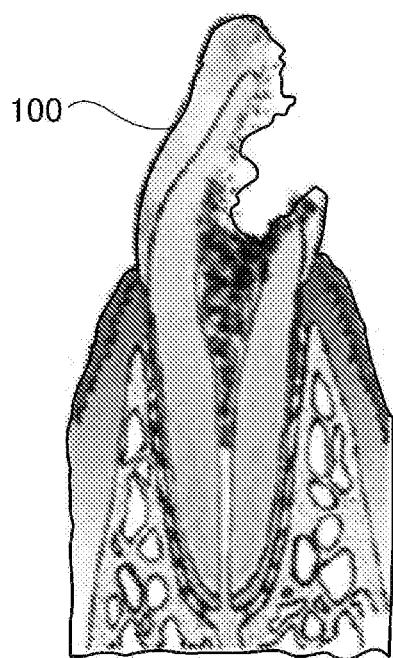
[図1]



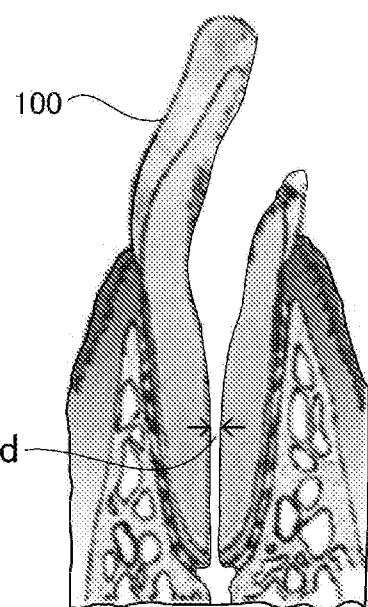
[図2]



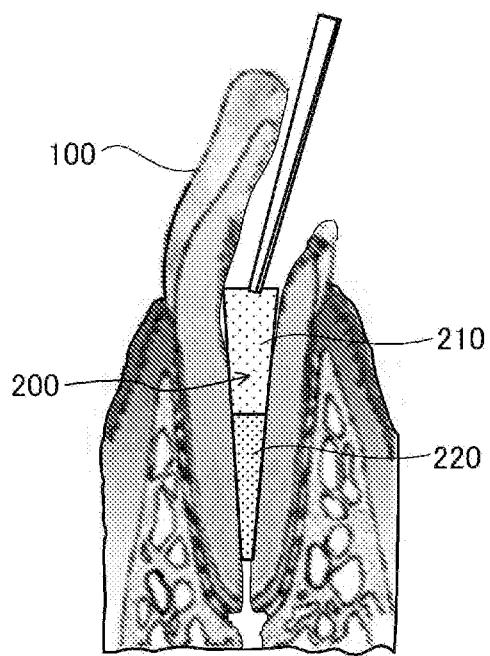
[図3A]



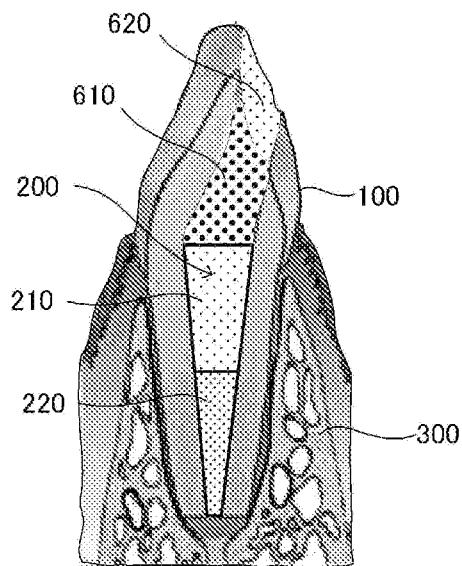
[図3B]



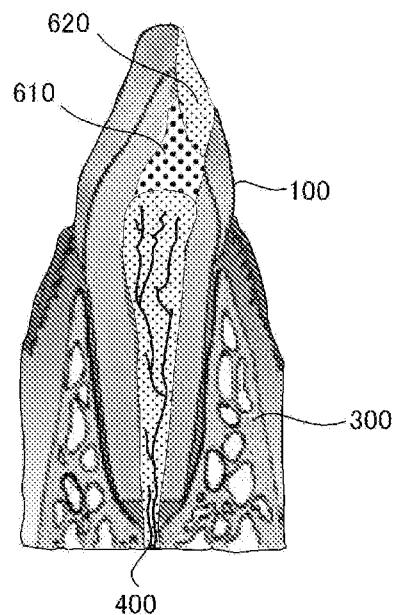
[図3C]



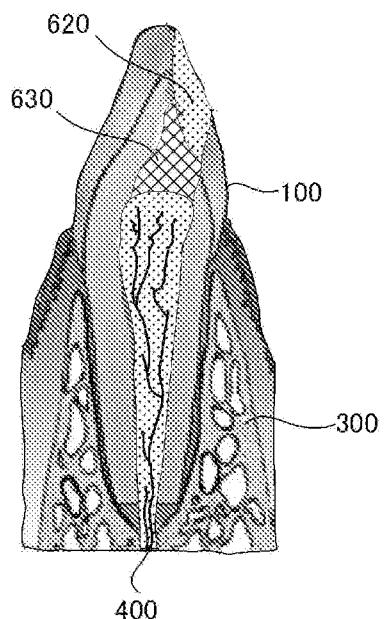
[図3D]



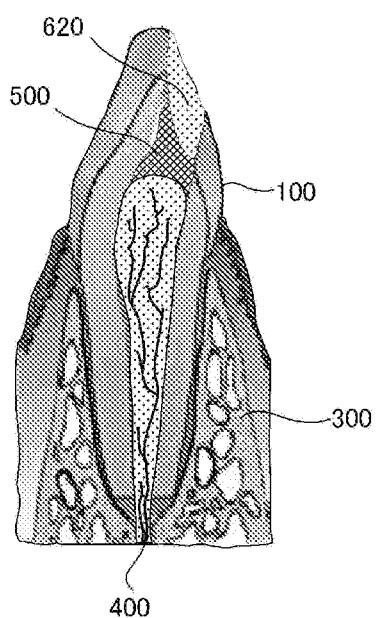
[図3E]



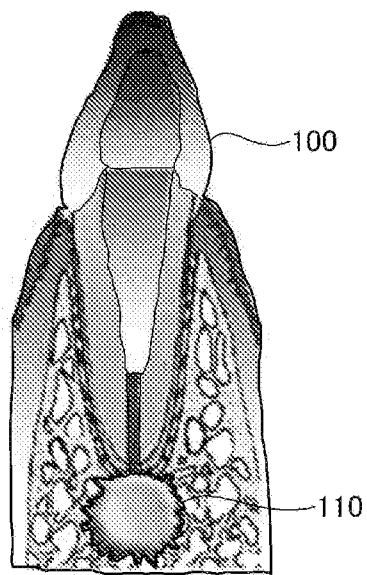
[図3F]



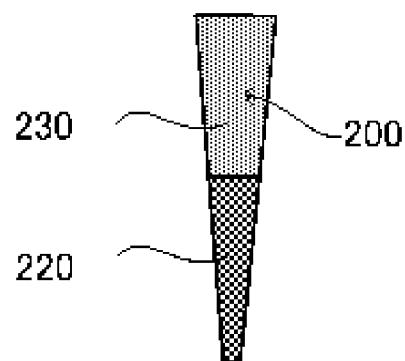
[図3G]



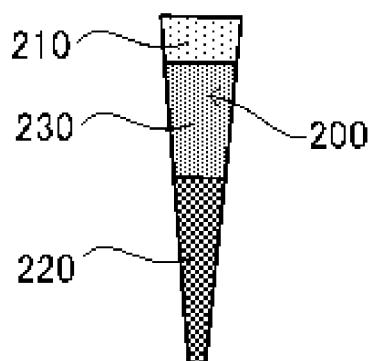
[図3H]



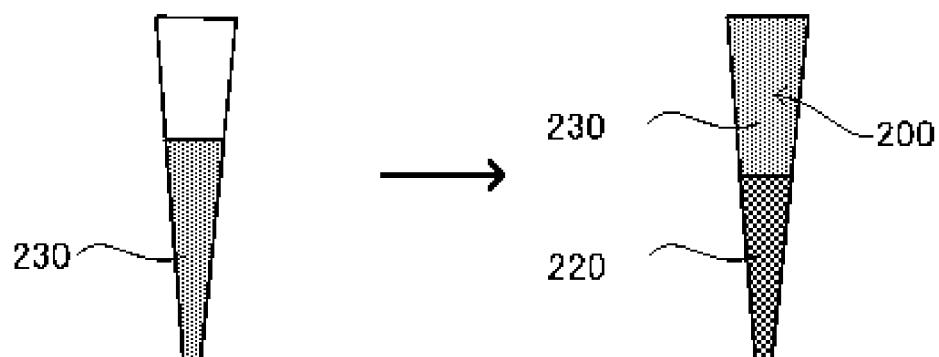
[図4A]



