

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局



(43) 国際公開日
2008年12月24日 (24.12.2008)

PCT

(10) 国際公開番号
WO 2008/156221 A1

- (51) 国際特許分類:
A61L 27/00 (2006.01)
- (21) 国際出願番号: PCT/JP2008/061692
- (22) 国際出願日: 2008年6月20日 (20.06.2008)
- (25) 国際出願の言語: 日本語
- (26) 国際公開の言語: 日本語
- (30) 優先権データ:
特願2007-163223 2007年6月20日 (20.06.2007) JP
- (71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): HOYA 株式会社 (HOYA CORPORATION) [JP/JP]; 〒1618525 東京都新宿区中落合2丁目7番5号 Tokyo (JP).
- (72) 発明者; および
- (75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 沖花裕行 (OKI-HANA, Hiroyuki) [JP/JP]; 〒1618525 東京都新宿区中落合2丁目7番5号 HOYA株式会社内 Tokyo (JP).
- (74) 代理人: 山本秀策, 外 (YAMAMOTO, Shusaku et al.); 〒5406015 大阪府大阪市中央区城見一丁目2番27号 クリスタルタワー 15階 Osaka (JP).
- (81) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の国内保護が可能): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, SV, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.
- (84) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の広域保護が可能): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MT, NL, NO, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).
- 添付公開書類:
— 国際調査報告書

(54) Title: REPAIR AND TREATMENT OF BONE DEFECT BY USING FACTOR PRODUCED BY CHONDROCYTE HAVING HYPERTROPHIC ABILITY AND SCAFFOLD

(54) 発明の名称: 肥大化能を有する軟骨細胞の産生する因子と足場による骨欠損の修復と治療

(57) Abstract: Disclosed is a composite material for promoting or inducing the formation of a bone *in vivo*. The composite material comprises: A) a factor capable of inducing the induced osteoblast differentiation, which can be produced by culturing a chondrocyte having a hypertrophic ability in a differentiation factor production medium supplemented with dexamethasone, β -glycerophosphate, ascorbic acid and a serum component; and B) a scaffold having a biocompatibility. Also disclosed is a method for producing the composite material. Further disclosed is a method for promoting or inducing the formation of a bone *in vivo*.

(57) 要約: 本発明は、生体内の骨形成を促進または誘発するための複合材料を提供する。この複合材料は、A) 肥大化能を有する軟骨細胞を、デキサメサゾン、 β -グリセロホスフェート、アスコルビン酸および血清成分を含む分化因子産生培地において培養した結果得られる誘導骨芽細胞分化誘導因子、およびB) 生体適合性を有する足場を含む。本発明はまた、この複合材料を生産するための方法、ならびに生体内の骨形成を促進または誘発するための方法を提供する。



WO 2008/156221 A1

明 細 書

肥大化能を有する軟骨細胞の産生する因子と足場による骨欠損の修復と治療

5

技術分野

本発明は、肥大化能を有する軟骨細胞の産生する骨芽細胞分化誘導因子と足場とを含む複合材料ならびにその製造法およびその利用法に関する。

10

背景技術

15

骨形成の低下する病気や骨の損傷または骨の欠損に対しては、骨形成が好ましい治療法である。骨組織が骨折などの損傷や骨腫瘍などによる切除を受けると、骨を作る細胞である骨芽細胞が増殖、分化し、骨が形成して、骨折部や骨欠損部が治癒する。損傷の軽度な症例においては、患部を固定することによって骨芽細胞が有効に機能し、治癒に至る。複雑骨折や骨切除術による大きな欠損、さらに

20

骨髄炎の併発などにより骨芽細胞が有効に機能し得ない環境では、損傷または欠損を修復するための標準的な方法として、自家骨移植が一般に考えられてきた。骨欠損部位が大きくて自家骨では補填できない場合は、人工骨を使用するとしても、自家骨を一部混ぜる方法が多く採られている。しかし、ヒトの場合には自家骨の供給源は限られており、採取できる量に限りがある。また採取のためには余分な手術が必要であり、高額な費用および苦痛を伴い、さらに骨の採取部位（本来正常部位）には新たな骨欠損が生じるという数々の欠点が存在する。

