

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第5086642号
(P5086642)

(45) 発行日 平成24年11月28日(2012.11.28)

(24) 登録日 平成24年9月14日(2012.9.14)

(51) Int.Cl.

A61L 27/00 (2006.01)
A61F 2/28 (2006.01)

F 1

A 6 1 L 27/00
A 6 1 F 2/28
A 6 1 L 27/00F
J

請求項の数 18 (全 31 頁)

(21) 出願番号 特願2006-541104 (P2006-541104)
 (86) (22) 出願日 平成16年11月22日 (2004.11.22)
 (65) 公表番号 特表2007-512083 (P2007-512083A)
 (43) 公表日 平成19年5月17日 (2007.5.17)
 (86) 國際出願番号 PCT/SG2004/000380
 (87) 國際公開番号 WO2005/048885
 (87) 國際公開日 平成17年6月2日 (2005.6.2)
 審査請求日 平成19年10月19日 (2007.10.19)
 (31) 優先権主張番号 60/524,278
 (32) 優先日 平成15年11月21日 (2003.11.21)
 (33) 優先権主張国 米国(US)

前置審査

(73) 特許権者 506172366
 オステオポア・インターナショナル・プラ
 イヴェート・リミテッド
 シンガポール国、シンガポール 1176
 84, サイエンス・パーク 2, ジ・アル
 ファ #02-28
 (74) 代理人 100099623
 弁理士 奥山 尚一
 (74) 代理人 100096769
 弁理士 有原 幸一
 (74) 代理人 100107319
 弁理士 松島 鉄男
 (74) 代理人 100114591
 弁理士 河村 英文

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】骨組織再生のための生体吸収性プラグインプラントおよび方法

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

(i) 頭蓋欠損部に挿入される第1部分と、ここで、前記第1部分は、厚さXを有し、第1の表面を有する、

(ii) 前記第1部分から外側に伸び、欠損部の輪郭に係合する第2部分と、ここで、前記第2部分は、厚さYを有し、第1表面とは反対側の第2の表面を有する、を含む、頭蓋骨組織再生のために適した頭蓋形成用インプラントであって、

前記第1表面は、前記第2表面の面積よりも小さい面積を有し、前記第1部分及び第2部分が膨張性材料から形成され、前記膨張性材料が多孔性材料であり、X : Yの比が1 : 1 ~ 3 : 1であり、

前記頭蓋形成用インプラントが親水性溶液、親水性液体及び/又は体液と接触すると膨張し、

頭蓋骨の欠損内への挿入に適しており、前記頭蓋形成用インプラントを前記頭蓋骨の外面に固定するための手段を必要としない、頭蓋形成用インプラント。

【請求項 2】

X : Yの比は、2 . 75 : 1 ~ 3 : 1である請求項1に記載の頭蓋形成用インプラント。

【請求項 3】

完全に相互接続した多孔性構造を有する請求項1又は2に記載の頭蓋形成用インプラント。

10

20

【請求項 4】

前記第1表面及び第2表面が平面である請求項1～3のいずれか1項に記載の頭蓋形成用インプラント。

【請求項 5】

前記膨張性材料が、生体吸収性ポリカプロラクトン（PCL）を含む請求項1～4のいずれか1項に記載の頭蓋形成用インプラント。

【請求項 6】

前記膨張性材料が、PCLフィラメントを1層ずつ積層化することによって調製される請求項5に記載の頭蓋形成用インプラント。

【請求項 7】

前記膨張性材料が、生体吸収性リン酸三カルシウム・ポリカプロラクトン（TCP-PCL）を含む請求項1～6のいずれか1項に記載の頭蓋形成用インプラント。

【請求項 8】

生物活性物質をさらに含む請求項1～7のいずれか1項に記載の頭蓋形成用インプラント。

【請求項 9】

前記頭蓋形成用インプラント上に播種された細胞をさらに含む請求項1～8のいずれか1項に記載の頭蓋形成用インプラント。

【請求項 10】

前記第1表面及び第2表面が、円形、四角形又は長方形の形状を有する請求項1～9のいずれか1項に記載の頭蓋形成用インプラント。

【請求項 11】

テーパー形状を有する請求項1～10のいずれか1項に記載の頭蓋形成用インプラント。

【請求項 12】

前記膨張性材料が、熱溶解積層法（FDM）技術を用いてPCLフィラメントを1層ずつ積層化することによって調製される請求項5に記載の頭蓋形成用インプラント。

【請求項 13】

前記PCLフィラメント層が、0°、60°及び／又は120°の方向付けを有する請求項12に記載の頭蓋形成用インプラント。

【請求項 14】

前記TCP-PCLが、TCP-PCL（20：80%）である請求項7に記載の頭蓋形成用インプラント。

【請求項 15】

前記TCP-PCLが60～70%の多孔性を有する請求項14に記載の頭蓋形成用インプラント。

【請求項 16】

カテーテルを配置し抜去するための開口部を有する請求項1～15のいずれか1項に記載の頭蓋形成用インプラント。

【請求項 17】

前記細胞が幹細胞である請求項9に記載の頭蓋形成用インプラント。

【請求項 18】

前記細胞が間葉系幹細胞である請求項17に記載の頭蓋形成用インプラント。

【発明の詳細な説明】**【技術分野】****【0001】**

本発明は、骨組織再生のための膨張性生体吸収性インプラントならびに骨組織修復および再生のための方法に関する。

【背景技術】**【0002】**

10

20

30

40

50

骨、例えば頭蓋の再建は、現在も進行中の集中的な研究の1つである。頭蓋の再建に関しては、いくつかの報告書は大きく複雑な形状の頭蓋欠損の再建に焦点を当てているが、これに比較してトレフィンにより作製されたバーホールにおける小さいが美容上望ましくない骨の間隙の修復についてはほとんど報告がなされていない。トレフィンにより作製されたバーホールはしばしば、小さいが望ましくない頭皮および皮膚の陥没を生じさせる。硬膜下血腫は、特に患者が事故に関連して、または発作の結果として脳内の血液凝固に起因する頭部損傷を有する場合に多数発生する問題である。これは通常、穿頭ドレナージもししくは洗浄によって治療される。トレフィンによるバーホール手順は、患者の頭蓋骨上へ典型的には直径14から19mmの穴を穿孔するステップを含む。

【0003】

10

通常は骨が欠損を再生および正常な状態に戻すことができないそれらの欠損を充填するために、様々な骨移植片もしくは骨置換材料が使用されてきた。Tessier (Tessier 1982) は、欠損を架橋もしくは充填するための分割型頭蓋冠自己移植片の使用について報告している。この技術は安価で単純なアプローチを意味するが、ときには周囲の頭蓋冠骨から移植片を採取するために一次切除術を拡大しなければならない。しかし、骨組織移植片の使用にはいくつかの問題が結び付いている。患者自身の骨が移植片として使用される場合は、外科医は、骨サンプルを採取するために追加の外傷性手術を実施しなければならない。骨移植片が他のヒトから採取される、または動物の骨が使用される場合は、たとえ移植片が患者の組織と適合するように処置された場合でさえ、ウイルス感染もしくは免疫学的問題が発生することがある。

【0004】

20

自己移植片を使用するまた別の可能性は、開頭術手順中に骨粉を収集し、それをフィブリン糊のようなヒドロゲルと混合し、その手順後にそのペーストを使用して欠損を充填する方法である (Matsumoto, 1998)。

【0005】

30

金属を基材とする頭蓋形成術用の材料は、チタン製のプレートやメッシュの形状で広範囲に使用してきた。高度の生体適合性および機械的強度に取り扱いの容易さおよび正確な固定が組み合わされると、相当に高額の費用も正当と見なされるであろう (Broadbuds, 2002)。医学分野において一般に使用される生体材料である Silastic (シラスティック) はバーホールカバーとしても使用されるが、報告書としてその生体適合性に関して考察された議論は、そのエラストマーに対する病理的組織反応に起因する異物反応の形成を指摘している (Winkler, 2000)。

【0006】

近年には、骨組織の内方成長を、そしてこのためインプラントのより良好なインプラントを可能にする骨誘導性生体材料およびインプラントに関心が向かっている。生体吸収性材料および組織工学技術を使用する傾向は、最終的には自己骨によって置換されるプロテーゼを生じさせた (Habal 1999, Stendel 2001, Schantz 2003a, b)。Kobayashi et al (1987) は、トレフィンにより作製されたバーホールを再建するため、そして皮膚における術後のくぼみを防止するために様々なアルミナセラミック製インプラントを設計かつ製作してきた。ヒドロキシアパタイトを基材とするセラミック製インプラントは、それらの機械的特性、骨誘導性および組込みの特徴のためにますます人気が高まっている (Yamashina, 1989, 1993, Miake, 2000)。Yamashina は、それらが後頭領域の凸状に適合するように形状がドーム状かつ橈円形であるヒドロキシアパタイトプレートを設計した。この執筆者は、さらにまたバーホール欠損に適合する HA 製ボタンならびに線状頭蓋欠損のためのアパタイト顆粒もまた設計した。ヒドロキシアパタイトを基材とする特別設計された「キーホール・ボタン」は、トレフィンによる欠損のために Koyama et al (2000) によって設計された。

【0007】

40

様々な外科的アプローチおよび植込み型器具は、特にバーホール欠損に関連する急性ま

50

たは慢性硬膜下血腫を治療するために開発されてきた。これらの場合には、頭蓋内もしくは頭蓋周囲の液体を監視もしくは排液するため、そして平行して圧力特徴を監視するためにシャントもしくはカテーテルを配置するのがしばしば望ましい。Emonds and Hassler (1999) は、catheder の配置を可能にする中空スクリューを開発したが、他方 Dujoyny et al (2002) はスクリューのために取り付けられた 5 つのフラップおよびキーホール様開口部を備える円形プレートからなるチタン製の水頭シャントドレナージ用のバーホールカバーを設計した。

【0008】

米国特許第 6,350,284 ('284) 号は、剛性プレートならびに孔径 30~1000 μm の孔を含有する繊維織物層からなる生体吸収性頭蓋インプラントについて記載している。しかしこのインプラントは、例えば縫合糸、留めびょう、またはスクリューなどを取り付けるための手段によって骨に固定する必要があるので、このため実際的ではない。

【発明の開示】

【0009】

本発明は上記の問題に対処し、そして詳細には、骨組織再生および骨修復のために適し、容易に使用でき、さらに骨に取り付けるための手段を必要としない新規の改良されたインプラントを提供する。骨の欠損もしくは間隙の骨組織再生は部分的である場合も完全である場合もある；後者については、本願のために骨修復術と表示する。

【0010】

詳細には、本発明は、骨組織再生のために適する生体吸収性プラグインプラントを開示するが、このときインプラントは第 1 部分と、および第 1 部分から外側に伸びる第 2 部分とを含み、第 1 および第 2 部分は膨張性材料から形成されている。

【0011】

本発明のプラグインプラントは、骨の欠損内へ挿入するために適する任意の形状を有していてよく、例えばプラグインプラントは円錐、切頭円錐、五面体、切頭五面体、および / またはマッシュルームのような形状であってよい。

【0012】

本発明のプラグインプラントの特定態様によると、第 1 部分は第 1 表面を含み、そして第 2 部分は第 1 表面とは反対側の第 2 表面を含み、第 1 表面は第 2 表面の面積より小さい面積を有する。本プラグインプラントの第 1 および第 2 表面は、円形、四角形もしくは長方形の形状を有してよい。第 1 および第 2 表面は平面であってよい。