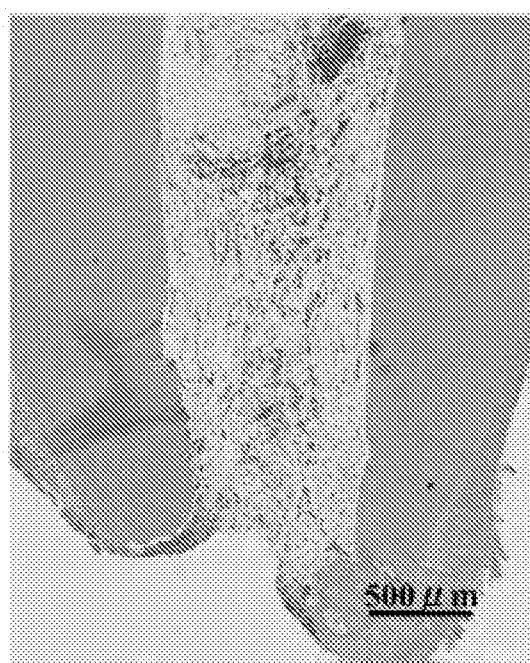
[図4B]



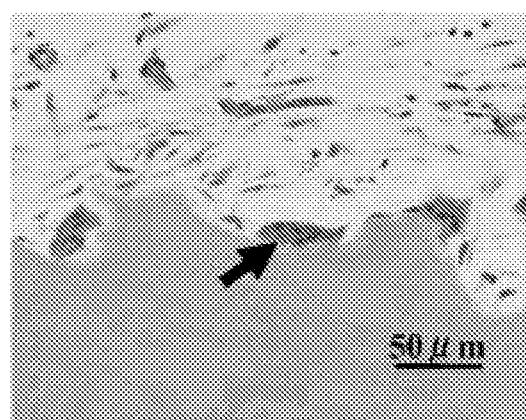
[図5]



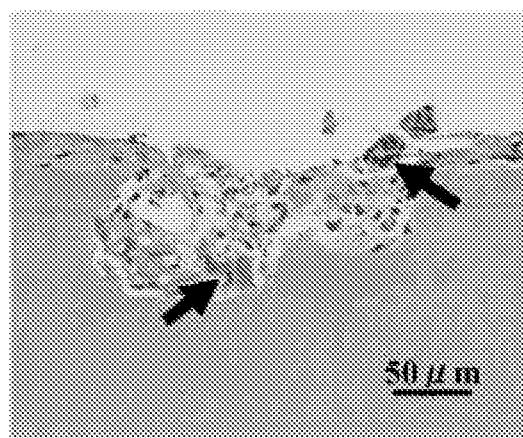
[図6A]



[図6B]



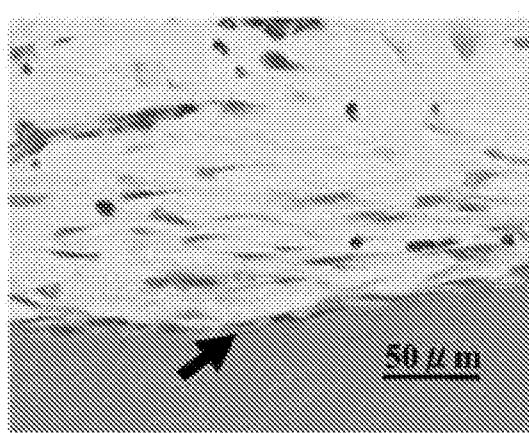
[図6C]



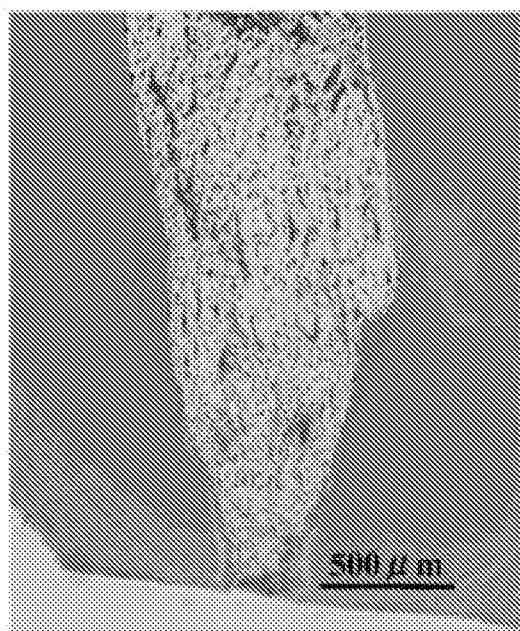
[図7A]



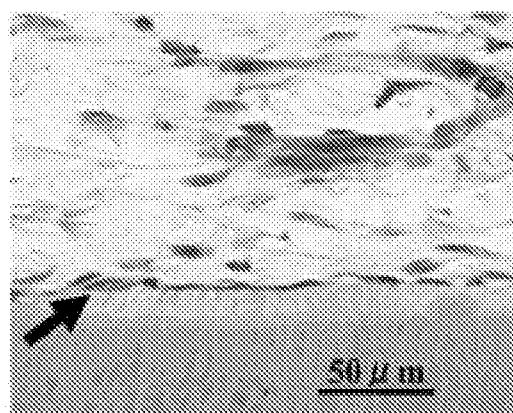
[図7B]



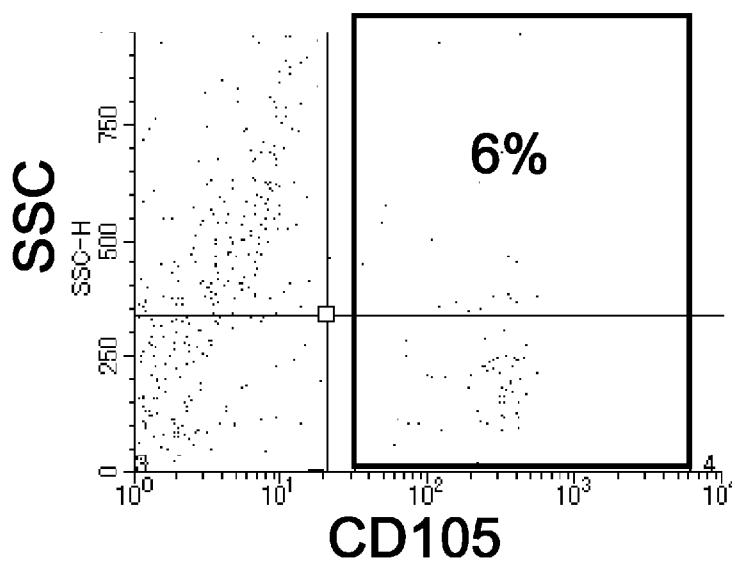
[図8A]



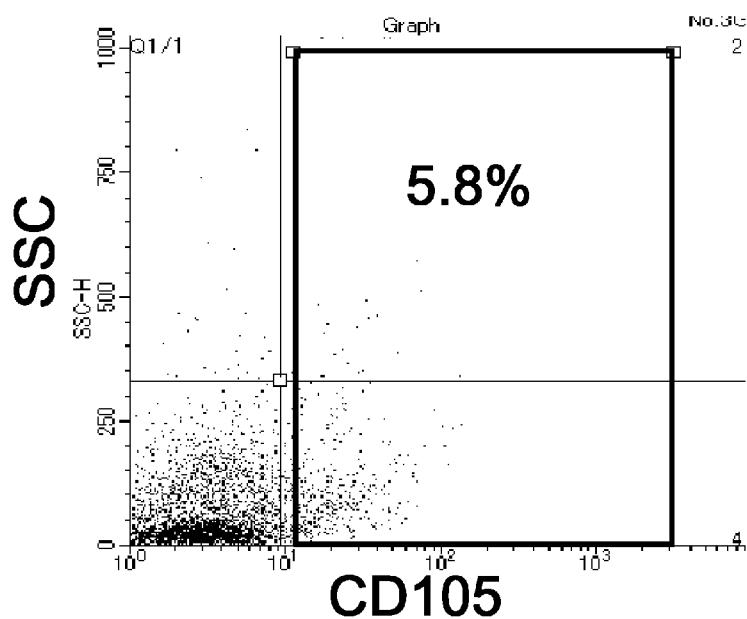
[図8B]



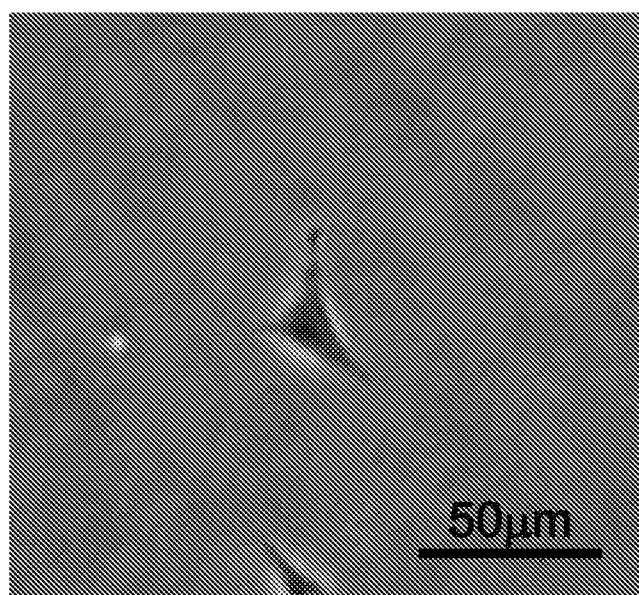
[図9A]