25

そこで、人工骨のインプラントおよび骨補填材料の使用などさまざまな外科的処置が利用されてきた。外傷や骨腫瘍摘出等により生じた骨等の生体組織欠損部に、骨補填材等の生体組織補填材を補填することにより、骨等の生体組織欠損部を補填修復することが可能になってきている。骨補填材料としては、ハイドロキ

シアパタイト (HAP) やリン酸三カルシウム (TCP) が主として知られている。

しかし、この従来の人工骨のインプラントおよび骨補填材料には、自家骨と比べて、骨形成能が低く骨ができにくく、また靱性が低く衝撃で割れやすいという欠点があった。したがって、外科的処置の予後は必ずしも良好ではなく、複数回の手術を必要とすることも多い。これらの理由により、人工骨の使用割合は増えつつあるものの、未だ3割程度で、残りの6～7割は自家骨が使用されている。

米国では同種骨が多く使用されている。しかし、日本では、死体を利用することは習慣として馴染みにくく、そのため利用されることは多くない。骨バンクも存在しているが、現在のところその整備は不十分である。

上記の従来の人工骨のこれらの欠点を改良するために、細胞の再生力を利用した再生医療の試みが行われ始めており、骨折部や骨欠損部に対する治療にも応用されている。また、術後の骨欠損部の修復速度を高めるためにも利用されている。この再生医療には骨髄由来の幹細胞が主に使用され、患者から採取した骨髄幹細胞や分化させた骨芽細胞を骨補填材料とともに培養することにより製造される培養骨等の生体組織補填体を使用することが提案されている。培養されることにより骨補填材料を足場にして増殖した多くの骨髄間葉系幹細胞やさらに分化した骨芽細胞を含む骨補填体を骨欠損部に補填するので、骨補填材料のみを移植する方法と比較すると、上記の人工骨の欠点を補うことができ、また骨が形成されるまでの日数を短縮することができる。

従来の再生医療の方法では、骨髄由来の間葉系幹細胞を骨芽細胞に分化させるには、Maniopoulosらが提唱した方法（デキサメサゾン、 β -グリセロホスフェートおよびアスコルビン酸の3化合物を使用する方法）もしくはその使用濃度を修正した方法が利用されているが、これらの方法は人工的なもので、自然のものではない（非特許文献1=Maniopoulos, Cら: Bone formation in vitro by stromal cells obtained from bone marrow of young adult rats. Cell Tissue

Res, 254: 317-330, 1988.)。さらに、幹細胞の中には、この3化合物混合物によっては分化しない細胞が存在する。その結果、分化誘導された骨芽細胞の性質や機能に不安が存在する。

そこで、骨形成の低下する病気や骨の損傷または骨の欠損に対する治療のために利用される骨芽細胞を、安全に、安価に、かつ安定して提供することが必要とされている。

これまで、骨形成は、骨芽細胞を誘導させると考えられているBMP（骨形成因子）-2、BMP-4、BMP-7が重要な役割を果たすと考えられてきた。BMPファミリーには多くのファミリーメンバーが存在するが、BMP-2、BMP-4およびBMP-7以外の分子は、初期から知られていたBMP 2の配列をもとにして、機能については考慮せずには取得したホモログであり、骨芽細胞を分化誘導するという能力は必ずしも有していない。BMP-2、BMP-4およびBMP-7は、マウス、ラットにおいて骨芽細胞を有効に誘導するが、ヒトでは1000分の1ほどの効果しかないことが報告されている（非特許文献2～5 =Wozney, J. M. ら: Novel Regulators of Bone Formation: Molecular Clones and Activities. Science, 242: 1528-1534, 1988.; Wuerzler KK ら: Radiation-Induced Impairment of Bone Healing Can Be overcome by Recombinant Human Bone Morphogenetic Protein-2. J. Craniofacial Surg., 9: 131-137, 1998; Govender S ら: Recombinant Human Bone Morphogenetic Protein-2 for treatment of Open Tibial Fractures. J. Bone Joint Surg., 84A: 2123-2134, 2002.; Johnsson R ら: Randomized Radiostereometric Study Comparing Osteogenic Protein-1 (BMP-7) and Autograft Bone in Human Noninstrumented Posterolateral Lumbar Fusion. Spine, 27: 2654-2661, 2002.)。