【0013】

1 つの実施形態によると、本発明のプラグインプラントはテーパー形状を有する。

【0014】

また別の実施形態によると、本プラグインプラントは厚さ X を有する第 1 部分と、および厚さ Y を有する第 2 部分とを含み、X : Y の比率は 1 : 1 から 10 : 1 である。

【0015】

本発明のプラグインプラントは、親水性溶液、親水性液体および / または体液と接触すると膨張する材料から作製されている。

【0016】

膨張性材料は、多孔性材料から形成されてよい。

【0017】

本発明のプラグインプラントは、好ましくは生体吸収性ポリカプロラクトン (PLC) を含む膨張性材料から作製されてよい。例えば、20% TCP - PCL である。本プラグインプラントは、例えば熱溶解積層法 (Fused Deposition Mode ling : FDM) 技術を用いて 1 層ずつ PLC フィラメントを積層化するステップによって調製できる。

【0018】

本プラグインプラントの PLC フィラメント層は、0°、60° および / または 120°

10

20

30

40

50

°の方向付けを有してよい。

【0019】

さらにまた別の実施形態によると、本プラグインプラントはドレナージ用のカテーテルを配置および抜去するための開口部を含む。

【0020】

詳細には、本プラグインプラントは骨の欠損もしくは間隙内に挿入するために適しており、本プラグインプラントはプラグを骨の外面へ固定するための手段を必要としない。

【0021】

本プラグインプラントは、生物活性物質をさらに含んでよい。

【0022】

本発明は、骨組織再生のための方法であって、

生体吸収性プラグインプラントを提供するステップであって、インプラントが第1部分と、および第1部分から外側に伸びる第2部分とを含み、第1および第2部分が膨張性材料から形成されているステップと、

骨の欠損もしくは間隙内へ第2部分を挿入するステップであって、第1表面が欠損もしくは間隙の外側輪郭に係合するステップと、

プラグインプラントを体液と接触させ、それによりプラグが欠損もしくは間隙内へ適合するようにプラグインプラントのサイズを膨張させるステップとを含む方法をさらに提供する。

【0023】

本発明の方法では、本インプラントは相互に反対側の第1および第2表面を含んでいてよく、第1表面は第2表面の面積より小さい面積を有する。

【0024】

本発明の方法では、本プラグインプラントは、骨細胞がプラグインプラント内に進入して骨組織を再生させることを可能にするよう、多孔性材料から形成されてよい。

【0025】

本方法は任意の骨組織再生のために使用できる。例えば、本方法は頭蓋形成術を実施するための方法であってよい。

【0026】

本発明の方法では、本プラグインプラントは、プラグインプラントと骨欠損とが1mm未満、0.5mm未満、または0.2mm未満の初期公差を有するような方法で骨の欠損内へ挿入される。

【0027】

本発明による方法は、骨欠損を修復するための治療的処置のために使用できる、または望ましくない骨の間隙の美容上の修復のための非治療的処置のために使用できる。

【0028】

本方法は、骨組織再生および/または骨修復のために適用できる。

【発明を実施するための最良の形態】

【0029】

本明細書に言及した引用文献は、便宜上参考文献リストの形で列挙しており、実施例の最後に付け加えられている。そのような引用文献の全内容は、参照することにより本明細書に組み込まれる。

【0030】

本発明の1つの態様は、骨組織再生のために適合する生体吸収性プラグインプラントの構築に関する。骨の欠損もしくは間隙の骨組織再生は部分的である場合も完全である場合もある。後者については、本願のために骨修復術と表示する。

【0031】

骨組織再生のための生体吸収性プラグインプラントおよび方法は、任意のタイプの骨の欠損もしくは間隙に適用できる。本発明のプラグインプラントの特定の用途は、例えば頭蓋形成術である。

10

20

30

40

50

【 0 0 3 2 】

本発明によるインプラントは、プラグの形状を有する。本発明のために、骨組織再生および／または骨修復のために適合するプラグインプラントは、欠損もしくは間隙を充填するため、または楔もしくはストッパーとして機能するために使用される、例えば骨の穴のような骨の欠損もしくは間隙内へ実質的にぴったりと適合するインプラントであると規定する。本発明のために、欠損もしくは間隙は骨の窩洞を意味する。用語「欠損」は、疾患と見なすことができて治療的に処置する必要がある状態を意味するが、用語「間隙」は疾患ではなく美容上の目的で非治療的に処置できる状態を意味する。本発明のために、用語「バーホール」は一般に欠損および／または間隙を示すために使用する。本発明のプラグインプラントは「バープラグ」と呼ぶこともできる。それからプラグインプラントが作製される膨張性材料の構造は、さらにまた「スカフォールド」と表示することもできる。10

【 0 0 3 3 】

詳細には、本発明は骨組織再生のために適した生体吸収性プラグインプラントを開示するが、本インプラントは第1部分と、および第1部分から外側に伸びる第2部分とを含み、第1および第2部分は膨張性材料から形成されている。

【 0 0 3 4 】

本発明のプラグインプラントは骨の欠損内へ挿入するために適した任意の形状を有していてよく、例えば、本プラグインプラントは円錐、切頭円錐、五面体、切頭五面体、および／またはマッシュルームのような形状であってよい。

【 0 0 3 5 】

本発明のプラグインプラントの特定態様によると、第1部分は第1表面を含み、および第2部分は第1表面とは反対側の第2表面を含み、第1表面は第2表面の面積より小さい面積を有する。本プラグインプラントの第1および第2表面は、円形、四角形もしくは長方形の形状を有してよい。第1および第2表面は平面であってよい。20

【 0 0 3 6 】

本発明のプラグインプラントは、親水性溶液、親水性液体および／または体液と接触すると膨張する材料から作製されている。

【 0 0 3 7 】

図1は、バーホール(2)を含む頭蓋(1)ファントムを示しており、これは本発明のために欠損(2)もしくは間隙(2)であると識別することができる。30

【 0 0 3 8 】

本発明の1つの実施形態を示している図1を参照すると、本プラグインプラントは、第1部分(5)、および第1部分から外側に伸びる第2部分(4)を含む「マッシュルーム」(3)のような形状であってよく、第1および第2部分は膨張性材料から形成されている。しかし本発明のプラグインプラントはマッシュルームの形状には限定されず、骨の欠損内へ挿入するために適した任意の形状を有していてよく、例えば本プラグインプラントは円錐、切頭円錐、五面体、切頭五面体、および／またはマッシュルームのような形状であってよい。

【 0 0 3 9 】

より詳細には、図1に例示した実施形態では、第1部分(5)は第1表面(5)を含み、および第2部分(4)は第1表面とは反対側の第2表面(4)を含み、第1表面は第2表面の面積より小さい面積を有する。図1では、本プラグインプラントの第1および第2表面は、円形の形状を有する。第1および第2表面は平面を有する。しかし、形状は円形には限定されず、例えば、四角形もしくは長方形であってよい。同様に、表面は平面には限定されず、本発明のために適した任意の表面を有していてよく、例えば不整形、円錐形、鋭角形、または橢円形が本発明の範囲内に含まれてよい。40

【 0 0 4 0 】

第1および第2部分は、またそれらの厚さによって特徴付けることができる。詳細には、第1部分(5)は第1表面を含んでいて厚さXを有するが、他方第2部分(4)は第2表面を有していて厚さYを有しており、X:Yの比率は1:1から1:10である。より50

詳細には、図1では、X:Yの比率は11:4である。すなわち第1部分(5)は11層を含むが、他方第2部分(4)は4層を含む。層の数は、プラグインプラントの特定形状によって、ならびに骨、バーホール、およびヒトもしくは動物である患者の特定状態によって当業者により選択されてよい。特定実施例として、本プラグインプラントは、第2部分が1mmの厚さを有し、第1部分の厚さが3mmであるような方法で設計することができる。

【0041】

図2は、図1の実施形態の等角投影図である。より詳細には、図2は、生分解性ポリマー・フィラメントから形成された層状スカフォールド構造を示している。

【0042】

また別の実施形態によると、本発明のプラグインプラントはテーパー形状を有する、または骨の欠損内へ挿入するために適した任意の形状を有していてよく、例えば本プラグインプラントは円錐、切頭円錐、五面体、切頭五面体、および/またはマッシュルームのような形状であってよい。

【0043】

図2Aは、第1表面(50)を含む第1部分(50)と、第1表面とは反対側で第2表面(40)を含む第2部分(40)とを含むテーパー形状を有するプラグインプラントを示しており、第1表面(50)は第2表面(50)の面積より小さい面積を有する。第1部分(50)プラグインプラントは骨の欠損もしくは間隙内へ挿入されるが、他方第2部分(40)はプラグインプラントが骨窩洞内へ進入するのを回避して欠損もしくは間隙の輪郭に係合する。

【0044】

本プラグインプラントの第1および第2表面は、円形、四角形もしくは長方形の形状を有してよい。第1および第2表面は平面であってよい。

【0045】

図2Bは、図1および2の実施形態を示している。

【0046】

本発明による任意の実施形態によるプラグインプラントならびに第1および第2部分のサイズは、骨の欠損もしくは間隙のサイズによって当業者が選択することができる。例えば、本プラグインプラントは、第2部分が1mmの厚さを有し、第1部分の厚さが3mmであるような方法で設計することができる。本プラグインプラントは、例えば15mmの第1部分の直径および20mmの第2部分の直径を有してよい(図1および2を参照されたい)。

【0047】

親水性溶液、親水性液体および/または体液と接触すると膨張性である、または膨らむ材料(例えばポリカプロラクトン(PCL)である材料と組み合わせた本発明のプラグインプラントの特定形状は、そのプラグを骨へ取り付けるための手段を必要とせずに欠損もしくは間隙内へプラグを「スナップフィット」することを可能にする。

【0048】

このため本発明のプラグインプラントは、頭蓋形成術用のチタン製プレートの代わりに使用される、または米国特許第6,350,284号に記載されたインプラントのために必要であるスクリューのような取り付けのための手段を必要とせずに使用できる。したがって、本発明のプラグインプラントは、スクリューなどを骨表面へ取り付けるための挿入穴を必要としない。スクリューが存在しないことは、1つの重要な長所を意味する-それは可能な限り短時間でのバー・プラグの容易な配置を可能にする。

【0049】

より詳細には、骨の上(例えば、頭蓋上)のプラグインプラントと欠損もしくは間隙との間で1.0mm未満、0.5mm未満または0.2mm未満の初期公差は、「スナップフィット」設計が効果的に機能することを可能にする。大きな第2部分(「トップキャップ」)は、プラグインプラントが、その構造(例えば、頭蓋)の骨の厚さより過度に下方

10

20

30

40

50

へ間違って押し込まれず、骨の欠損もしくは間隙の輪郭位置にとどまることを保証する。

【0050】

さらにその上、膨張性材料は、多孔性材料から製造されてよい。例えば、20% T C P - P C Lである。より詳細には、60~70%の多孔性を備える20% T C P - P C Lである。好ましくは、65%の多孔性を備える20% T C P - P C Lである。これは、プラグインプラントが多孔性構造の弾性圧縮性のために欠損もしくは間隙の輪郭内へより良好に適合することを可能にする。米国特許第6,350,284号に記載された構造のような剛性構造がそのような能力を有していないことは理解されるであろう。本プラグインプラントのスカフォールドは、完全に相互接続した多孔性構造および約60~70%の多孔性を有してよい。この形態は、スカフォールドが身体内に植え込まれると細胞が捕捉されて増殖するのを可能にする(Huttmacher et al., 2001)。10