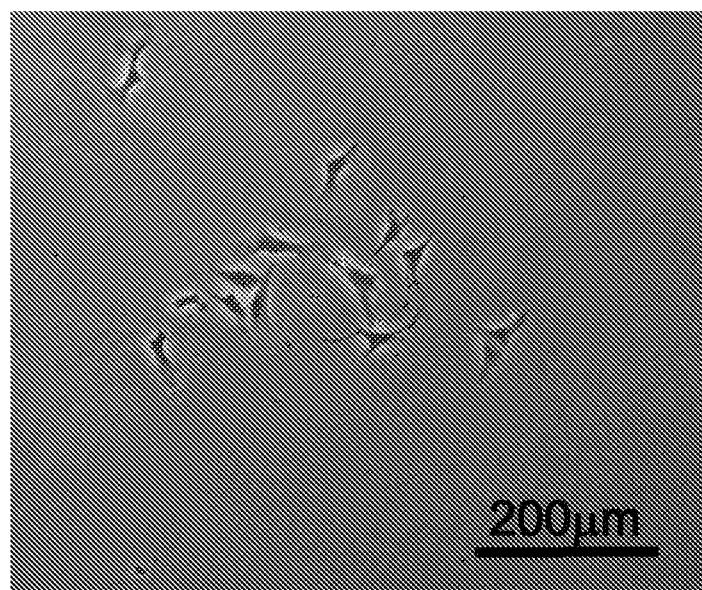
[図9B]



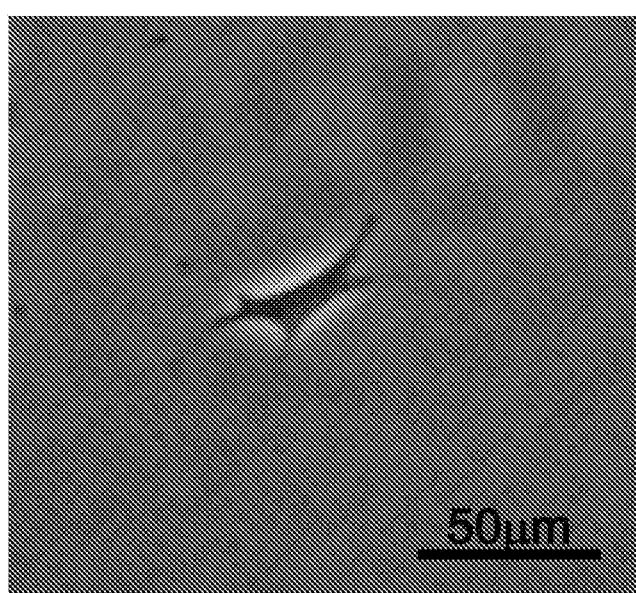
[図9C]



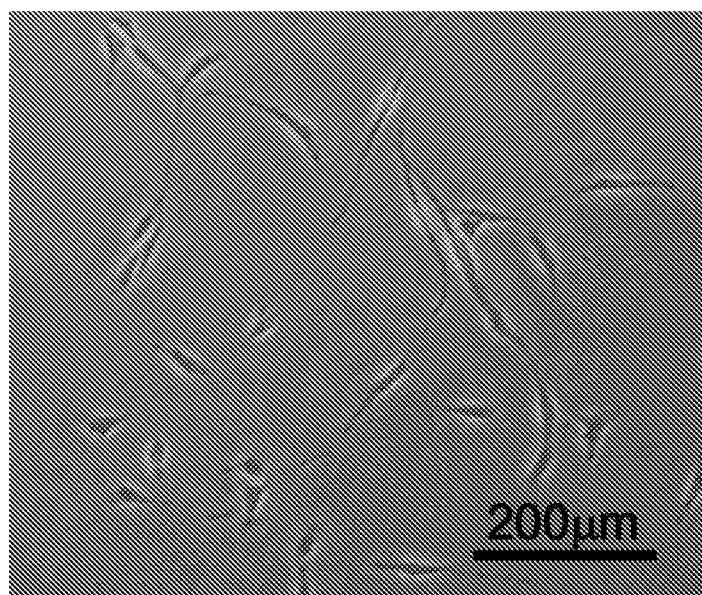
[図9D]



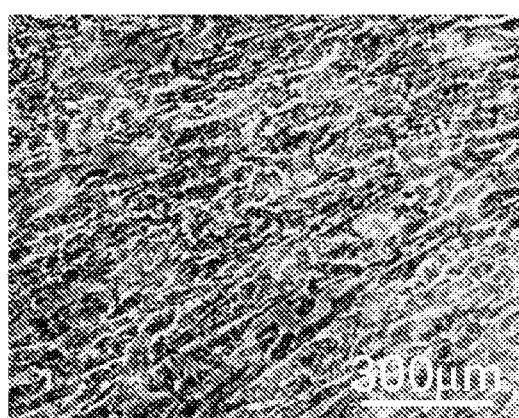
[図9E]



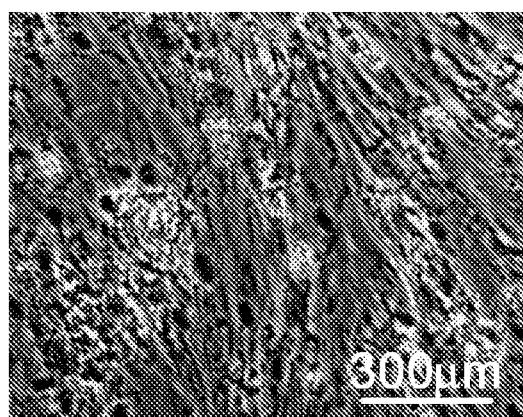
[図9F]



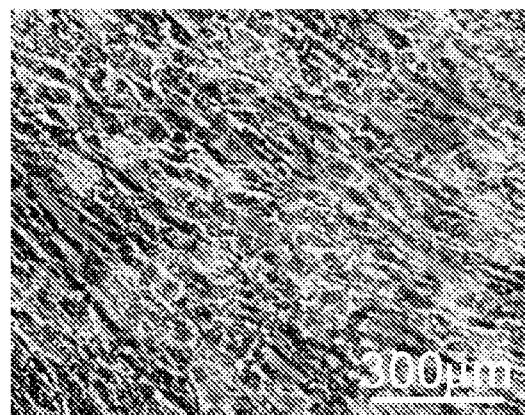
[図10A]



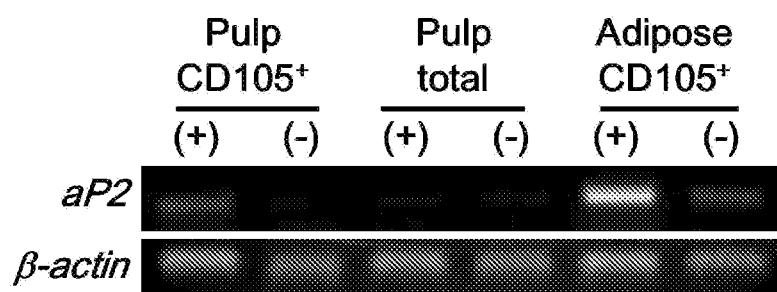
[図10B]



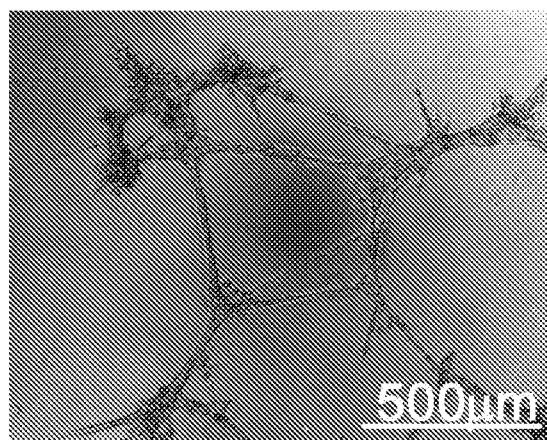
[図10C]



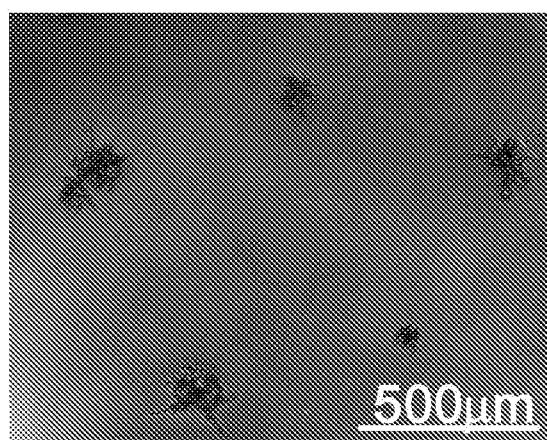
[図10D]



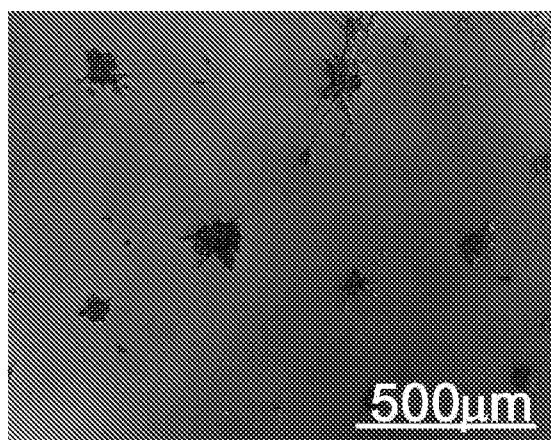
[図10E]