本発明者は、BMPを異所に移植すると、内軟骨性骨化による骨形成が生じることを観察した。BMPをクローニングしたWozneyらもBMPの活性を測定した際に、cartilage-inducing activityという言葉を使用している（非特許文献2

=Wozney, J. M. ら: Novel Regulators of Bone Formation: Molecular Clones and Activities. Science, 242: 1528-1534, 1988)。この観察により、BMP-2、BMP-4およびBMP-7は、骨を直接的に分化誘導させるのではなく、肥大化能を有する軟骨細胞を誘導させ、この肥大化能を有する軟骨細胞が産生する因子が骨芽細胞を分化誘導させて骨形成を導くと考察した（非特許文献6および非特許文献7＝沖花裕行：成長軟骨の産生する骨形成因子、医学のあゆみ、165: 419、1993；Okihana, H. & Shimomura, Y: Osteogenic Activity of Growth Cartilage Examined by Implanting Decalcified and Devitalized Ribs and Costal Cartilage Zone, and Living Growth Cartilage Cells. Bone, 13: 387-393, 1992.）。骨芽細胞の誘導、走化、活性化に直接作用する、分子量50,000以上のペプチド性あるいは生体由来の因子は知られていない。

特許文献1（特開2004-305259号公報）は、生体組織補填材に幹細胞を付着させ、付着させた幹細胞を分化誘導させることにより生体組織補填材を足場として生体組織形成作用を生じさせ、形成された組織細胞を死滅させる処理工程とを備えることを特徴とする生体組織補填体の製造方法を開示している。特許文献1には、生体組織補填材に幹細胞を付着させ、付着された幹細胞を骨芽細胞に分化させることが記載されている。この培養に用いる培地には、最小必須培地、ウシ胎仔血清（FBS）、デキサメタゾン、 β グリセロホスフェートのような分化誘導因子、ビタミンCのような栄養剤が混合されていることが記載されており、最小必須培地、ウシ胎仔血清（FBS）、デキサメタゾンを混合した培地を分化誘導に使用している。特許文献1には、本発明の骨芽細胞分化誘導因子と足場とを含む複合材料も、この複合材料が生体内の骨形成を促進または誘発することも記載されていない。

特許文献2（特開2004-305260号公報）は、生体組織補填材に幹細胞を付着させ、付着させた幹細胞を分化誘導させることにより生体組織補填材を足場として生体組織形成作用を生じさせ、形成された組織細胞を死滅させる処理工程を備え、

この処理工程が、生体組織補填材を凍結してさらに乾燥する工程であることを特徴とする生体組織補填体の製造方法を開示している。特許文献2には、生体組織補填材に幹細胞を付着させ、付着された幹細胞を骨芽細胞に分化させることが記載されている。この培養に用いる培地には、最小必須培地、ウシ胎仔血清（FBS）、デキサメタゾン、 β グリセロホスフェートのような分化誘導因子、ビタミンCのような栄養剤が混合されていることが記載されており、最小必須培地、ウシ胎仔血清（FBS）、デキサメタゾンを混合した培地を分化誘導に使用している。特許文献2には、本発明の骨芽細胞分化誘導因子と足場とを含む複合材料も、この複合材料が生体内の骨形成を促進または誘発することも記載されていない。

特許文献3（特開2004-49142号公報）は、患者から採取した骨髓細胞を所定の培地内で培養することにより間葉系幹細胞を取得する一次培養ステップと、培養された間葉系幹細胞を所定の骨形成培地内で培養することにより骨芽細胞へ分化誘導させる二次培養ステップと、分化誘導された骨芽細胞および産生された骨基質を回収する回収ステップと、回収された骨芽細胞および骨基質を骨補填材顆粒と混合する混合ステップとを備える培養骨の製造方法を開示している。特許文献3には、最小必須培地、ウシ胎仔血清（FBS）、デキサメタゾン、 β グリセロホスフェートのような分化誘導因子、ビタミンCのような栄養剤が混合されている培地を用いて、間葉系幹細胞を骨芽細胞に分化させることが記載されている。特許文献3には、本発明の骨芽細胞分化誘導因子と足場とを含む複合材料も、この複合材料が生体内の骨形成を促進または誘発することも記載されていない。