【0051】

図5AおよびBならびに図7は、本プラグインプラントがドレナージを実施するためのカテーテルを配置するための開口部(600、610)を含むまた別の実施形態を示している。この設計は、ドレナージ目的でスカフォールド内へある角度で挿入できるカテーテルの容易な配置および抜去を可能にする。

【0052】

本発明のプラグインプラントを構築するために適した当技術分野において公知の任意の生体吸収性材料を使用できる。例えば、任意の生体吸収性ポリマーまたはコポリマーを使用できる。詳細には、生体適合性であり、緩徐に分解し、そして骨細胞が付着して増殖するのを可能にすることが証明されている生体吸収性ポリカプロラクトン(PCL)ポリマーは、本発明のために特に適することが証明されている。細胞が発現する時間に伴って、それらは固有の細胞外基質を有するようになり、PCLが身体により再吸収かつ代謝されるにつれて骨様構造が生じる。熱溶解積層法(FDM)として公知のソリッドフリーフォーム・ファブリケーション技術を用いるT C P - P C L(20% w/v)ハイブリッドスカフォールドは、リン酸三カルシウム(TCP)をPCLと組み合わせて、(Dennis et al., 2003)の方法にしたがって調製することができる。より詳細には、60~7-%の多孔性、好ましくは65%の多孔性を備える20% T C P - P C Lを使用できる。最も重要なのは、コンピュータ制御FDMプロセスは、インビボ骨構造を模倣する適合する機械的強度を備える多孔性スカフォールドの設計および製作を可能にする。このアプローチは、ヒト組織工学の概念を含む。本プラグインプラントのスカフォールド設計は、当技術分野において公知の任意の方法にしたがって構築することができる。例えば、いわゆる「熱溶解積層法」(FDM)(Iwan Zeln et al., 2002)のような迅速なプロトタイピングプロセスによってPCLフィラメントを1層ずつ積層化するステップによって。フィラメントは、任意の適した方向付けにしたがって配置することができ、例えばPLCフィラメント層は、0°、60°および/または120°の方向付けを有してよい(例えば、図6A、B、Cを参照されたい)。2030

【0053】

PCLスカフォールドの設計および作製

生分解性ポリマーインプラントは、FDM迅速プロトタイピング技術(FDM 3D Modeler、Stratasys Inc.社製、ミネソタ州イーデンプレーリー)を用いて医用ポリカプロラクトン(PCL、粘度1.0~1.3；アラバマ州バーミングハム)から作製される。スカフォールドは、完全に相互接続した多孔性構造および約60~70%の多孔性を有している。生分解性ポリマーはTCP-PCLである。詳細には、三次元T C P - P C L(20:80%)である。より詳細には、60~70%の多孔性、好ましくは65%の多孔性を備える三次元20% T C P - P C Lである。この形態は、スカフォールドが身体内に植え込まれると細胞が捕捉されて増殖するのを可能にする(Huttmacher et al., 2001)。スカフォールド幾何モデルは、最初にUnigraphics CADソフトウェアで作製され、その後「.STLファイル」4050

オーマットのStratasys QuickSlice(商標)ソフトウェア内へ書き出された。層全体について、単一輪郭およびラスター・フィル・パターンが採用された。三角形の孔のパターンを形成するために0/60/120(のレイダウン・パターンを使用した(図6A、B、C)。FDM・フィラメントを生成する方法は当技術分野において公知である。

【0054】

細胞をスカフォールド上で培養することができる。1例として、間葉系幹細胞(MSC)を使用できる。骨電導性または骨誘導性のいずれかの特性を備える多孔性スカフォールド上に播種されたMSCを用いて骨欠損を修復するために極めて多数の研究が行われてきた。Caplan and Bruder(1997)は初めて、非常に多数の細胞が骨欠損内へ外科的に植え込まれる前にceremacicスカフォールド上で培養される技術を記載した。しかし、臨床的に有用であるためには、培養技術およびスカフォールド特性に関わる問題が克服されなければならない。より確実な石灰化および骨形成速度を達成するために培養中でMSCを拡張させるための改良された技術が最初に開発されなければならなかった。続いて、骨芽細胞内へ分化したMSCの二次元培養を用いた試験は、骨形成性開発の特徴的なパターンを解明し、骨芽細胞内へのMSCの転移を制御する1階層の事象を確立した(Nicole et al., 2003)。二次元培養に加えて、様々な三次元スカフォールド上で増殖したMSCはさらにまたエクスピボ分化および続いてインビボ骨形成へ極めて大きな影響を有する初期の播種密度に関しても研究してきた。その上、MSCの密な培養は分化および石灰化を増強することが証明されており、低密度培養に比較して高レベルのアルカリホスファターゼ(AP)活性を生じさせた。より良好な骨誘導性環境を達成するために、高度の細胞数を備える細胞シートはさらにまた三次元スカフォールドへも適用してきた。この細胞シートクラスター技術は、多数の状況においてヒト組織工学に対して有効であることが証明されている。第1に、皮膚および角膜を再建するための単細胞シートを移植するステップは、酵素的処置に比較してより大きな成功が得られることが証明されている(Kushida et al., 2001)。第2に、複数の細胞タイプを用いて複雑な組織を再構築するためには様々な複数の層の細胞シートを利用できる。この技術を用いて、血管は、インビボ移植術を保証するために十分な機械的強度を示す合成もしくは外生的生体物質を用いずに、ヒト細胞を培養するステップによって工学的に作製してきた(Nicolas, 1998)。最後に、数種のタイプの細胞シートを積層化するステップによって、肝臓、腎臓および血管器官を含む層状構造を作製できる(Shimizu et al., 2001)。

【0055】

さらに、本発明はさらにまた提供する。詳細には、本プラグイン・プラントは骨の欠損もしくは間隙内に挿入するために適しており、本プラグイン・プラントはプラグを骨の外面へ固定するための手段を必要としない。

【0056】

本プラグイン・プラントは、さらに生物活性物質を含んでもよい。

【0057】

本発明はさらに、骨組織再生のための方法であって、

生体吸収性プラグイン・プラントを提供するステップであって、インプラントが第1部分と、および第1部分から外側に伸びる第2部分とを含み、第1および第2部分が膨張性材料から形成されているステップと、

骨の欠損もしくは間隙内へ第2部分を挿入するステップであって、第1表面が欠損もしくは間隙の外側輪郭に係合するステップと、

プラグイン・プラントを体液と接触させ、それによりプラグが欠損もしくは間隙内へ適合するようにプラグイン・プラントのサイズを膨張させるステップとを含む方法を提供する。

【0058】

本発明の方法では、本インプラントは相互に反対側の第1および第2表面を含んでいて

10

20

30

40

50

よく、第1表面は第2表面の面積より小さい面積を有する。

【0059】

本発明の方法では、本プラグインプラントは、骨細胞がプラグインプラント内に進入して骨組織を再生させることを可能にするように、多孔性材料から形成されてよい。本プラグインプラントは、円錐、切頭円錐、五面体、切頭五面体、および／またはマッシュルームのような形状であってよい。例えば、第1および第2表面は平面を有してよい。さらに、第1および第2表面は、円形、四角形もしくは長方形の形状を有してよい。

【0060】

本発明の方法では、本プラグインプラントは、骨細胞がプラグインプラント内に進入して骨組織を再生させることを可能にするように、多孔性材料から形成されてよい。

10

【0061】

本発明の方法は、任意の種類の骨構造に対して骨組織再生および骨修復のために使用できるが、しかし本方法は頭蓋形成術を実施するために特に適する。

【0062】

本方法によると、本プラグインプラントおよび骨の欠損もしくは間隙は1mm未満の初期公差を有する。詳細には、初期公差は0.5mm未満である。好ましくは、初期公差は0.2mm未満である。

【0063】

本発明の方法は、ドレナージを実施するためにプラグインプラントの開口部内へカテーテルを配置するステップをさらに含んでよい。

20

【0064】

本発明の方法の特徴は、骨欠損内へのプラグインプラントの挿入が、欠損を取り囲んでいる骨の外面へプラグを固定するための手段を必要としないことである。

【0065】

本発明の方法は、ヒトを含む動物における欠損の骨組織再生および骨修復を行なうための治療方法であってよい。本方法は、さらにまた望ましくない骨の間隙を美容的に修復するための非治療方法であってよい。

【0066】

これまで本発明を一般的に記載してきたが、同様のことは例示によって提供され、本発明を限定することは意図していない以下の実施例を参照することにより容易に理解されるであろう。

30

【実施例1】

【0067】

前臨床試験の結果

国立大学病院（N U H）で患者10例に対して前臨床試験を実施した。本試験はシンガポールに所在するN U Hの国内・国際倫理審査委員会によって精査され、治験審査委員会によって承認された。適格患者は、慢性硬膜下血腫を有する患者である。彼らには、手術を受ける前に様々な選択肢について情報が与えられた。1例として、図8（左）は2つのバーホールのCTスキャンを示している。第3日に撮影された術後CTスキャンにより、F D M P C Lスカフォールド／細胞移植片が正位置に固定され、頭蓋の3D形状が良好に再構築されていることが明らかになった。質量効果または液体貯留は存在しなかった。P C Lの緩徐な分解動態は、安定性テンプレートを提供し、頭蓋の形状に適応する。腫脹は存在しなかった。植込み3ヶ月後という早期にインプラントは良好に組み込まれ、石灰化し始めていた（図8 b（右））。触知により、周囲頭蓋冠骨内のインプラントの安定性組込みが明らかになった。毛髪が欠損を被覆する皮膚上で増殖したのが観察された（図9 a、b）。美容上の効果は明白であり、患者に良好に受け入れられた。

40

【実施例2】

【0068】

骨形成を強化するために三次元T C P - P C Lスカフォールド内および周囲へ播種されたブタの骨間葉系幹細胞のインビトロおよびインビボ使用。

50

骨組織工学技術は、骨欠損を修復するための前途有望な技術として出現してきた。細胞培養と生分解性スカフォールドとの組み合わせを用いると、従来型の骨移植術に比較して優れた特性を備える構築物は、骨移植片置換物として移植のために適することが証明される可能性がある。本研究では、我々は三次元TCP-PCLスカフォールド(20%)上で自家間葉系幹細胞(PMSC)シートを培養し、それらの骨形成性分化ならびにヌードラットの皮下への移植後のインビポ骨形成について試験した。65%の多孔性を備える20%TCP-PCLから構成される構築物をPMSCのための三次元基質として使用し、8週間までインビトロで培養した。PMSC増殖は、代謝アッセイおよび共焦点イメージング法を用いて定期的間隔で評価した。骨誘導性培地中の8週間の培養後、PMSCは生育性を維持しており、スカフォールドの内側および外側の両方で石灰化結節を観察された。細胞内アルカリホスファターゼ(ALP)活性は誘導後に>50倍へ増加し、可溶性ALPは培養期間を通して増加し続けた。同様に、骨形成性関連転写産物であるostenix、オステオポンチン(OPN)、およびオステオカルシン(OCN)についてのmRNA発現は誘導後に4~10倍へ上昇したが、他方コアDNA結合因子1(Cbfα1)およびコラーゲンI型転写産物はわずかにアップレギュレートされた。タンパク質レベルでは、OCNは10倍へ増加したが、OPNレベルは2~4倍へ上昇した。ヌードラット内への移植後、マイクロCTおよびX線検査は4週間後に、構築物内で経時的に増加し続けた皮質骨ならびに海綿質骨を検出した。皮質骨のほとんどは構築物の周囲で検出され、海綿質骨は構築物の内側で検出された。組織学検査は、構築物の内側で形成された骨が播種されたPMSCのプールからの軟骨内骨化によって形成されたことを明らかにした。これらの所見は、PMSC細胞シート構築物がインビトロおよびインビポの両方で増殖かつ骨化し、骨形成性を試験するための有用な三次元モデルを提供することを証明している。さらに、臨床的骨修復のため、特別には荷重負担欠損のために、部位内へ移植するための前播種された骨細胞シートと一緒に用いて、エクスピボの生分解性スカフォールドとしてTCP-PCL構築物を使用する可能性が存在する。