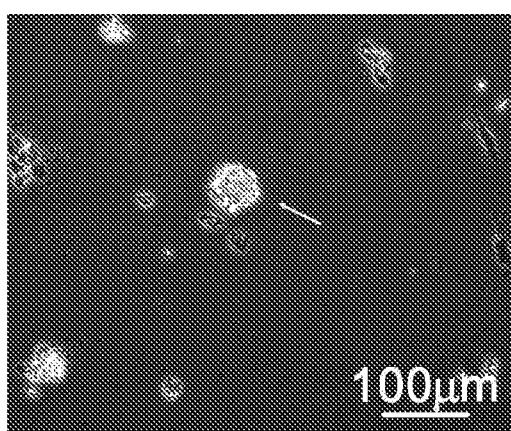
[図10F]



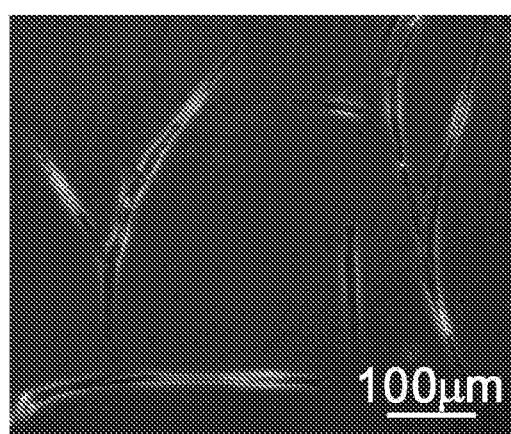
[図10G]



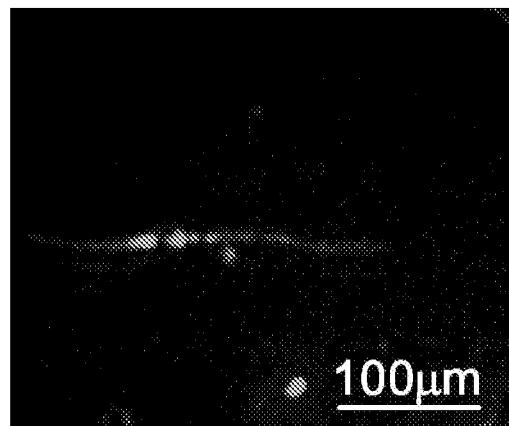
[図10H]



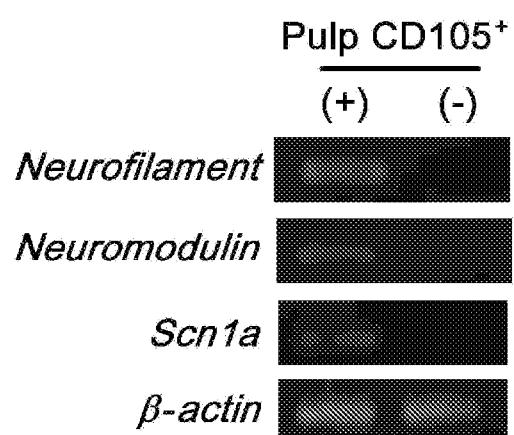
[図10I]



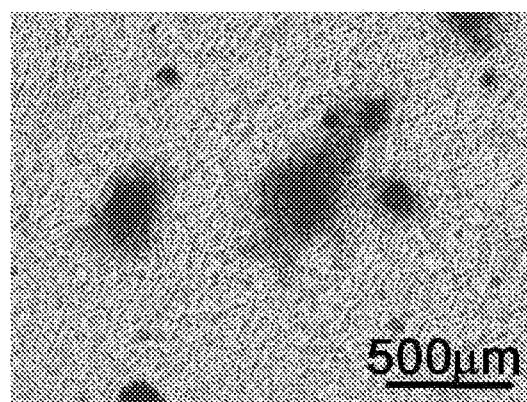
[図10J]



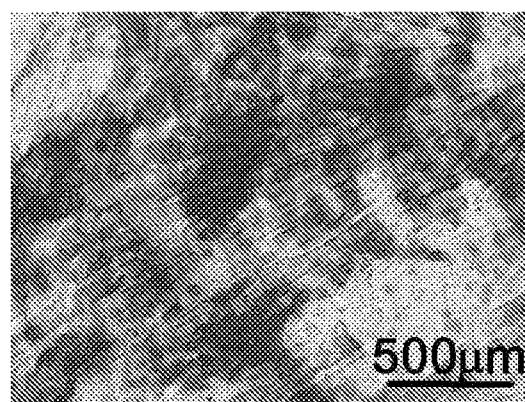
[図10K]



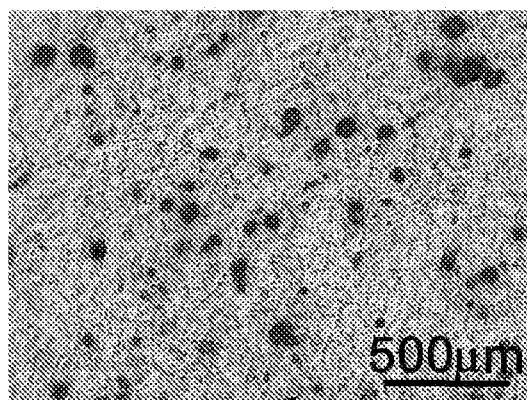
[図10L]



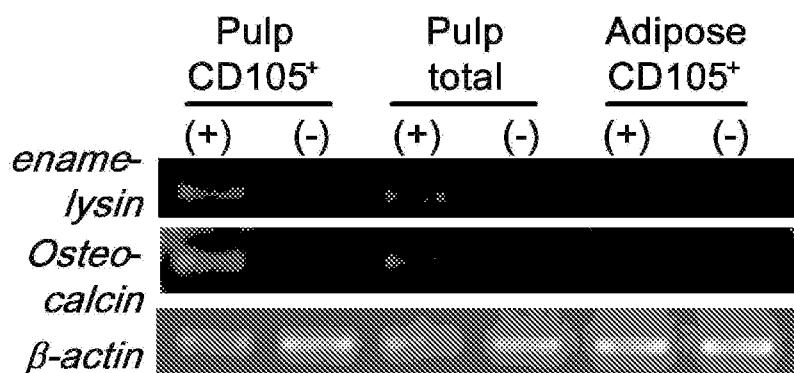
[図10M]



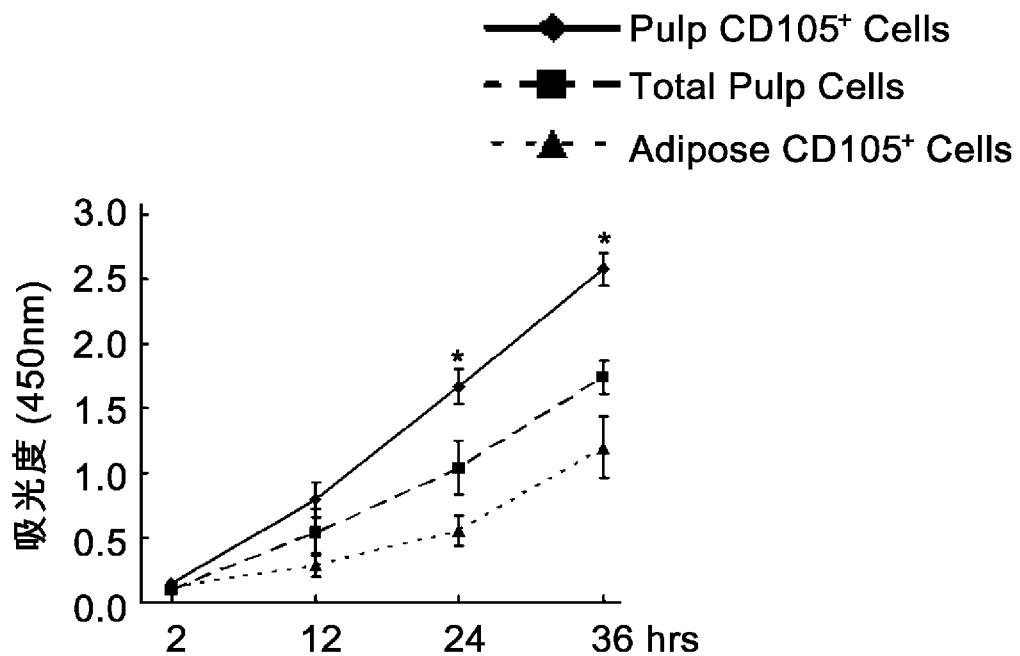
[図10N]