特許文献4（特開2005-205074号公報）は、患者から採取した細胞を培養して得た間葉系幹細胞を骨補填材に担持させ、骨補填材に担持させた前記間葉系幹細胞を培養して骨芽細胞へと分化誘導させる培養骨、もしくは患者から採取した細胞をもとに得た間葉系幹細胞を培養して骨芽細胞へと分化誘導させた後に骨芽細胞を骨補填材に担持させる培養骨の製造方法を開示している。特許文献4には、最小必須培地、ウシ胎仔血清（FBS）、デキサメタゾン、 β グリセロホスフェ

ートのような分化誘導因子、ビタミンCのような栄養剤が混合されている培地を用いて、間葉系幹細胞を骨芽細胞に分化させることが記載されている。この方法では、患者から採取した細胞を培養する培養液、または前記間葉系幹細胞を培養する培養液、もしくは前記骨芽細胞へと分化誘導させた後の培養液に多血小板血漿を添加することが必要である。特許文献4には、本発明の骨芽細胞分化誘導因子と足場とを含む複合材料も、この複合材料が生体内の骨形成を促進または誘発することも記載されていない。

特許文献5（特表2003-531604号公報）は、出生後のヒト包皮組織などの出生後のヒト組織から、間葉幹細胞を単離する方法、ならびに単離した間葉幹細胞を、骨形成、脂肪生成、および軟骨形成細胞系譜などの、多様な細胞系譜に分化誘導させる方法が開示されている。特許文献5には、ウシ胎仔血清（FBS）、抗生物質、骨形成補足剤（デキサメタゾン、 β グリセロホスフェートおよびアスコルビン酸-2-リン酸）を含む培地を用いて、間葉系幹細胞を骨芽細胞に分化させることが記載されている。特許文献5には、本発明の骨芽細胞分化誘導因子と足場とを含む複合材料も、この複合材料が生体内の骨形成を促進または誘発することも記載されていない。

特許文献6（特開2006-289062号公報）は、肥大化能を有する軟骨細胞と足場を用いた骨補填材料を開示している。特許文献6には、本発明の骨芽細胞分化誘導因子と足場とを含む複合材料も、この複合材料が生体内の骨形成を促進または誘発することも記載されていない。

発明の開示

発明が解決しようとする課題

本発明は、骨形成の低下する病気の治療や骨の損傷または骨の欠損に対する処置、特に骨腫瘍および複雑骨折などの治療において使用することができる、肥大化能を有する軟骨細胞の産生する骨芽細胞分化誘導因子と足場とを含む複合材料

ならびにその製造法およびその利用法を提供することを課題とする。

本発明は、周辺に骨がない部位に骨を形成させるために使用することができる、肥大化能を有する軟骨細胞の産生する骨芽細胞分化誘導因子と足場とを含む複合材料を提供することを課題とする。

5

課題を解決するための手段

上記課題は、一部、本発明において、本発明による骨芽細胞分化誘導因子と足場とを使用することによって、予想外に骨形成が進展するという性質をもつ複合材料を見出したことによって解決された。本発明による骨芽細胞分化誘導因子は、
10 該因子単独では、生体に移植しても散逸してしまうため、未分化細胞を骨芽細胞に誘導することはできない。本発明は、この骨芽細胞分化誘導因子と生体適合性を有する足場を組み合わせることによって、生体内の骨形成を促進または誘発することに初めて成功した。

上記目的を達成するために、本発明は、例えば、以下の手段を提供する。

15 (項目 1)

A) 肥大化能を有する軟骨細胞を、グルココルチコイド、 β -グリセロホスフェートおよびアスコルビン酸からなる群より選択される少なくとも 1 つを含む分化因子産生培地において培養することによって得ることができる、誘導骨芽細胞分化誘導因子、および