【0069】

材料および方法：

スカフォールドの作製および特性付け

最近まで、スカフォールドを作製するためのPCL(Sigma社製、米国)の使用は非臨床用途に制限されていた。この技術を臨床用途へ適合させるために、我々は、同一の化学組成および特性を有する医用PCL(アラバマ州バーミングハム)へ切り替えた。医用PCL/CaPフレークは、FDM作製に先立って社内に構築された押出成形機を用いてフィラメント押出成形工程によって $01.70 \pm 0.10\text{ mm}$ のモノフィラメントへ調製した(図11および12)。Stratasys Inc社製のFDM迅速プロトタイピングシステムを使用して、 $40 \times 40 \times 4\text{ mm}$ (各々、長さ、幅および高さ)のバルク寸法を備えるスカフォールドを作製した。FDMの作動原理は他の場所で記載されている(Caplan et al., 1997)。

【0070】

スカフォールドの多孔性は、スカフォールドの真の体積とスカフォールドの見かけの体積との比率であると規定されている。真の体積はスカフォールドを作り上げる材料の体積であるが、他方見かけの体積はその中の空隙を含むスカフォールドの全体的な幾何学的体積である。スカフォールドの多孔性を他の場所で報告されたとおりに測定し、スカフォールドの形態および孔径を走査型電子顕微鏡(SEM)によって決定した。スカフォールドの表面をゴールドスパッタリングし、15kVの加速電圧を用いて試験した(Philips社製、XL30 FEG、オランダ)。

【0071】

圧縮試験は、1kNロードセルを用いてIXシリーズ自動材料試験機v.7.43システムソフトウェアによって作動するInstron 4302材料試験システムを用いて行われた。スカフォールドは、ASTM規格D695-96ガイドラインに準拠して試験された。試験片は、約0.6Nの歪みレベルまで1mm/分の速度で圧縮された。応力-

10

20

30

40

50

歪み(-)曲線を計算し、スカフォールドの圧縮剛性(ヤング率)および圧縮降伏強度を決定した。剛性は次に、任意のつま先領域(試験片の初期沈下)を無視して、曲線の最初の線状部分の勾配を規定することによって応力-歪み曲線から計算された。圧縮降伏強度を、(もしあれば)降伏点または線状領域の先端で採取した。

【0072】

材料の熱反応を試験してポリマーの分別晶出を決定するために、示差走査熱量法(DSC)を利用する熱分析を実施した。Perkin-Elmer社製の標準アルミニウム製パンおよびカバー内に保持した5~12mgの平均サンプル重量と一緒にPerkin-Elmer社製の熱流束Pyris 6 DSCを使用した。これらの試験片を、バージガスとして窒素を使用して、5 /分のランプ速度で20~80まで走査した。晶出分画は、100%結晶PCL¹に対して139.5J/gの融合値のエンタルピーに基づいて計算した[Pitt et al., 1981]。

【0073】

PCLの平均分子量を、ゲル透過クロマトグラフィー(GPC)装置を利用して高性能液体クロマトグラフィーによって決定した。PCLスカフォールドの切片を切除し、0.1%(1mg/mL)の濃度でテトラヒドロフラン(THF)中へ溶解させた。サンプル溶液をさらに0.2μmの無機膜フィルターに通して濾過し、示差屈折器(Waters 410)および吸光度検出屈折器(Waters 2690)を装備したGPCを用いてポリマー分子量分布を決定した。サンプルを、移動相としてTHFを用いて、1mL/分の流量でStyragelカラム屈折器に通して溶出させた。ポリスチレン標準物質(Polysciences)を使用して検量線を入手した。重量平均分子量(M_w)および数平均分子量(M_n)の両方を多分散性(M_w/M_n)と一緒に評価した。

【0074】

適切な場合は、95%の信頼水準($p < 0.05$)に設定したスチュードントのt検定を用いて統計的分析を実施した。

【0075】

細胞の単離および培養

ブタ間葉系幹細胞を、以前に報告されたとおりに単離して培養した(Hutmacher, et al., 2001)。適切な倫理的認可が与えられた後にシンガポール国立大学(NUS)の動物飼養課からブタ入手し、NUS動物実験審査委員会ガイドラインに準拠して骨髄サンプルを除去した。手短には、骨髄からMSCを吸引して勾配遠心分離にかけ、37および5%CO₂に設定した加湿環境内で、その後2%ファンギゾン(Sigma社製、米国ミズーリ州)および2%抗生物質(200μg/mLのペニシリンおよび200μg/mLのストレプトマイシン)を含有する、本明細書では標準培地と呼ぶダルベッコの変形イーグル培地(DMEM)低ブドウ糖(GIBCO、Invitrogen社製、米国カリフォルニア州)中において培養した。75cm²のフラスコに付き最初に 2×10^5 cellsの密度で細胞を播種した。全実験に対して、2~4継代の培養だけを使用した。コンフルエンス時に、細胞培地を、骨形成性分化(誘導)を誘導するために標準培地にL-アスコルビン酸-2-リン酸塩(50μg/mL)、-glycerophosphate(10mM)およびデキサメタゾン(100nM)(Sigma社製、米国)を加えたものからなる骨形成性培地に取り替えた。コントロール培養(非誘導)は標準培地中で維持した。全培地を2日毎に取り替えた。

【0076】

スカフォールドの作製および細胞の播種

各々0/60/120°のレイダウンパターンおよび65%の多孔性を備えるTCP-PCL(20:80%)スカフォールドを、我々の以前の方法(Hutmacher et al. 2001)にしたがって熱溶解積層法(FDM)によって作製した(図10、11および12)。TCP-PCLスカフォールドを4mm×5mm×5mmのブロックにカットし、スカフォールド表面の疎水性特性を改善するために1時間にわたり5M NaOHを用いて処置した。次にNaOH残渣を洗い流すために、PBSを用いてスカフォ

ールドを完全にすすぎ洗い、少なくとも30分間にわたり75% EtOH中へ浸漬し、風乾させた。次に標準培地中の細胞(20 μL中で 5×10^5)をスカフォールド内へ播種し、追加の培地を添加する前に37℃で2時間にわたり付着するに任せた。

【0077】

細胞シート - スカフォールドの構築

コンフルエント誘導(A群)および非誘導(B群)のMSCシート(25 cm²)を、無菌の纖細な鉗子を用いてフラスコから静かに剥がし、事前に播種したスカフォールドの上方に被覆し、1週間にわたり培養した。これらの構築物を次に3群に分けた：a) 誘導細胞シート - スカフォールド構築物；b) 非誘導構築物；8週間まで維持した；c) 2Dプレート。インビオ植込みのために、スカフォールドサイズは10 mm × 10 mm × 4 mmであり、100万個のMSCを用いて内側に播種し、次に細胞シートフォームを用いて75 cm²のフラスコを被覆した。植込みに使用した全細胞は、4週間にわたりインビトロで培養した。植込みは2群に分類した：a) 誘導；b) 非誘導シート - スカフォールド構築物。誘導構築物は、骨形成性プロセスを受けて、植込み前に石灰化を経験することが確認された。10

【0078】

細胞生育性およびファロイジン染色

細胞生育性を、二酢酸フルオレセイン(FDA)およびヨウ化プロピジウム(PI)(Molecular Probes Inc.社製、米国オレゴン州)の組合せを使用する生／死アッセイによって評価した。共焦点レーザー顕微鏡(CLM)(Leica社製、独国)を用いて、蛍光顕微鏡写真を各群から撮影した。FDA/PI処置の前に、培養ウェルから構築物を取り出し、PBS中ですすぎ洗いし、15分間にわたりPBS中で2 μg/mLのFDAと一緒に37℃でインキュベートした。非無菌PBSを用いて洗浄した後、試験片を次に室温で2分間にわたりPBS中の0.1 mg/mLヨウ化プロピジウム溶液中へ入れた。次にPBS中でこれらの試験片を再び洗浄し、顕微鏡のカバーガラス上に配置し、共焦点顕微鏡によって視認した。20

【0079】

細胞の標識およびAlamar blueアッセイ

MSCはcFDA(Molecular Probes社製)を用いて標識し、次にPBSを用いて洗浄し、植込み前に製造業者の取扱説明書にしたがって15分間かけて37℃で緑色蛍光を用いて標識した。30

【0080】

増殖率を決定するために、細胞 / スカフォールド構築物を含有する培養へ1 mLのAlamar blue(Probes社製、米国オレゴン州)(10%(v/v))を様々な時点に添加し、3時間インキュベートした。次にアッセイ培地を96ウェルプレートへ移し、マイクロプレートリーダー(Brand社製、米国カリフォルニア州)を用いて570 nmおよび600 nmでの吸光度を決定した。減少率は、製品の取扱説明書にしたがって計算した。

【0081】

アルカリホスファターゼ活性

p-ニトロフェニルホスフェート(製品番号104、Sigma社製)からのp-ニトロフェノール形成率を測定するステップに基づいて、反応速度アッセイを用いて細胞中アルカリホスファターゼ(AP)活性を決定した。手短には、培地を取り除き、プロテアーゼ阻害剤カクテル(Calbiochem社製、英国)を含有する氷温バッファー(5 mM MgCl₂、150 mM NaCl、1% トリトン-100、pH 7.5)を添加するステップによって細胞溶解液を調製した。次に12,000 × gで5分間遠心することによりタンパク質上清を収集し、タンパク質アッセイキット(製品番号500-0002、Bio-Rad社製)を用いてタンパク質含量を決定した。サンプル(20 μL)を50 μLのAP試薬と結合し、37℃で30分間インキュベートした後に96ウェルプレート内で活性を測定した。AP活性は、製品(Bio-Radマイクロプレートリーダー4050)

benchmark 10892、Bio-Rad社製、米国)の取扱説明書にしたがって405nmで読み取り、検量線との比較によって酵素の量を決定した。溶解液中のAP活性は、タンパク質1μgに付き1分当たり産生したp-ニトロフェノールのナノモル量として表示した。