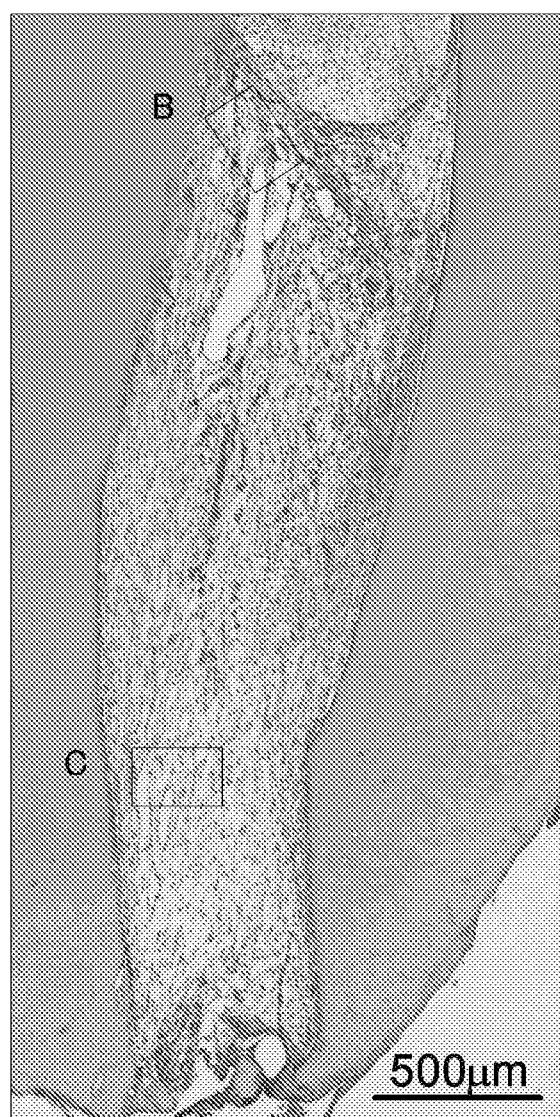
[図100]



[図10P]



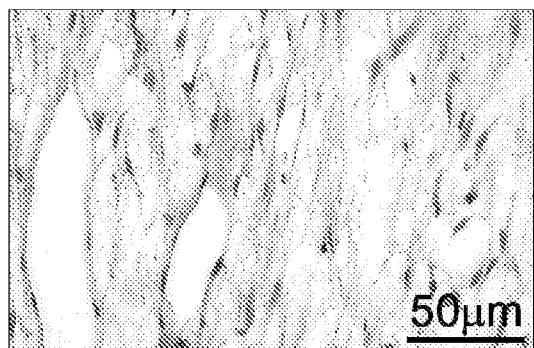
[図11A]



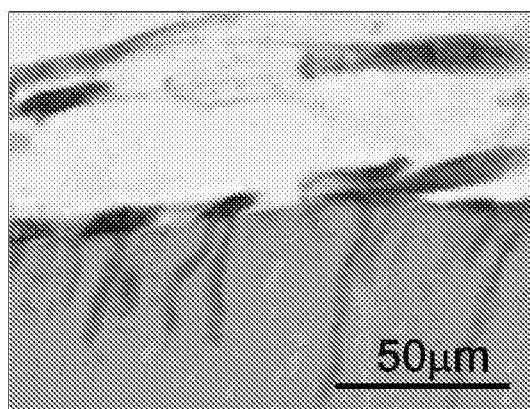
[図11B]



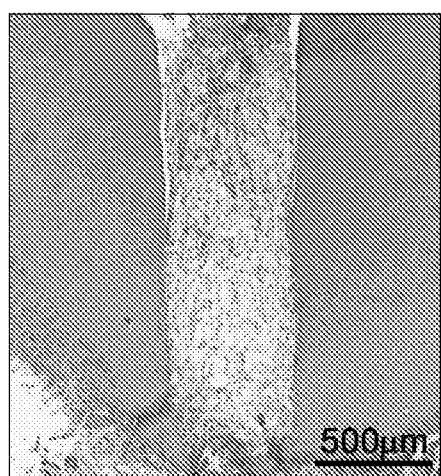
[図11C]



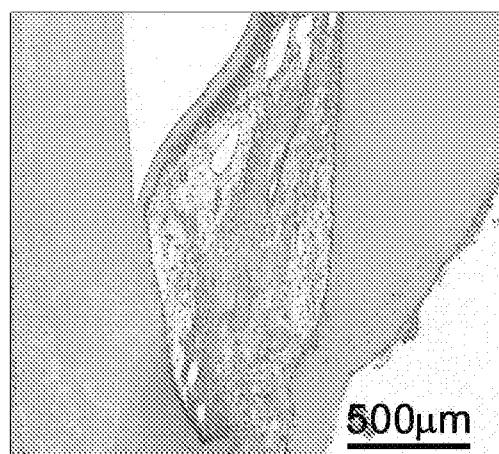
[図11D]



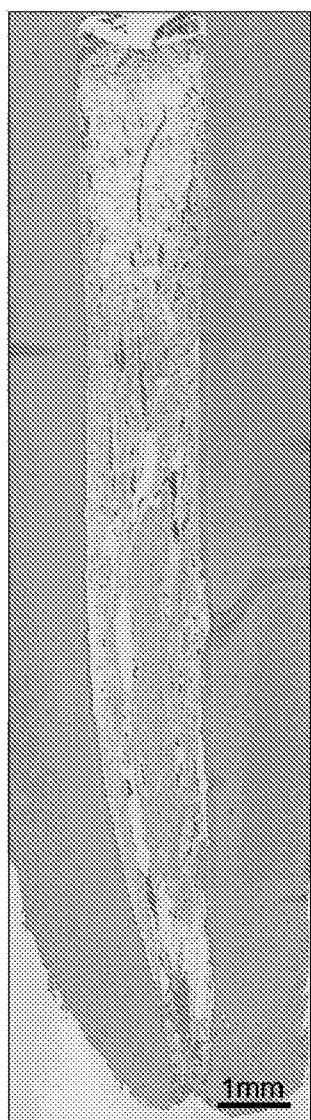
[図11E]



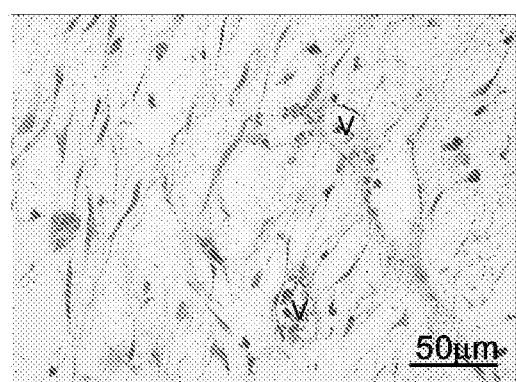
[図11F]



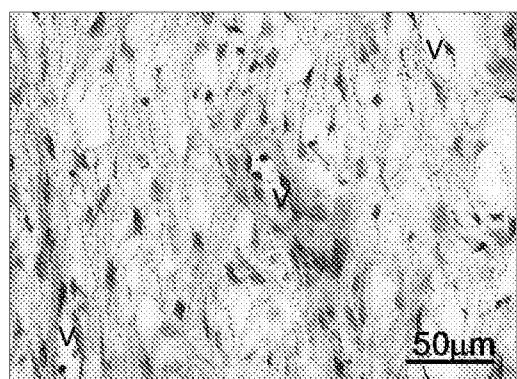
[図11G]



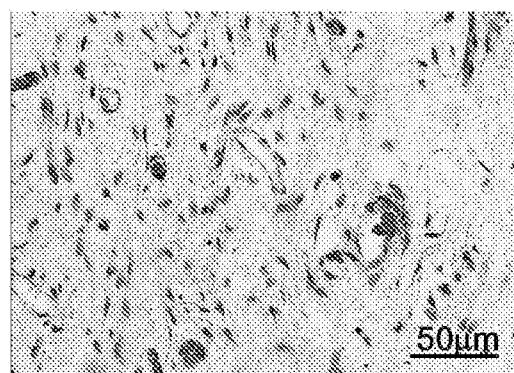
[図11H]



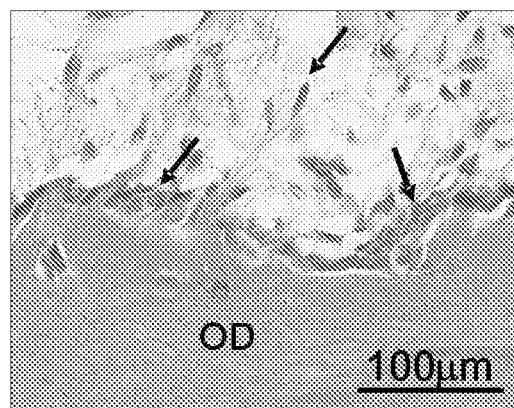
[図11I]



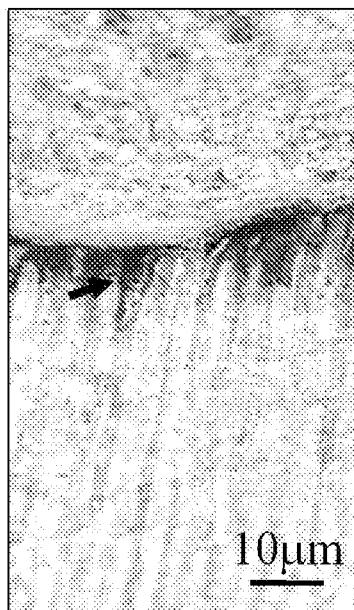
[図11J]