20 B) 生体適合性を有する足場、
を含む、生体内の骨形成を促進または誘発するための複合材料。

(項目 1 A)

A) 肥大化能を有する軟骨細胞を、デキサメサゾン、 β -グリセロホスフェート、アスコルビン酸および血清成分を含む分化因子産生培地において培養した
25 結果得られる誘導骨芽細胞分化誘導因子、および

B) 生体適合性を有する足場、

を含む、生体内の骨形成を促進または誘発するための複合材料。

(項目 1 B)

5 前記誘導骨芽細胞分化誘導因子が、(1) 前記肥大化能を有する軟骨細胞を培養した培地に存在するか、または(2) 該肥大化能を有する軟骨細胞を培養した上清を、分子量 50,000 の限外濾過に供することにより得られる分子量 50,000 以上の画分に存在する、上記項目に記載の複合材料。

(項目 2)

前記誘導骨芽細胞分化誘導因子が濃縮されたものである、上記項目の複合材料。

10 (項目 3)

前記誘導骨芽細胞分化誘導因子が凍結乾燥されたものである、上記項目に記載の複合材料。

(項目 3 A)

15 前記誘導骨芽細胞分化誘導因子が濃縮または凍結乾燥されたものである、上記項目に記載の複合材料。

(項目 4)

前記誘導骨芽細胞分化誘導因子が、前記生体適合性を有する足場に付着されている、上記項目に記載の複合材料。

(項目 5)

20 前記誘導骨芽細胞分化誘導因子が、前記生体適合性を有する足場に分散されている、上記項目に記載の複合材料。

(項目 6)

25 前記誘導骨芽細胞分化誘導因子が、生体適合性を有する足場の表面および該生体適合性を有する足場の内部孔内からなる群より選択される領域に付着または分散している、上記項目に記載の複合材料。

(項目 7)

前記生体適合性を有する足場が、ゲル状足場および3次元状足場からなる群より選択される、上記項目に記載の複合材料。

(項目7A)

5 前記生体適合性を有する足場が、リン酸カルシウム、炭酸カルシウム、アルミナ、ジルコニア、アパタイトーウォラストナイト析出ガラス、ゼラチン、コラーゲン、キチン、フィブリン、ヒアルロン酸、細胞外基質混合物、絹、セルロース、デキストラン、アガロース、寒天、合成ポリペプチド、ポリ乳酸、ポリロイシン、アルギン酸、ポリグリコール酸、ポリメタクリル酸メチル、ポリシアノアクリレート、ポリアクリロニトリル、ポリウレタン、ポリプロピレン、ポリエチレン、ポリ塩化ビニル、エチレン酢酸ビニル共重合体、ナイロンおよびそれらの組み合わせからなる群より選択される物質を含む、上記項目に記載の複合材料。

(項目8)

15 前記生体適合性を有する足場が、多孔質ヒドロキシアパタイト、超多孔質ヒドロキシアパタイト、アパタイトコラーゲン混合体、アパタイトコラーゲン複合体、コラーゲングル、コラーゲンスポンジ、ゼラチンスポンジ、フィブリンゲル、合成ペプチド、細胞外基質混合物、アルギン酸、アガロース、ポリグリコール酸、ポリ乳酸、ポリグリコール酸/ポリ乳酸共重合体およびそれらの組合せからなる群より選択される物質を含む、上記項目に記載の複合材料。

(項目8A)

20 前記生体適合性を有する足場が、ヒドロキシアパタイト、コラーゲン、アルギン酸、およびラミニンとコラーゲンIVとエンタクチンとの混合物、ならびにそれらの組合せからなる群より選択される物質を含む、上記項目に記載の複合材料。

(項目9)

25 前記分化因子産生培地が、 β -グリセロホスフェートおよびアスコルビン酸の両方を含む、上記項目に記載の複合材料。

(項目 1 0)

前記分化因子産生培地が、血清成分をさらに含む、上記項目に記載の複合材料。

(項目 1 0 A)

5 前記誘導骨芽細胞分化誘導因子が、凍結乾燥した状態でコラーゲン溶液と混合され、かつ前記分化因子産生培地が、基礎成分として最小必須培地 (MEM) を含む、上記項目に記載の複合材料。