【0082】

RNAの単離およびRT-PCR

Trizol試薬(Invitrogen Corp.社製、米国カリフォルニア州カールズバッド)を製造業者の提案にしたがって用いて、全細胞RNAを週1回抽出した。Superscript IIおよびOligo dT(Invitrogen Corp.社製、米国カリフォルニア州カールズバッド)を製造業者の取扱説明書にしたがって用いて、2μgの全RNAからcDNA合成を実施した。cbfa-1、osterix、コラーゲンI型、オステオポンチンおよびオステオカルシンの発現を、ABI Prism 7000配列検出装置およびProligo社(シンガポール)によって合成された特異的プライマーを用いるSYBR Green PCR Master Mix(Applied Biosystems社製、米国カリフォルニア州フォスター・シティ)を使用してリアルタイムPCRによって定量した。Applied Biosystems社製のPrimer express(登録商標)プログラムのバージョン2.0を用いてプライマー配列を設計し、全国バイオテクノロジー情報センター(NCBI)でそれらの特異性について突き止めた。PCRサイクル中にSYBR Greenの二本鎖DNAへの直接的結合によって惹起された蛍光の上昇を測定するステップを、PCR中の反応産物の上昇を監視した。反応混合物は、製造業者の取扱説明書にしたがって準備した。95での8分間のTaqポリメラーゼ活性化ステップに続いて、反応は95で30秒間にわたる変性ならびに60での1分間にわたるアニーリングおよび伸長(各プライマーについて同一)ならびに72で1分間にわたる延長によるサイクルを繰り返し、7分間にわたる72の最終伸長期間の前に35サイクル繰り返した。標的遺伝子CT値は相対発現単位(REU)として表示し、GAPDHに対して標準化した。反応産物をさらにpGEM-TEasyベクター(Promega社製)内へクローニングし、確認するためにシーケンシングした。

【0083】

ウェスタンプロット法

プロテアーゼ阻害剤(1mMのオルトバナジウム酸ナトリウム、10μg/mLのロイペプチド、1μg/mLのアプロチニンおよび1mM PMSF)を含有する氷温溶解バッファー(1%トリトンX100、150mM NaCl、10mM Tris pH 7.4、2mM EDTA、0.5% NP40、0.1% SDS)を用いるステップによって、細胞溶解液を調製した。タンパク質アッセイキット(Bio-Rad社製)を製造業者の提案にしたがって用いて、上清中のタンパク質濃度を決定した。細胞溶解液(40μg)を6~12% SDS-PAGE(ポリアクリルアミドゲル電気泳動法)ゲルによって分解させ、タンパク質をニトロセルロース膜(Amersham社製、英国バッキンガムシャー)へ移した。トリス緩衝食塩液(TBS)中で室温(RT)で1時間にわたり5%低脂肪牛乳を用いて非特異的結合を遮断した。膜を次にTBSを用いて2回洗浄し、4で一晩かけて0.1% Tweenを含むTBS(TBST)中で1:1000に希釈したマウス抗OCN(BioDesign社製、米国メイン州)、抗OPN(DSHB社製、米国アイオワ州)または抗アクチン(米国カリフォルニア州、サンタクラーズ)一次抗体のいずれかと一緒にインキュベートし、洗浄し、次にTBS中で1:1000に希釈した二次抗体と一緒に1時間インキュベートし、洗浄し、そして化学ルミネセンス(Supersignal west pico kit、Pierce社製、米国)によって発色させた。NICHHDの後援下で開発されたDevelopmental Studies Hybridoma BankからOPN抗体を入手し、アイオワ大学生物科学学科(アイオワ州アイオワシティー52242)によって維持された。

【0084】

10

20

30

30

40

50

von Kossaの組織化学および走査電子顕微鏡(SEM)検査

von Kossa組織化学検査結果を利用して、スカフォールド-細胞構築物全体の石灰化度を評価した。手短には、構築物をPBS中で洗浄し、4%パラホルムアルデヒド(Sigma社)を用いて固定し、超純水(UPW)を用いて洗浄した。切片(厚さ25μm)を、紫外線照射下で45分間にわたり1%AgNO₃(Sigma社製)を用いて処置し、UPWを用いて洗浄した。切片を次に8分間にわたり5%(w/v)炭酸ナトリウム溶液を用いて処置した; UPWを用いて再洗浄し、5%(w/v)チオ硫酸ナトリウム(Sigma社製)を用いて処置し、AxioVisionソフトウェア、バージョン3.1(Zeiss社製)を用いるデジタルカメラ(Axiocam; Zeiss社製)を装備した解剖顕微鏡(Zeiss社製、德国イエナ)を用いて骨結節を写真撮影した。

10

【0085】

SEM分析のために、スカフォールド-構築物中の細胞をカコジル酸バッファー中の3%glutaraldehyde中で固定した。固定した細胞を次に1%OsO₄(ProSciTech社製)中でインキュベートし、エタノールを用いて脱水した。構築物を次にヘキサメチルジシラザン(HMDS)(ProSciTech社製)中に包埋し、スパッタコーナー(Eiko社製、日本)を用いて白金被覆した。サンプルを次にXL30SEM(FEI Inc社製、米国オレゴン州)によって15Kvで試験した。

【0086】

組織学検査

20

ルーチンの組織学的分析のための試験片を3.7%ホルマリン(Sigma社製)中で固定し、tissue-tek(德国)中に包埋し、クライオミクロトーム(Leica社製)を用いて切片作製した。厚さ7μmの切片をポリ-L-リシン(Sigma社製)が前被覆されたスライド上に装填した。切片を次にヘマトキシリンおよびエオシンおよびニュートラルレッドを用いて染色した(Huttmacher, 2003)。

【0087】

マイクロCTスキャンおよびX線分析

SkyScan in vivo microtomograph 1076 μCTスキャナーを使用して、細胞/スカフォールド構築物中で生じる骨増殖を決定した。試験片を幅68mmのサンプルホルダー上に置き、構築物は高さおよび幅を走査平面に対して平行となるように配置した。1mmアルミニウムフィルターならびに0.8°の回転ステップおよび180°の回転角度と一緒に、5回の平均化を用いて、35μmの走査解像度を用いた。約500枚のスキャンスライスを撮影し、製造業者(SkyScan社)の提案にしたがって修正Feldkampアルゴリズムを用いて4°のステップサイズでファイルを再構築した。アウトプットは、後にMimics 7.3を用いて3Dスタックへ再構築した一連の120枚の連續1968×1968ピットマップ画像であった。Mimicsによって骨増殖の体積および表面積の計算が可能になった。体積および表面積の測定に加えて、細胞/スカフォールド構築物中の新規の骨増殖度についても閾値標準値に基づいて評価した。これらの標準物質(海綿質骨および皮質骨)を、Mimicsのプロファイリング機能を用いて新規に採取したブタの骨のサンプルから計算した。本研究で使用した計算閾値は、皮質骨に対しては68~1732HU(Housefield単位)および海綿質骨に対しては-70から67HUであった。

30

【0088】

慣習的X線分析として、Mammomat 3000(Siemens社製)X線装置を使用してサンプルを分析した。イメージング中に使用した電圧および電流を、最上の明瞭さおよび解像度を達成するために調整した。

40

【0089】

異所性植込み

動物を使用する研究のプロトコールは、シンガポール国立大学(NUS)動物使用倫理委員会(小動物実験プロトコールNIDCR 00-113)によって審査され、承認さ

50

れた。最初は Harlan Sprague Dawley (インディアナ州インディアナポリス) から入手したヌードラット mu / rnu を飼育し、特別な病原体を含まない条件で NUS 動物飼養施設 (ニューヨーク州バッファロー) で維持した。すべての動物の取扱いは層流フード内で実施した。細胞 / スカフォールド構築物 (動物 1 匹に付き 2 片の誘導構築物および 2 片の非誘導構築物) を、体重が 110 ~ 130 g の 3 ~ 4 月齢の免疫不全ラットの背面の皮下へ移植した。移植 4、8 および 12 週間後に移植片を回収し、4 % ホルマリン中で固定し、製造業者の提案にしたがって、パラフィン包埋のために 10 % EDTA (pH 8.0) 中で脱灰するか、または 70 % エタノール中で固定して樹脂 (Technovit 8100、Kulzer 社製、独国) 中に包埋された Technovit 8100 中に樹脂包埋した。パラフィン切片 (10 μm) を脱パラフィンし、水和させ、ヘマトキシリンおよびエオシン (H & E) を用いて染色した。プラスチック切片を、H & E および von Kossa 染色を用いて処理した。インビボでの新規骨形成を定量するために、N I H 画像を使用して誘導移植片または 2 片の非誘導移植片のどちらから 5 × の倍率で 5 力所の代表的な面積を計算した。

【0090】

統計的解析

全数値は平均値 ± 標準偏差として表示した。全データに二方向 ANOVA および Bonferroni 事後試験およびペアワイズ比較 (SPSS バージョン 11.02) を受けさせた。有意水準は $p < 0.05$ へ設定した。データは、同一条件下で実施した 3 回の繰返しの平均値であった。

【0091】

結果

スカフォールド上の MSC の増殖

スカフォールド上に播種して被覆した MSC の付着および生育性を様々な時点に評価した。3 日間の培養後に、MSC はスカフォールドのバー上に付着し、pholloid 染色は MSC によって形成されて細胞 - スカフォールドの接触点上に蓄積したアクチン線維を可視化した。3 週間後、スカフォールドのバーは MSC によって十分に被覆され、細胞はスカフォールドの表面上に均等に広がっていた (図 13)。1 週間後のスカフォールドの内側の細胞については、MSC は ECM の産生によってスカフォールドの孔の上方にブリッジを形成した (図 14 A)。これからは 5 週間後に、孔の大多数は細胞および ECM によって充填され、ほんの少数の死細胞しか観察されなかった (図 14 B)。スカフォールド上に被覆された細胞シートは ECM を形成し、8 週間までは生存可能に染色した。図 15 A、B の SEM 画像は、コラーゲン纖維が MSC によって形成されたことを明らかにした。スカフォールドおよび細胞層の表面上に形成されたシートは、骨形成性誘導後に構築物の内側で形成された (図 16 A、B)。誘導構築物中で形成された石灰結節は、von Kossa 染色によって最初に 3 週間後に検出された (図 17 A、B)。

【0092】

様々な時点での構築物の代謝率は、図 18 に示したように alamar blue 色素転換率を用いて測定された。骨形成性誘導下での構築物の減少率は、誘導をしていない構築物の減少率よりわずかに高かった。構築物の減少率は第 2 週には増加し、7 週間までは安定性のままであった。プレート上で培養した細胞については、この比率は細胞シート - スカフォールド構築物より高かった。しかし、2 つの培養システムは相違する基層および播種密度を有していたので、比較するのは困難である。

【0093】

ALPase 活性

インビトロで構築物の骨形成性能力を定量するために、細胞外および細胞内 ALPase 活性を監視した。図 19 は、培地中へ放出された ALP が誘導後の培養時間に伴って増加したことを示している。49 日間で、誘導構築物の ALPase 活性は非誘導構築物に比して 10 倍であった。細胞内 ALPase について、その活性は 1 週間後には 30 倍以上へ急激に増加し、3 週間後にピーク値に達した (図 20)。そのレベルは 8 週間後まで