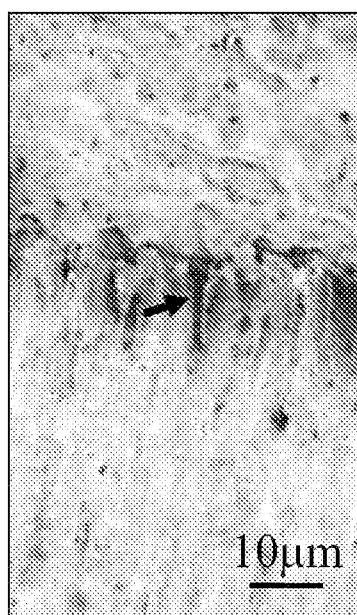
[図11K]



[図11L]



[図11M]



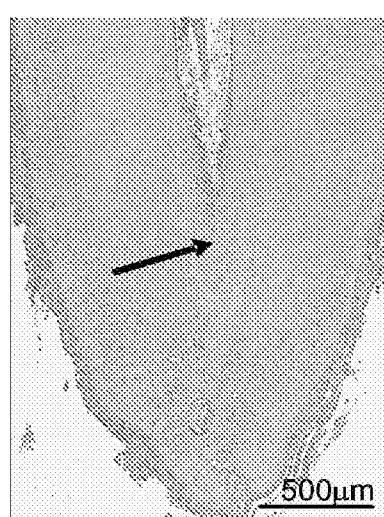
[図11N]



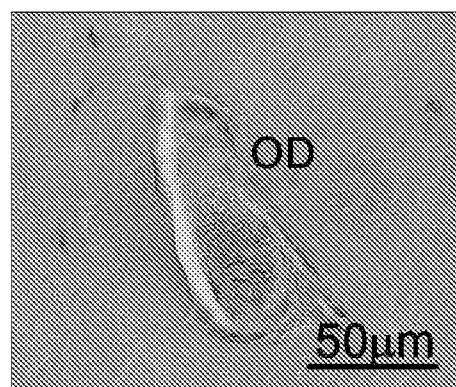
[図11O]



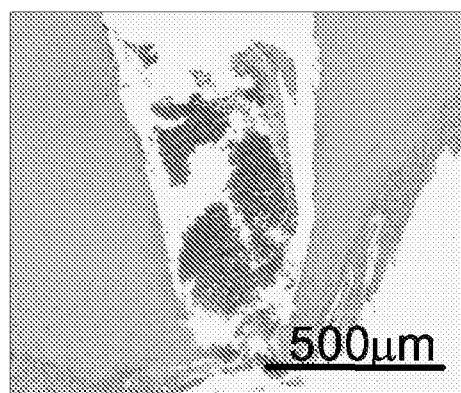
[図11P]



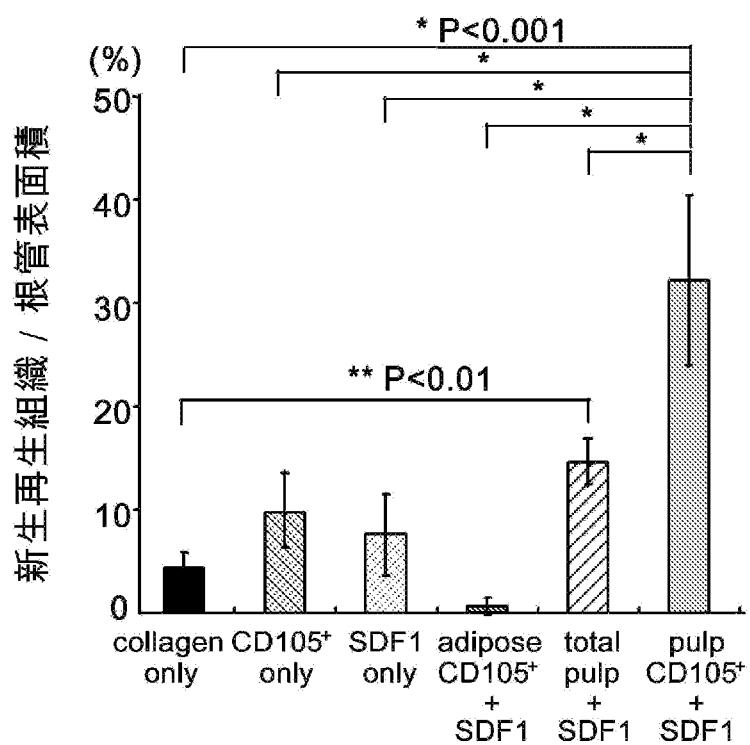
[図11Q]



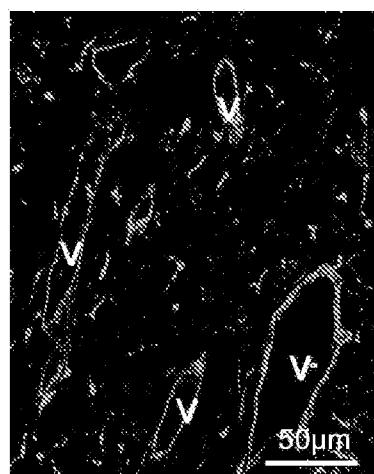
[図11R]



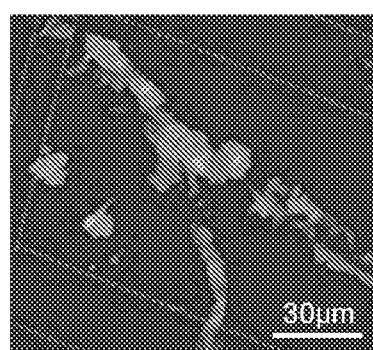
[図11S]



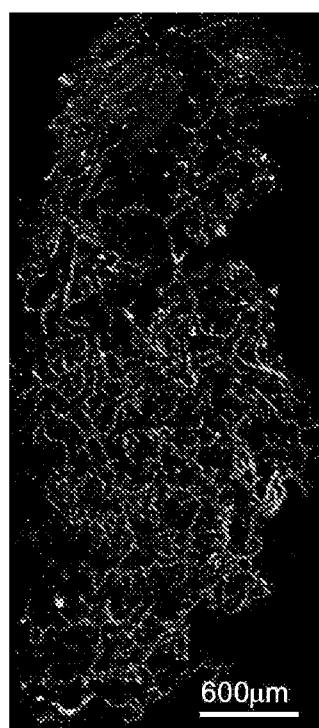
[図11T]



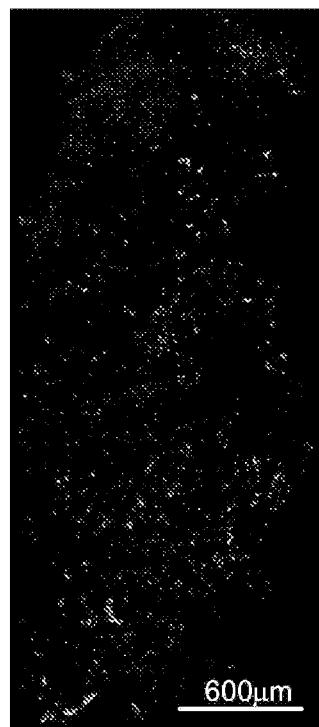
[図11U]



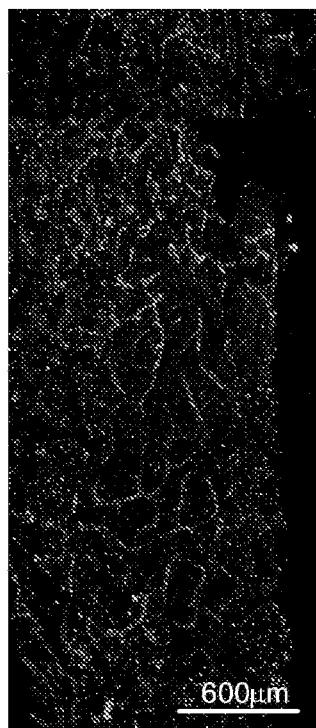
[図11V]



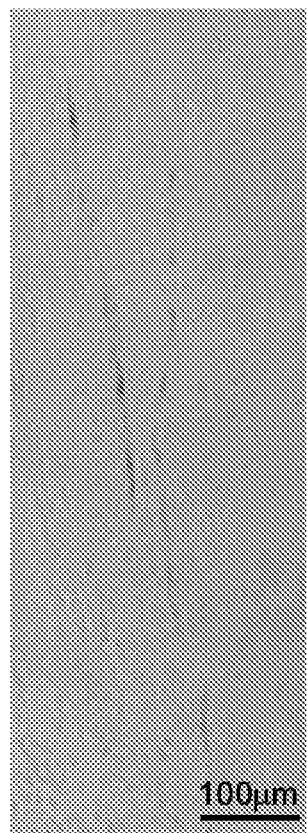
[図11W]



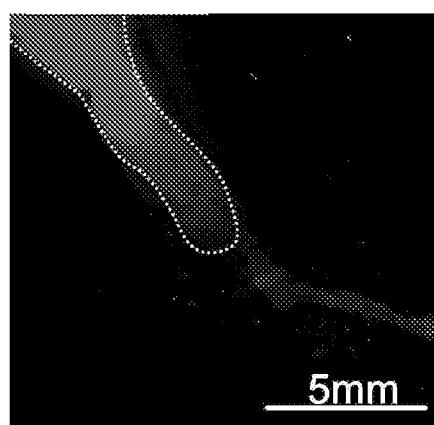
[図11X]