(項目 1 1)

10 前記誘導骨芽細胞分化誘導因子が、凍結乾燥した状態でコラーゲン溶液と混合され、かつ前記分化因子産生培地が、基礎成分として、最小必須培地 (MEM) を含み、さらにグルココルチコイド、 β -グリセロホスフェートおよびアスコルビン酸を含む、上記項目に記載の複合材料。

(項目 1 1 A)

15 前記誘導骨芽細胞分化誘導因子が、ヒドロキシアパタイトに付着または分散されており、かつ前記分化因子産生培地が、基礎成分として最小必須培地 (MEM) を含む、上記項目に記載の複合材料。

(項目 1 2)

20 前記誘導骨芽細胞分化誘導因子が、ヒドロキシアパタイトに付着または分散されており、かつ前記分化因子産生培地が、基礎成分として、最小必須培地 (MEM) を含み、さらにグルココルチコイド、 β -グリセロホスフェートおよびアスコルビン酸を含む、上記項目に記載の複合材料。

(項目 1 3)

前記骨形成が、骨の欠損を修復または治療するためのものである、上記項目に記載の複合材料。

(項目 1 4)

25 前記欠損は、固定のみでは修復できない大きさを有する、上記項目に記載の複合材料。

(項目 1 5)

前記骨形成が、周辺に骨がない部位に骨を形成させるためのものである、上記項目に記載の複合材料。

(項目 1 6)

- 5 生体内の骨形成を促進または誘発するための複合材料を製造するための方法であって、以下の工程：

A) 肥大化能を有する軟骨細胞を、グルココルチコイド、 β -グリセロホスフェートおよびアスコルビン酸からなる群より選択される少なくとも1つを含む分化因子産生培地において培養する工程；

- 10 B) 該培養によって得られた上清と、該生体適合性を有する足場とを合わせる工程、を包含する、方法。

(項目 1 6 A)

生体内の骨形成を促進または誘発するための複合材料を製造するための方法であって、以下の工程：

- 15 A) 肥大化能を有する軟骨細胞を、デキサメサゾン、 β -グリセロホスフェート、アスコルビン酸および血清成分を含む分化因子産生培地において培養した結果得られる誘導骨芽細胞分化誘導因子を提供する工程、および

B) 該誘導骨芽細胞分化誘導因子と、生体適合性を有する足場とを合わせる工程、を包含する、方法。

- 20 (項目 1 6 B)

前記誘導骨芽細胞分化誘導因子が、(1) 前記肥大化能を有する軟骨細胞を培養した培地に存在するか、または(2) 該肥大化能を有する軟骨細胞を培養した上清を、分子量50,000の限外濾過に供することにより得られる分子量50,000以上の画分に存在する、上記項目に記載の方法。

- 25 (項目 1 6 C)

前記A) 工程が、前記肥大化能を有する軟骨細胞を、デキサメサゾン、 β -グリセロホスフェート、アスコルビン酸および血清成分を含む分化因子産生培地において培養し、該培養した上清を採取することを含む、上記項目に記載の方法。

(項目 17)

- 5 前記A) 工程の後に、前記上清を濃縮する工程をさらに包含する、上記項目に記載の方法。

(項目 18)

前記上清を凍結乾燥する工程をさらに包含する、上記項目に記載の方法。

(項目 18A)

- 10 前記A) 工程が、前記肥大化能を有する軟骨細胞を培養した上清を、限外濾過に供し、分子量50,000以上の画分に分離することを含む、上記項目に記載の方法。

(項目 18B)

- 15 前記A) 工程の後に、前記上清を濃縮または凍結乾燥する工程をさらに包含する、上記項目に記載の方法。

(項目 19)

前記B) 工程が、前記上清を、前記生体適合性を有する足場に接触させる工程を包含する、上記項目に記載の方法。

(項目 20)

- 20 前記B) 工程は、

前記上清から因子を得る工程、および

該因子を前記生体適合性を有する足場と混合する工程、
を包含する、上記項目に記載の方法。

(項目 21)