全培養期間にわたりそのままであった。

【0094】

骨関連バイオマーカーの発現

インビトロでの構築物の骨形成性分化プロセスを確証するために、構築物のRNAを抽出し、骨関連分子の時間的発現レベル、つまり2種の重要な転写因子であるCbfα1およびosterrix、オステオカルシン(OCN)、オステオポンチン(OPN)ならびにコラーゲンI型(Col I)を監視するためにRT-PCRを適用した(図21)。図22は、osterrixおよびocn発現レベルが誘導後には少なくとも各々10および5倍へ有意にアップレギュレートされ、培養期間にわたり高レベルで維持されたことを示している。OPN発現レベルも同様にアップレギュレートされ、cbfα1およびCol Iのレベルは誘導構築物中でわずかに上昇した。骨形成における所定の重要な分子をさらに確証するために、OCNおよびOPNタンパク質合成についてもウェスタンプロットにより測定した(図23、24)。図24に示したように、OCNは誘導構築物中では特異的に発現し、その発現は7週間にわたる培養中に安定性のままであった。OPN発現は3週間後にはほぼ3~4倍に増加し、その後はわずかに減少した。

【0095】

インビオでの骨形成

組換え作製された構築物の骨形成能力を検証するために、誘導および非誘導構築物をマウスドラット内へ植え込み、4、8、12週間後に取り出した(図25、26)。図27A、B、CにおけるX線画像は、誘導構築物中で骨形成が生じたことを示している。図8は、皮質骨および海綿質骨の両方が構築物中で形成されたことを証明している。マイクロCTスキャンを通すと、皮質骨は主として構築物の外側で形成され、海綿質骨は構築物の内側で形成された。構築物の内側で形成された骨の体積および表面積は、植込み後時間の経過に伴って減少した(図28、29A、B)。植え込まれた細胞が骨形成に及ぼす寄与を決定するために、我々は植え込んだ細胞をCFDA標識した。図30A、Bは、主として骨領域内に存在する蛍光性細胞を示しており、これは大多数の骨芽細胞が植え込まれた細胞に由来することを示していた。図31A、B、CにおけるH/E染色は、構築物中のMSCが軟骨細胞と骨領域との界面で成長板様構造と組織学的に似ていることを表示した。これは、構築物内のMSCが軟骨内骨形成プロセスを経験したことを証明している。

【0096】

考察

本研究では、我々は、インビトロおよびインビオでPMSCのシート・スカフォールド構築物のハイブリッドの骨形成について試験した。インビトロ試験結果は、構築物中のMSCが、骨関連タンパク質であるALPのアップレギュレーションを用いた骨形成性誘導後に増殖して骨芽細胞へ分化できることを証明している。インビオ試験データは、マウスドラットにおける植込み4週間後に全構築物が皮質骨および海綿質骨の両方を形成することを証明した。それは、TCP-PCLスカフォールドを用いたMSCシート組込みのこの実験における新規概念が骨組織工学技術において機能できることを意味している。遺伝子組換え構築物は、特に荷重負担領域における骨置換物の候補となるであろうが、これは実験におけるスカフォールドが以前に報告された主としてポリマー・フォームもしくはシートであったスカフォールドより高度の機械的力を維持することができるからである。

【0097】

引用文献

【表1】

- Broaddus WC, Holloway KL, Winters CJ, Bullock MR, Graham RS, Mathern
5 BE, Ward JD, Young HF. Titanium miniplates or stainless steel wire for cranial
fixation: a prospective randomized comparison. *J Neurosurg.* 2002
Feb;96(2):244-7.
- Bruijn JD de, van Blitterswijk CA, Davies JE. Initial bone-matrix formation at
the hydroxyapatite interface in vivo. *J Biomed Mater Res* 1995; **29**: 89. 10
- 10 Caplan AI, Bruder SP. In : Lanza RP, Langer R, Chick WL(eds), *Cell and
molecular engineering of bone regeneration : Principles of tissue engineering*,
Academic Press: New York, 1997.p.603-18.
- Dennis Rohner, Dietmar W.Hutmacher, Tan Kim Cheng, Martin Oberholzer,
Beat Hammer; *In vivo efficacy of bone-marrow-coated polycaprolactone
15 scaffolds for the reconstruction of orbital defects in the pig*; *J Biomed Mater
Res Part B: Appl Biomater* 66B: 574-580, 2003. 20
- Dennis JE, Haynesworth SE, Young RG, Caplan AI. Osteogenesis in marrow-
derived mesenchymal cell porous ceramic composites transplanted
subcutaneously: effect of fibronectin and laminin on cell retention and rate of
20 osteogenic expression. *Cell Transplant* 1992; **1**: 23-30.
- Du C, Cui FZ, Zhu XD, de Groot K. Three-dimensional nano-HAp/collagen
matrix loading with osteogenic cells in organ culture. *J Biomed Mater Res*
1999; **44**: 407-414. 30
- Ducy P, Ruiz H, Valerie G, Amy LR, Gerard K; Osf2/Cbfa1: a transcriptional
activator of osteoblast differentiation; 1997, *Cell*, 89:747-54.
- Dujovny M, Dujovny N, Vinas F, Park HK, Lopez F. Burr hole cover for
ventriculoperitoneal shunts and ventriculostomy: technical note. *Neurol Res.*
2002 Jul;24(5):483-4.

【表2】

- Emonds N, Hassler WE. New device to treat chronic subdural hematoma--hollow screw. *Neurol Res.* 1999 Jan;21(1):77-8.
- Habal MB, Pietrzak WS. Key points in the fixation of the craniofacial skeleton with absorbable biomaterial. *J Craniofac Surg.* 1999 Nov;10(6):491-9.
- 5 Huttmacher DW, Scaffold design and fabrication technologies for engineering tissues--state of the art and future perspectives. *J Biomater Sci Polym Ed.* 2001;12(1):107-24. 10
- Huttmacher DW, Schantz T, Zein I, Ng KW, Teoh SH, Tan KC, Mechanical properties and cell cultural response of polycaprolactone scaffolds designed 10 and fabricated via fused deposition modeling. *J Biomed Mater Res.* 2001 May;55(2):203-16.
- Kobayashi S, Hara H, Okudera H, Takemae T, Sugita K. Usefulness of ceramic implants in neurosurgery. *Neurosurgery.* 1987 Nov;21(5):751-5. 20
- Koyama J, Hongo K, Iwashita T, Kobayashi S. A newly designed key-hole button. *J Neurosurg.* 2000 Sep;93(3):506-8.
- Kushida A, M. Yamato, A. Kikuchi and T. Okano, Two-dimensional manipulation of differentiated Madin-Darby canine kidney (MDCK) cell sheets: the noninvasive harvest from temperature-responsive culture dishes and transfer to other surfaces. *J Biomed Mater Res* **54** (2001), pp. 37-46
- 20 Linda G, Gail N, Tissue engineering- Current challenges and expanding opportunities; *Science*; 2002, 295: 1009-1012 30
- Matsumoto K, Kohmura E, Kato A, Hayakawa T. Restoration of small bone defects at craniotomy using autologous bone dust and fibrin glue. *Surg Neurol.* 1998 Oct;50(4):344-6.
- 25 Mikos AG, Sarakinos G, Leite SM, Vacanti JP, Langer R. Laminated three-dimensional biodegradable forms for use in tissue engineering. *Biomaterials* 1993; **14**: 323-330 40

【表3】

- Miyake H, Ohta T, Tanaka H. A new technique for cranioplasty with L-shaped titanium plates and combination ceramic implants composed of hydroxyapatite and tricalcium phosphate (Ceratite). *Neurosurgery*. 2000 Feb;46(2):414-8.
- 5 Nakashima K, Zhou X, Kunkel G, Zhang Z, Deng JM, Behringer RR, de Crombrugghe B. The novel zinc finger-containing transcription factor osterix is required for osteoblast differentiation and bone formation. *Cell*. 2002 Jan 11;108(1):17-29. 10
- Nicolas L'heureux, Stéphanie Pâquet, Raymond Labbé, Lucie Germain, and 10 François A. Auger; A completely biological tissue-engineered human blood vessel ; *FASEB J*. 12, 47–56 (1998).
- Nicole Izur Nieden, Grazyna Kempka, Hans J Ahr, In vitro differentiation of embryonic stem cells into mineralized osteoblasts; *Differentiation*, 2003, 71: 20 18-27.
- 15 Pitt CG, Gratzl MM, Kimmel GL, Surles J, Schindler A. Aliphatic polyesters II. The degradation of poly (DL-lactide), poly (epsilon-caprolactone), and their copolymers in vivo. *Biomaterials*. 1981, 2(4): 215-220.
- Rochet N, Loubat A, Laugier JP, Hofman P, Bouler JM et al., Modification of gene expression induced in human osteogenic and osteosarcoma cells by 20 culture on a biphasic calcium phosphate bone substitutes. *Bone*, 2003, 32: 602-10. 30
- Schantz J-T, Teoh SH, Lim TC, Endres M, Lam CXF, Hutmacher DW, Repair of Calvarial Defects with Customised Tissue-Engineered Bone Grafts. Part I: Evaluation of Osteogenesis in a 3D Culture System, *Tissue Engineering* 9 25 (Sup 1) (2003a): S113-S126.
- Schantz J-T., Hutmacher DW, Lam CXF, Brinkmann M, Wong KM, Lim TC, Chou N, Gulberg RE and Teoh SH, Repair of Calvarial Defects with Customised Tissue-Engineered Bone Grafts. Part II: Evaluation of cellular 40

【表4】

- efficiency and efficacy in vivo, *Tissue Engineering* 9 (Sup 1) (2003b): S127-S139.
- Shimizu T, M. Yamato, A. Kikuchi and T. Okano, Two-dimensional manipulation of cardiac myocyte sheets utilizing temperature-responsive culture dishes augments the pulsatile amplitude. *Tissue Eng* 7 (2001), pp. 141–151. 10
- Stendel R, Krischek B, Pietila TA. Biodegradable implants in neurosurgery. *Acta Neurochir (Wien)*. 2001;143(3):237-43.
- Tessier P. Autogeneous bone grafts taken from the calvarium for facial and cranial applications. *Clin Plast Surg*. 9: 531. 1982. 10
- Toshimasa u, et al; Transplantation of cultured bone cells using combinations of scaffolds and culture techniques; *Biomaterials*; 2003, 24:2277-86.
- Winkler PA, Herzog C, Weiler C, Krishnan KG. Foreign-body reaction to silastic burr-hole covers with seroma formation: case report and review of the literature. *Pathol Res Pract*. 2000;196(1):61-6. 20
- Yamashima T Cranioplasty with hydroxylapatite ceramic plates that can easily be trimmed during surgery. A preliminary report. *Acta Neurochir (Wien)*. 1989;96(3-4):149-53.
- Yamashina T. Modern cranioplasty with hydroxyapatite button, granules and plates. *Neurosurgery*. 1993 Nov;33(5):939-40 30
- Iwan Zein, Dietmar W. Hutmacher, Kim Cheng Tan, Swee Hin Teoh. Fused deposition modeling of novel scaffold architectures for tissue engineering applications: *Biomaterials* 23 (2002) 1169-1185

【図面の簡単な説明】

【0098】

【図1】ファントム頭蓋（1）についてのドレナージ／洗浄および神経学検査のために作製された典型的なバーホールもしくは欠損（2）を示した図である。 40

【図2】ケース1のバー・プラグ（3）設計の正投影図である。プラグイン・プラント（3）は、第1もしくは上方表面（5）および第2もしくは下方表面（4）を含む。

【図3】図2のケース1のバー・プラグ（2）設計の等角投影図である。

【図4A】プラグイン・プラント（30）の第1もしくは下方表面（50）が骨の欠損内へ挿入され、プラグイン・プラントがテー・バー形状を有する実施形態を示した図である。