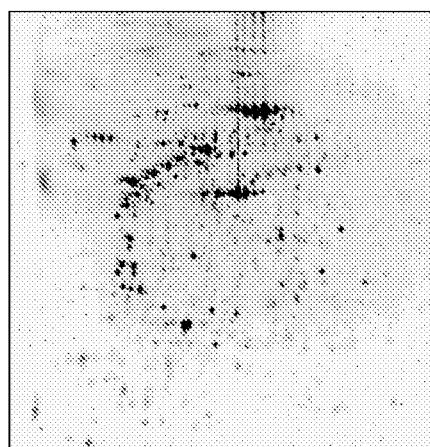
[図11Y]



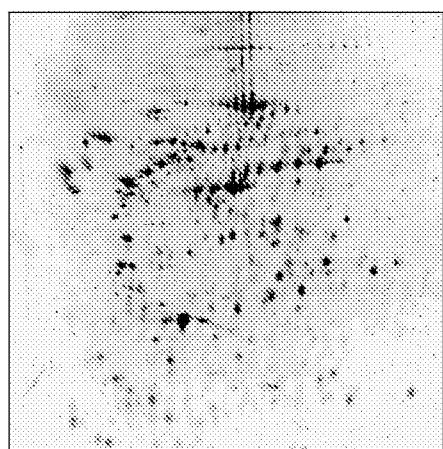
[図11Z]



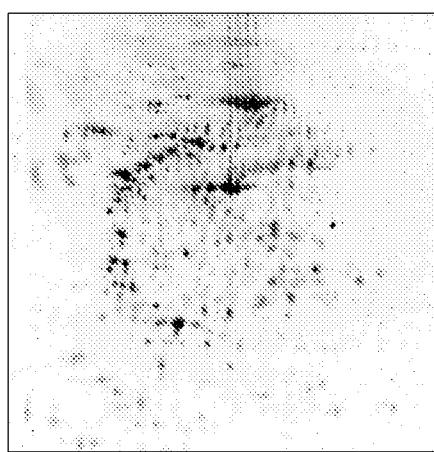
[図12A]



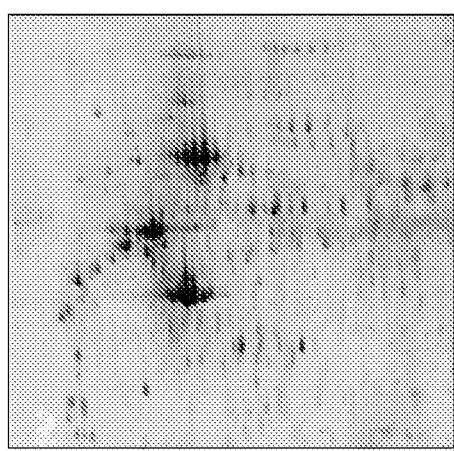
[図12B]



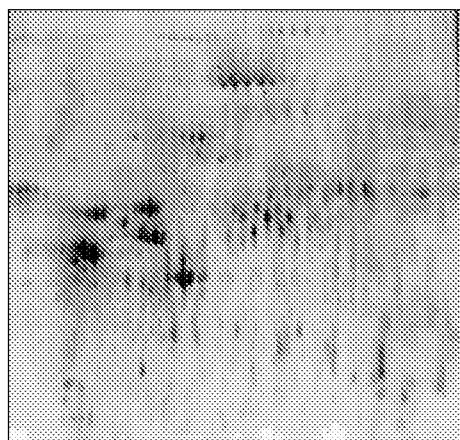
[図12C]



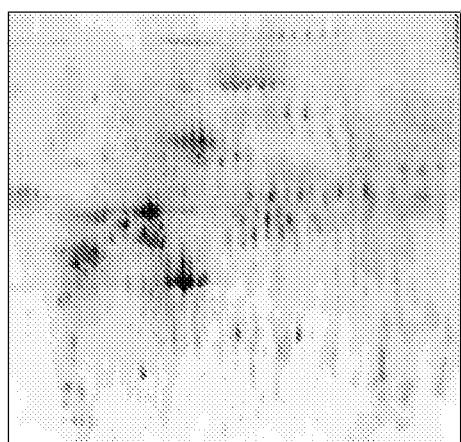
[図12D]



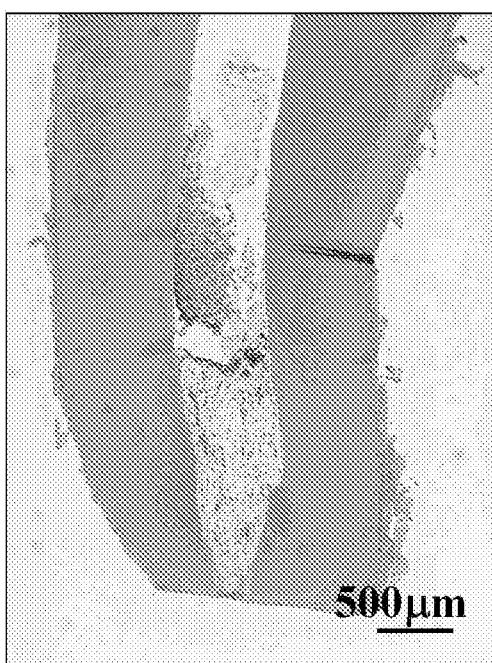
[図12E]



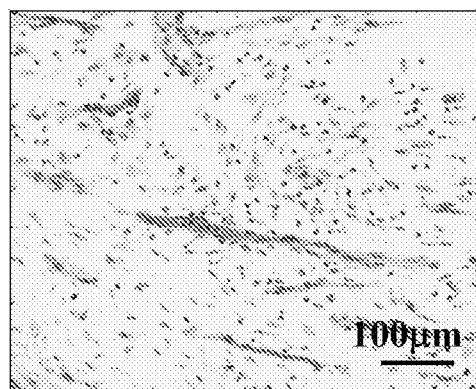
[図12F]



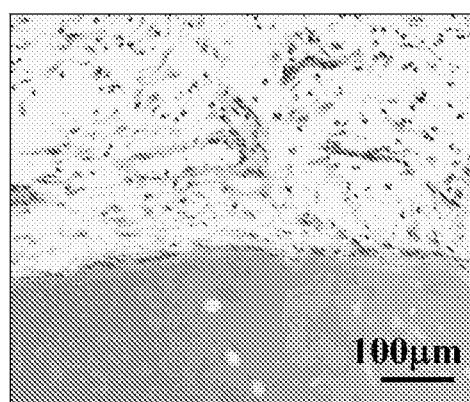
[図13A]



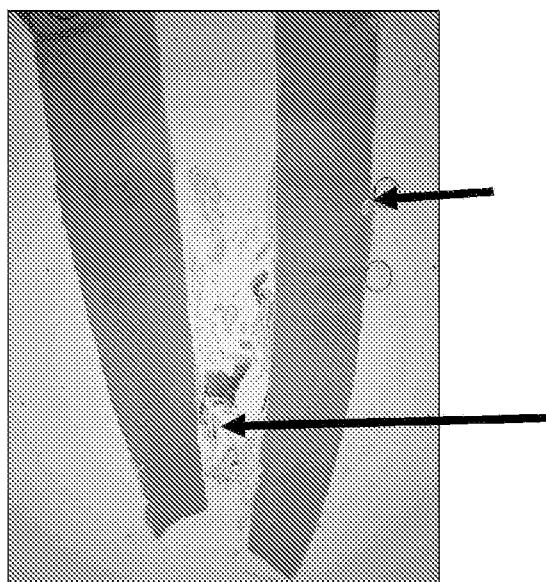
[図13B]



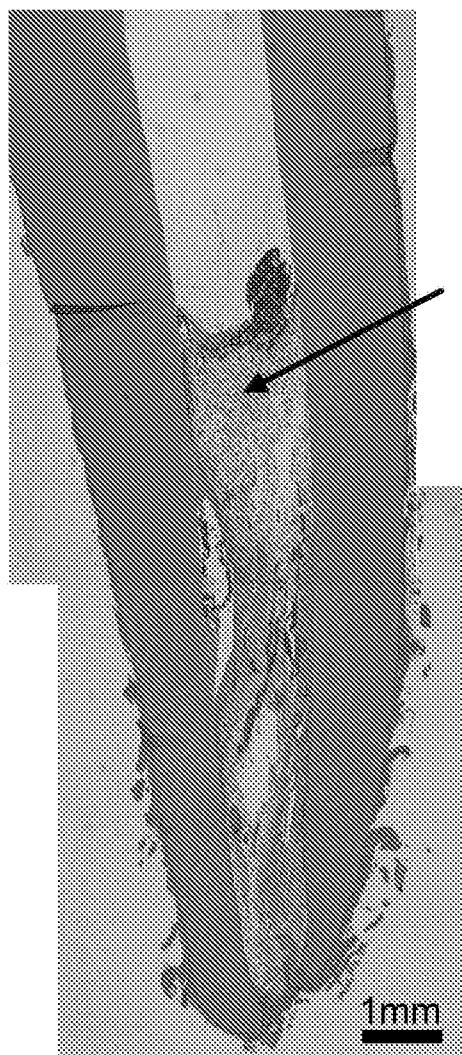
[図13C]