- 25 前記B) 工程は、

前記濃縮によって得られた上清濃縮物を、前記生体適合性を有する足場と接触

させるのに十分な体積に希釈し、該生体適合性を有する足場を接触させる工程を包含する、上記項目に記載の方法。

(項目 2 1 A)

前記生体適合性を有する足場が、ゲル状足場および 3 次元状足場からなる群より
5 選択される、上記項目に記載の方法。

(項目 2 2)

前記生体適合性を有する足場が、リン酸カルシウム、炭酸カルシウム、アルミナ、
ジルコニア、アパタイトーウォラストナイト析出ガラス、ゼラチン、コラーゲン、
キチン、フィブリン、ヒアルロン酸、細胞外基質混合物、絹、セルロース、デキ
10 ストラン、アガロース、寒天、合成ポリペプチド、ポリ乳酸、ポリロイシン、ア
ルギン酸、ポリグリコール酸、ポリメタクリル酸メチル、ポリシアノアクリレー
ト、ポリアクリロニトリル、ポリウレタン、ポリプロピレン、ポリエチレン、ポ
リ塩化ビニル、エチレン酢酸ビニル共重合体、ナイロンおよびそれらの組み合わ
せからなる群より選択される物質を含む、上記項目に記載の方法。

15 (項目 2 3)

前記生体適合性を有する足場が、多孔質ヒドロキシアパタイト、超多孔質ヒドロ
キシアパタイト、アパタイトコラーゲン混合体、アパタイトコラーゲン複合体、
コラーゲングル、コラーゲンスポンジ、ゼラチンスポンジ、フィブリンゲル、合
成ペプチド、細胞外基質混合物、アルギン酸、アガロース、ポリグリコール酸、
20 ポリ乳酸、ポリグリコール酸／ポリ乳酸共重合体およびそれらの組合せからなる
群より選択される物質を含む、上記項目に記載の方法。

(項目 2 3 A)

前記生体適合性を有する足場が、ヒドロキシアパタイト、コラーゲン、アルギン
酸、およびラミニンとコラーゲン I V とエンタクチンとの混合物、ならびにそれ
25 らの組合せからなる群より選択される物質を含む、上記項目に記載の方法。

(項目 2 4)

前記B)工程は、

前記濃縮によって得られた上清濃縮物を凍結乾燥する工程、および

該上清濃縮物を前記生体適合性を有する足場と接触させるのに十分な体積に希釈し、該希釈した上清濃縮物と生体適合性を有する足場とを接触させる工程を包含し、ここで、該生体適合性を有する足場が、多孔質ヒドロキシアパタイト、超多孔質ヒドロキシアパタイト、アパタイトコラーゲン混合体、アパタイトコラーゲン複合体、コラーゲングル、コラーゲンスポンジ、ゼラチンスポンジ、フィブリンゲル、合成ペプチド、細胞外基質混合物、アルギン酸、アガロース、ポリグリコール酸、ポリ乳酸、ポリグリコール酸／ポリ乳酸共重合体およびそれらの組合せからなる群より選択される、上記項目に記載の方法。

(項目24A)

前記B)工程が、

前記凍結乾燥した状態の上清とコラーゲン溶液とを合わせる工程を包含する、上記項目に記載の方法。

(項目24B)

前記B)工程が、

前記濃縮した上清とヒドロキシアパタイトとを接触させる工程を包含する、上記項目に記載の方法。

(項目25)

前記分化因子産生培地が、 β -グリセロホスフェートおよびアスコルビン酸の両方を含む、上記項目に記載の方法。

(項目26)

前記分化因子産生培地が、血清成分をさらに含む、上記項目に記載の方法。

(項目27)

生体内の骨形成を促進または誘発するための方法であって、該方法は、誘導骨芽細胞分化誘導因子と生体適合性を有する足場とを含む複合材料を、生体内の骨形

成を促進または誘発する必要のある部位に移植する工程を包含する、方法。

(項目 28)

前記骨形成が、骨の欠損を修復または治療するためのものである、上記項目に記載の方法。

5 (項目 29)

前記欠損は、固定のみでは修復できない大きさを有する、上記項目に記載の方法。

(項目 30)