【図4B】図2および3の実施形態を示した図である。

【図5】ドレナージ用カテーテルを挿入および／または抜去するための開口部をさらに含む、図4a、bの実施形態を示した図である。

【図6】バー・プラグ設計におけるPCLフィラメントの0/60/120°の層方向付けを示した図である。（a）PCLフィラメント層の0°の方向付け；（b）PCLフィラ 50

メント層の60°の方向付け；(c) PCLフィラメント層の120°の方向付け。

【図7】カテーテルの容易な配置および抜去を可能にするケース2のセンターホール・バー・プラグ設計の正投影および等角投影図である。

【図8】2つのバー・ホールを示している術後1週間のCTを示した図である(左)；ヒト被験者において、術後3ヶ月にはインプラントは良好に組み込まれ、石灰化し始めた(右)。

【図9】欠損を被覆する皮膚上で毛髪が生長しているのを示している患者2例の術後写真である。

【図10】20%TPC-PCLスカフォールドの構造を示した図である。空TPC-PCLスカフォールドのSEMは、孔径400～600μmの相互接続孔を明らかにした。
10

【図11】シート・スカフォールドの構造を示した図である。

【図12】シート・スカフォールドの構造を示した図である。

【図13】3週間後のインビトロ培養の細胞付着(ファロイジン染色)(200×)。

【図14】細胞増殖(内側のFDA-PI染色)。A)インビトロの1週間後(100×)。B)インビトロの5週間後(200×)。

【図15】細胞シート・スカフォールドの構造。写真(A)(上面図)および(B)(側面図)は、スカフォールドを被覆している細胞シートおよび誘導下でのインビトロ培養の3週間後に形成されたコラーゲン纖維を示している。

【図16】細胞シート・スカフォールドの構造(スカフォールドの内側)。A)は側面図、およびB)は上面図である。
20

【図17】構築物のvon Kossa染色。写真(A)(100×)および(B)(400×)は、誘導5週間後の、スカフォールド内に形成された石灰結節を示している。

【図18】Alamar blueアッセイ。

【図19】細胞シート・スカフォールド構築物の細胞内ALPase活性。

【図20】ELISAによる、培地中へ放出されたALPase。

【図21】RT-PCRアッセイ。インビトロRT-PCRプロフィールは、シート・スカフォールド構築物のostrix、オステオカルシンおよびオステオポンチンmRNA発現レベルは誘導後に有意に上昇したが、コラーゲンI型およびCbfa1発現レベルはわずかしか上昇しないことを証明している。
30

【図22】ostrixおよびオステオカルシンの発現レベルについてのRT-PCRアッセイ。ostrixおよびオステオカルシンの発現レベルは、骨形成性誘導後に10～5倍へアップレギュレートされる。データは、PCR生成物の密度にしたがって計算した。

【図23】タンパク質プロフィールは、シート・スカフォールド構築物中のオステオカルシンが骨形成性誘導後に特に観察され、そしてオステオポンチン発現レベルが誘導後に4～5倍へ急激にアップレギュレートされることを示している。

【図24】タンパク質プロフィールは、シート・スカフォールド構築物中のオステオカルシンが骨形成性誘導後に特に観察され、そしてオステオポンチン発現レベルが誘導後に4～5倍へ急激にアップレギュレートされることを示している。
40

【図25】シート・スカフォールド構築物の植込み。

【図26】シート・スカフォールド構築物のインビボ実験の4週間後(A)および8週間後(B)。

【図27】軟X線写真。25KV、6.3MasでX線によって可視化した骨形成。(A)ヌードラットにおける植込み4週間後。(B)8週間後。(C)12週間後。骨は主としてスカフォールドの周囲に形成された。

【図28】皮質骨形成のマイクロCT分析。植え込まれたシート・スカフォールド構築物によって形成された骨の体積および面積はどちらも経時的に減少した。

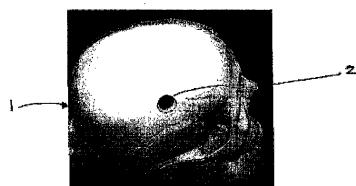
【図29】植込みの4週間後(A)および8週間後(B)のサンプルの組織学検査(ニュートラルレッド染色)。組織学検査データは、骨が主としてスカフォールドの表面上に形
50

成され；線維組織はスカフォールドの内側に形成されたことを示している。

【図30】植込み8週間後のH/E染色。H/E染色は、一部の軟骨細胞様細胞が骨組織下で観察されたので、シート・スカフォールドの骨形成が軟骨内プロセスを経験する可能性があることを示している。(A)25×;(B)100×;および(C)400×。

【図31】蛍光標識細胞は骨を形成した。(A)4週間後;(B)8週間後。どちらも400×。新しく形成された骨組織の大半は、緑色蛍光標識PMSCから構成された。

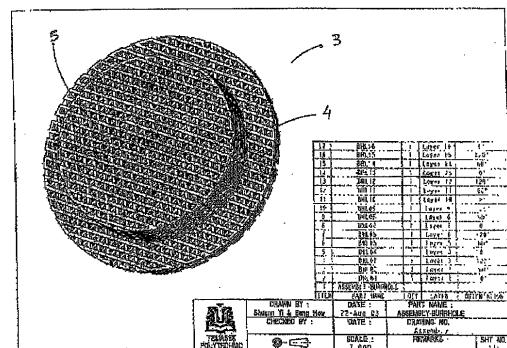
【図1】



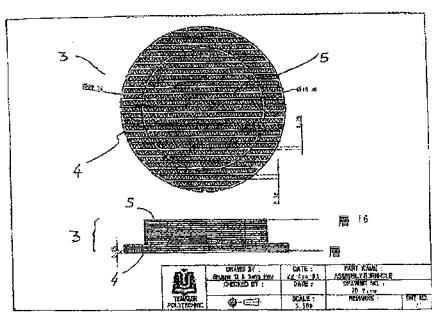
【 図 2 】

FIGURE 2

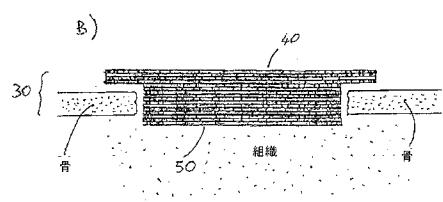
〔 3 〕



【図4A】



【図 4 B】



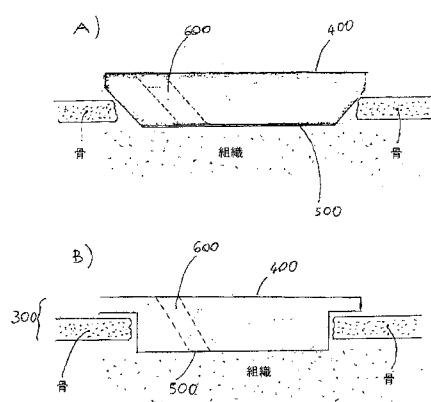
【図 6】

FIGURE 6 (a, b, c)



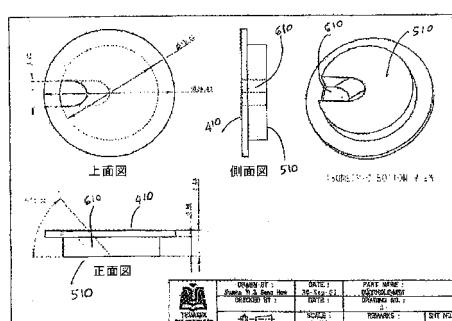
【図 5】

FIGURE 5 (A, B)



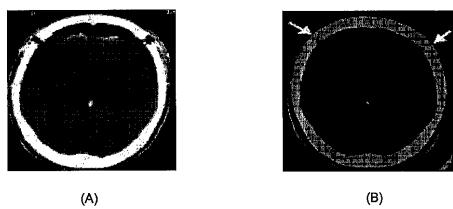
【図 7】

FIGURE 7



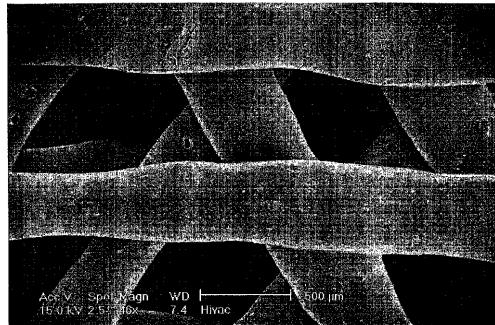
【図 8】

FIGURE 8 (A, B)



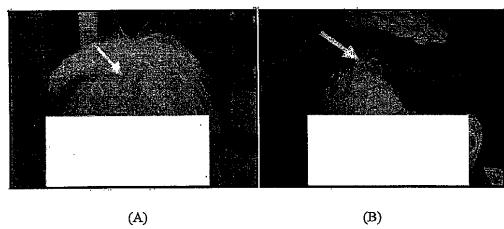
【図 10】

FIGURE 10

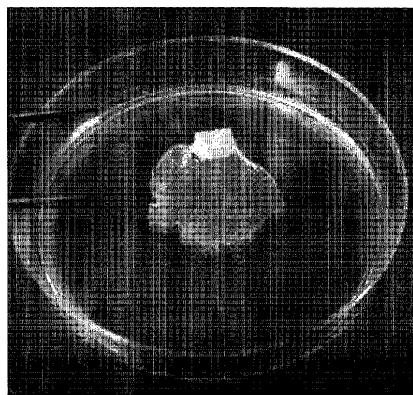


【図 9】

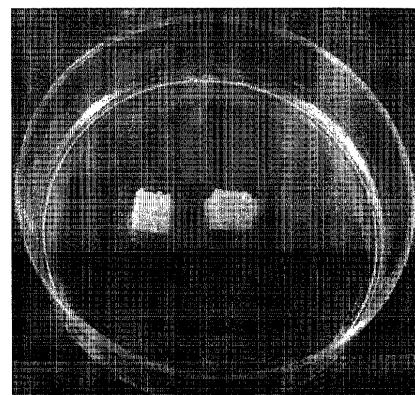
FIGURE 9 (A, B)



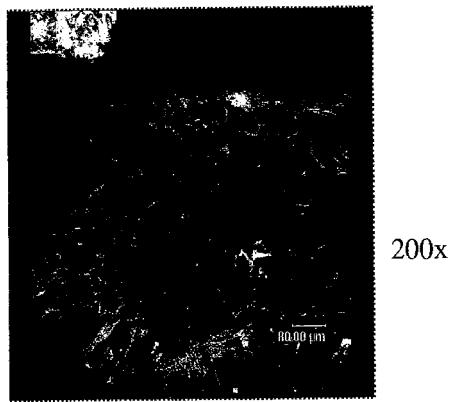
【図 1 1】
FIGURE 11



【図 1 2】
FIGURE 12

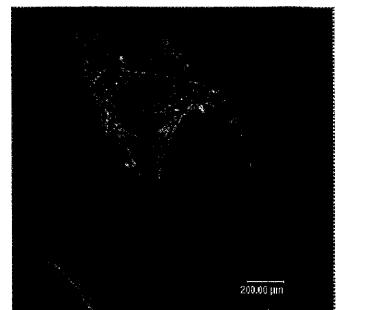


【図 1 3】
FIGURE 13

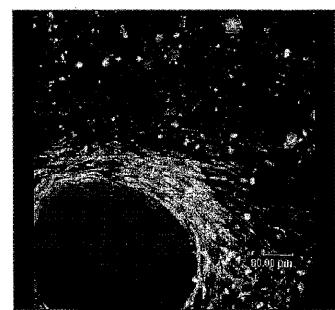


インビトロ培養 3週間後

【図 1 4】
FIGURE 14 (A, B)