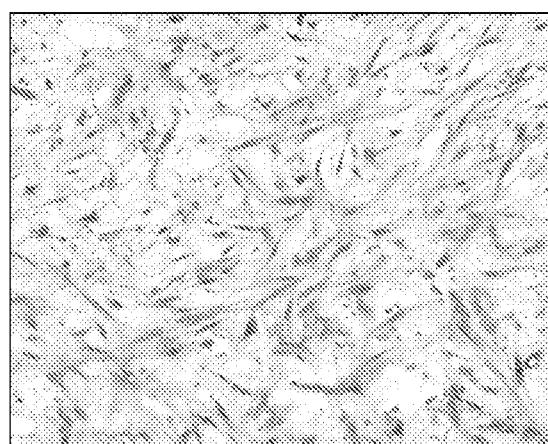
[図14A]



[図14B]



[図14C]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2010/005536

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

A 61L 2 7/0 0 (2006.01)i , A 61K 3 5/32 (2006.01)i , A 61K 3 8/22 (2006.01)i , A 61P 1/02 (2006.01)i , A 61P 4 3/0 0 (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)

A 61L 2 7/ 00 , A 61K3 5 / 32 , A 61K 3 8 / 22 , A 61P 1 / 02 , A 61P 4 3 / 00

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

Jitsuyo Shinan Koho	1922-1 996	Jitsuyo Shinan Toroku Koho	1996-2010
Kokai Jitsuyo Shinan Koho	1971-2010	Toroku Jitsuyo Shinan Koho	1994-2010

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

CA/ME DL INE / EMBASE / BI O SIS (STN) , J STPlus / JME DPLus / J ST 7580 (JDream! I)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	GOTILI EB, E.L. et al - , An ult r a st ructural i nve st i gati on o f t i ssue -engi neered pulp con st ruct s impl anted wi thi n end odonti cal ly t reated teeth , Journal o f the Ameri can Dental As sociati on , 2008 , Vol . 139 , pp . 457 - 465 , Abs tract , Material s and Methods , page 462 , column o f 'Cell l attachment andactivi ty ' , page 463 , column o f 'Potenti al clini cal succe ss '	1-9

Further documents are listed in the continuation of Box C.

See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"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)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibnion or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"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

"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

"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

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search
20 October , 2010 (20.10.10)

Date of mailing of the international search report
02 November , 2010 (02.11.10)

Name and mailing address of the ISA/
Japan ese Patent Of fice

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2010/005536

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	IOHARA, K. et al., Regeneration of dental pulp after pulpotomy by transplanted CD31-/CD146-side population cells from a canine tooth, Regenerative Medicine, 2009.04, Vol.4, No.3, pp.377-385, Abstract, page 378, left column, the last paragraph to right column, 1st paragraph, page 381, right column, 2nd paragraph to page 383, right column, 3rd paragraph	1- 9
Y	NAKASHIMA, M. et al., Tissue engineering of teeth, Handbook of Biomaterialization, 2007, Vol.3, Medical and Clinical Aspects, pp.265-281, Abstract, '17.2.1', '17.2.3', '17.3.1', '17.4'	1- 9
P, X	WO 2009/113733 A1 (Japan Health Sciences Foundation), 17 September 2009 (17.09.2009), entire text (Family : none)	1- 9
A	ZHANG, W. et al., The performance of human dental pulp stem cells on different three-dimensional scaffold materials, Biomaterials, 2006, Vol.27, pp.5658-5668	1- 9
A	Kan'ichi NAKAGAWA et al., "Hydroxyapatite no Konkan Jutenzai to shite no Oyo Kachi ni Kan suru Jikken Byorigakuteki Kenkyu (Dai 1 Po)", Nihon Shika Hozongaku Zasshi, 1984, vol.27, no.1, pages 190 to 199	1- 9
A	NAKASHIMA, M. et al., The application of tissue engineering to regeneration of pulp and dentin in endodontics, Journal of Endodontics, 2005, Vol.31, No.10, pp.711-718	1- 9
A	JP 2006-211957 A (Hitachi Medical Corp.), 17 August 2006 (17.08.2006), (Family : none)	1- 9

INTERNATIONAL

SEARCH REPORT

International application No.

PCT / JP2 010 / 005536

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. Claims Nos.: 10 - 19

because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

The inventions set forth in claims 10 to 19 involve methods for treatment of the human body by surgery or therapy -

2. Claims Nos.:

because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

3. Claims Nos.:

because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This international Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. As all searchable claims could be searched without effort justifying additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.
3. As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.
- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.
- No protest accompanied the payment of additional search fees.

A. 発明の属する分野の分類(国際特許分類(IPC))

Int.Cl. A61L27/00 (2006. 01) i, A61K35/32 (2006. 01) i, A61K38/22 (2006. 01) i, A61P1/02 (2006. 01) i, A61P43/00 (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. A61L27/00, A61K35/32, A61K38/22, A61P1/02, A61P43/00

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	1922-19
日本国公開実用新案公報	1971-20
日本国実用新案登録公報	1996-20
日本国登録実用新案公報	1994-20

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)

CA/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS(STN), JSTPlus/JMEDPlus/JS 年T7580 (JDream! I)

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 請求項の番号
X	GOTLiEB, E. L. et al., An ultrastructural investigation of tissue-engineered pulp constructs implanted within endodontically treated teeth, Journal of the American Dental Association, 2008, Vol. 139, pp. 457-465 Abstract, Materials and Methods, 第 462 頁 「Cell attachment and activity」欄, 第 463 頁 「Potential clinical success」欄	1-9

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

「I&」同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日 20.10.2010	国際調査報告の発送日 02.11.2010
国際調査機関の名称及びあて先 日本特許庁 (ISA/JP) 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) 安居 拓哉 電話番号 03-3581-1101 内線 3452 4C 3437

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 請求項の番号
Y	IOHARA, K. et al. , Regeneration of dental pulp after pulpotoray by transplantation of CD31_CD146_ side population cells from a canine tooth, Regenerative Medicine, 2009. 04 , Vol. 4 , No. 3 , pp. 377-385 Abstract, 第378頁左欄最終段落-同頁右欄第1段落, 第381頁右欄第2段落-第383頁右欄第3段落	1-9
Y	NAKASHIMA, M. et al. , Tissue engineering of teeth, Handbook of Bioraineralization, 2007, Vol. 3 , Medical and Clinical Aspects, pp. 265-281 Abstract, 「17. 2. 1」, 「17. 2. 3」, 「17. 3. 1」, 「17. 4」	1-9
P, X	Wo 2009/113733 A1 (財団法人ヒューマンサイエンス振興財団) 2009. 09. 17, 全文 (ファミリーなし)	1-9
A	ZHANG, W. et al. , The performance of human dental pulp stem cells on different three-dimensional scaffold materials, Biomaterials, 2006 , Vol. 27 , pp. 5658—5668	1-9
A	中川寛一他, ハイドロキシアパタイトの根管充填材としての応用価値に関する実験病理学的研究(第1報), 日歯保雑, 1984, Vol. 27, No. 1, pp. 190-199	1-9
A	NAKASHIMA, M. et al. , The application of tissue engineering to regeneration of pulp and dentin in endodontics, Journal of Endodontics, 2005 , Vol. 31, No. 10, pp. 711-718	1-9
A	JP 2006-211957 A (株式会社日立メディコ) 2006. 08. 17, (ファミリーなし)	1-9

第II欄 請求の範囲の一部の調査ができないときの意見 (第1ページの2の続き)

法第8条第3項 (PCT 17条(2)(a)) の規定により、この国際調査報告は次の理由により請求の範囲の一部について作成しなかった。

1. 請求項 10-19 は、この国際調査機関が調査をすることを要しない対象に係るものである。つまり、

請求項 10-19 に係る発明は、手術又は治療による人体の処置方法を包含するものである。

2. 請求項 _____ は、有意義な国際調査をすることができる程度まで所定の要件を満たしていない国際出願の部分に係るものである。つまり、

3. 請求項 _____ は、従属請求の範囲であって PCT 規則 6.4(a) の第2文及び第3文の規定に従って記載されていない。

第III欄 発明の単一性が欠如しているときの意見 (第1ページの3の続き)

次に述べるようにこの国際出願に二以上の発明があるとこの国際調査機関は認めた。

1. 出願人が必要な追加調査手数料をすべて期間内に納付したので、この国際調査報告は、すべての調査可能な請求項について作成した。

2. 追加調査手数料を要求するまでもなく、すべての調査可能な請求項について調査することができたので、追加調査手数料の納付を求めなかつた。

3. 出願人が必要な追加調査手数料を一部のみしか期間内に納付しなかつたので、この国際調査報告は、手数料の納付のあった次の請求項のみについて作成した。

4. 出願人が必要な追加調査手数料を期間内に納付しなかつたので、この国際調査報告は、請求の範囲の最初に記載されている発明に係る次の請求項について作成した。

追加調査手数料の異議の申立てに関する注意

- 追加調査手数料及び、該当する場合には、異議申立て手数料の納付と共に、出願人から異議申立てがあつた。
- 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがあつたが、異議申立て手数料が納付命令書に示した期間内に支払われなかつた。
- 追加調査手数料の納付はあつたが、異議申立てはなかつた。