100x (A)



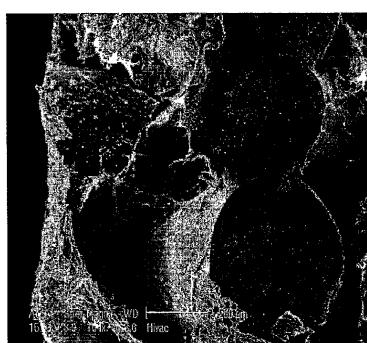
200x (B)

【図15】

FIGURE 15 (A, B)



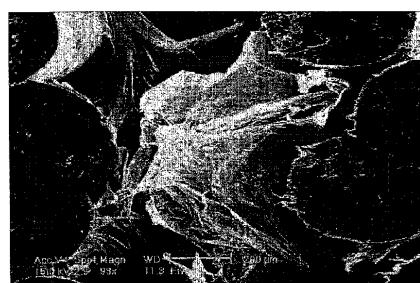
(A)



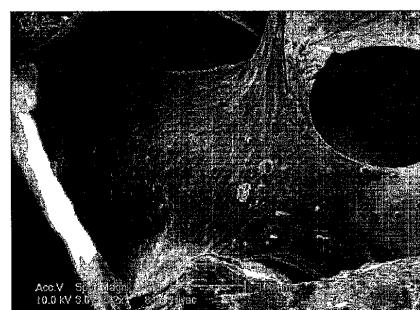
(B)

【図16】

FIGURE 16 (A, B)



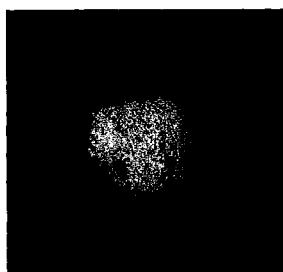
(A)



(B)

【図17】

FIGURE 17 (A, B)



5週間後 100X

(A)

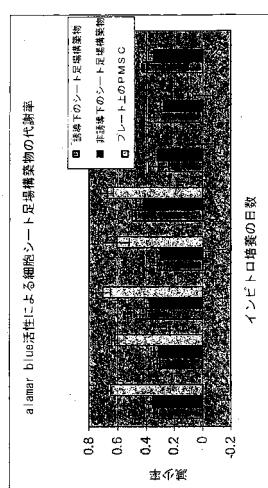


400X

(B)

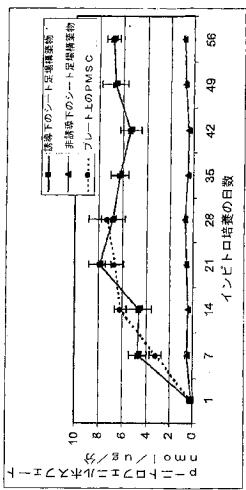
【図18】

FIGURE 18



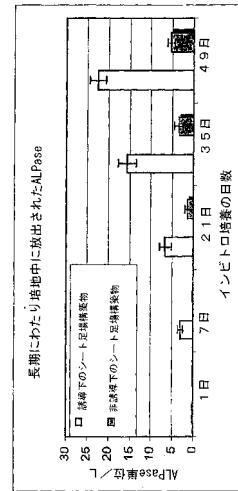
【図19】

FIGURE 19
細胞シート足場構築物の細胞内ALPase活性



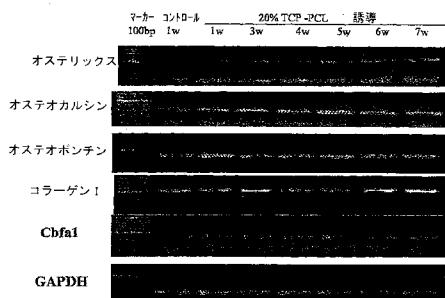
【図20】

FIGURE 20



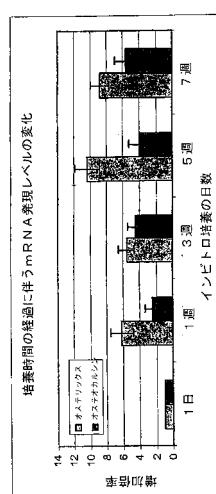
【図21】

FIGURE 21



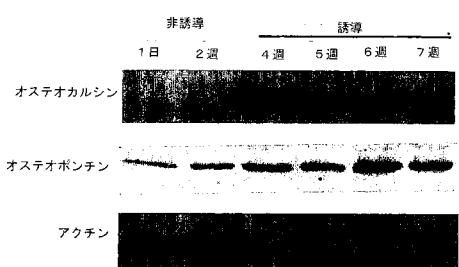
【図22】

FIGURE 22



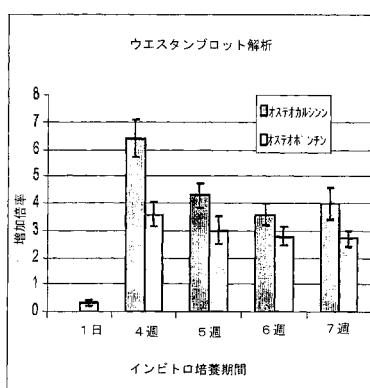
【図23】

FIGURE 23



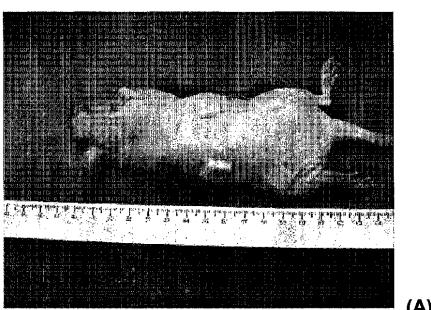
【図24】

FIGURE 24



【図25】

FIGURE 25 (A, B)

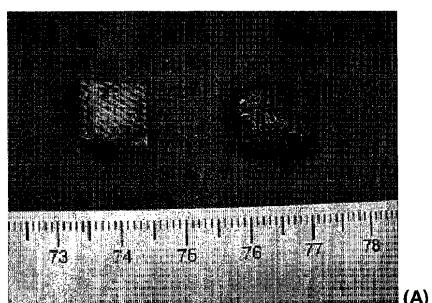


(A)

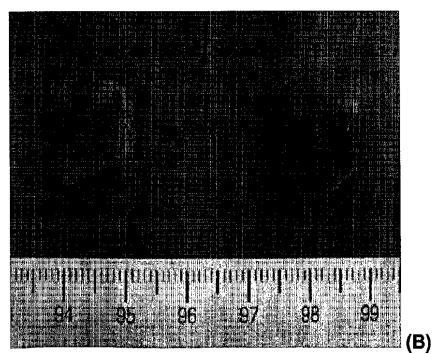
(B)

【図26】

FIGURE 26 (A, B)



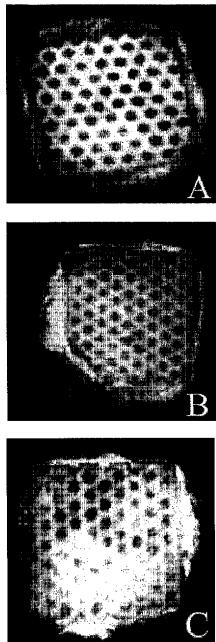
(A)



(B)

【図27】

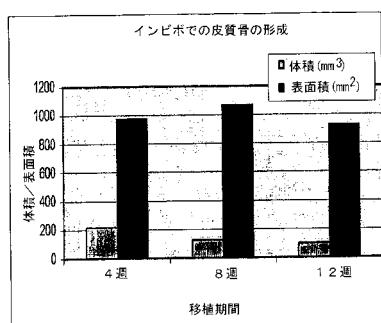
FIGURE 27 (A, B, C)



C

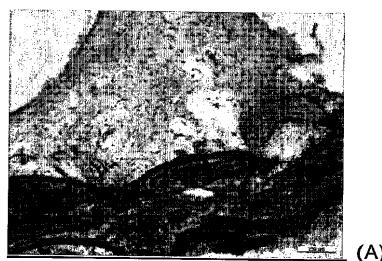
【図28】

FIGURE 28

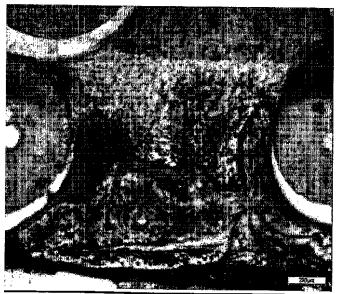


【図29】

FIGURE 29 (A, B)



(A)



(B)

【図30】

FIGURE 30 (C)

(図30 Aから)



(C)

FIGURE 30 (A, B)

(A)



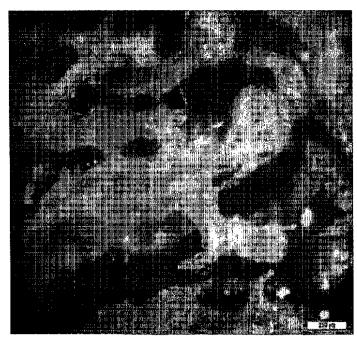
(B)



【図31】
FIGURE 31 (A, B)



(A)



(B)

フロントページの続き

(74)代理人 100125380
弁理士 中村 綾子

(72)発明者 テオ, スウェー・ヒン
シンガポール国, シンガポール 596504, トーキー・ロード 22

(72)発明者 タン, キム・チェン
シンガポール国, シンガポール 524856, ブロック 856ディー, タンパインズ・ストリート 82, #12-180

(72)発明者 フートマッハ, ディートマー
シンガポール国, シンガポール 596739, トータック・ロード 48, シグネチャー・パーク #03-07

(72)発明者 リム, ティアム・チャイ
シンガポール国, シンガポール 588996, ジャラン・アナク・ブキット 1, シャーウッド・タワー #08-01

(72)発明者 シャンツ, ヤン トルステン
シンガポール国, シンガポール 598739, イリューム・アヴェニュー 43, シンフォニー・ハイツ #08-01

(72)発明者 チョウ, ニン
シンガポール国, シンガポール 309810, ボー・セン・アヴェニュー 18

審査官 福井 悟

(56)参考文献 実開平03-126113(JP, U)
特開平05-237137(JP, A)
特開平09-290026(JP, A)
実公平06-003611(JP, Y2)
実開平05-084306(JP, U)
国際公開第03/087444(WO, A1)
Tissue Engineering, 2003年, Vol.9, Suppl.1, p.S103-S112
Tissue Engineering, 2003年, Vol.9, Suppl.1, p.S113-S126
Legacy content of Tissue Engineering, Mary Ann Liebert, Inc., 2011年 3月 9日,
URL, <http://www.liebertonline.com/ten>
Tissue Engineering, 2003年, Vol.9, Suppl.1, p.S127-S139
Biomaterials, 2002年, Vol.23, p.1169-1185
Journal of Biomedical Materials Research, 2001年, Vol.55, p.203-216
Biomaterials, 2003年, Vol.24, p.3815-3824
Journal of Biomaterials Science Polymer Edition, 2001年, Vol.1, p.107-124

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

A61L 15/00-33/18
A61F 2/00-2/94
JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamII)
CA/BIOSIS/MEDLINE/EMBASE/WPIDS(STN)