前記骨形成が、周辺に骨がない部位に骨を形成させるためのものである、上記項目に記載の方法。

10 (項目 31)

A) 肥大化能を有する軟骨細胞、および

B) アルギン酸

を含む、生体内の骨形成を促進または誘発するための複合材料。

(項目 32)

15 A) 肥大化能を有する軟骨細胞、および

B) ラミニンとコラーゲン I V とエンタクチンとの混合物

を含む、生体内の骨形成を促進または誘発するための複合材料。

本発明によって、生体内の骨形成を促進または誘発することができる、肥大化
20 能を有する軟骨細胞の産生する誘導骨芽細胞分化誘導因子と足場とを含む複合材料ならびにその製造法およびその利用法が提供される。このような複合材料は、生体内の骨形成を促進または誘発することができ、この複合材料を用いることによって、周辺に骨がない部位にまで骨形成を導くことができるようになった。このような複合材料は、従来技術では提供されるものではなく、初めて提供される
25 ものである。

図面の簡単な説明

図1 Aは、肥大化能を有する軟骨細胞を希釈した細胞液をヒドロキシアパタイトに播種し、アルカリホスファターゼ染色した結果を示す。1×10⁶細胞/mlでヒドロキシアパタイトに播種し、37℃にて、5%CO₂インキュベーター中で1週間培養した後、アルカリホスファターゼ染色を行った。アルカリホスファターゼ染色では、ヒドロキシアパタイトは赤く染まった。左下のバーは、300.00μm。

図1 Bは、図1 Aのアルカリホスファターゼ染色した試料を、トルイジン青染色をした結果を示す。トルイジン青染色では同一部分が青く染まり、細胞が存在することが分かる。左下のバーは、300.00μm。

図1 Cは、静止軟骨細胞を希釈した細胞液をヒドロキシアパタイトに播種し、アルカリホスファターゼ染色した結果を示す。1×10⁶細胞/mlでヒドロキシアパタイトに播種し、37℃にて、5%CO₂インキュベーター中で1週間培養した後、アルカリホスファターゼ染色を行った。アルカリホスファターゼ染色では、ヒドロキシアパタイトは染まらなかった。左下のバーは、300.00μm。

図1 Dは、図1 Cのアルカリホスファターゼ染色した試料を、トルイジン青染色をした結果を示す。トルイジン青染色では、ヒドロキシアパタイトは青く染まり、細胞が存在することが確認された。左下のバーは、300.00μm。

図1 Eは、関節軟骨部由来の軟骨細胞を希釈した細胞液をヒドロキシアパタイトに播種し、アルカリホスファターゼ染色した結果を示す。1×10⁶細胞/mlでヒドロキシアパタイトに播種し、37℃にて、5%CO₂インキュベーター中で1週間培養した後、アルカリホスファターゼ染色を行った。アルカリホスファターゼ染色では、ヒドロキシアパタイトは染まらなかった。左下のバーは、300.00μm。

図1 Fは、図1 Eのアルカリホスファターゼ染色した試料を、トルイジン青染

色をした結果を示す。トルイジン青染色では、ヒドロキシアパタイトは青く斑点状に染まり、細胞が存在することが確認された。左下のバーは、 $300.00\mu\text{m}$ 。

図2は、肋骨・肋軟骨由来の肥大化能を有する軟骨細胞を、MEM分化因子産

5 生培地およびMEM増殖培地でそれぞれ培養し、各培養上清をマウスC3H10

T1/2細胞に添加して培養した場合のアルカリホスファターゼ活性を示す。M

EM分化因子産生培地を用いた細胞培養物の上清を添加した場合、MEM分化因

子産生培地のみを添加した場合を1とすると、4週齢のラット群では、4日後に

採取した培養上清を添加すると約4.1倍、1週後に採取した培養上清では約5.

10 1倍、2週後に採取した培養上清では約5.4倍、3週後に採取した培養上清で

は約4.9倍にまで上昇した。8週齢のラット群では、4日後に採取した培養上

清を添加すると約2.9倍、1週後に採取した培養上清では約3.1倍、2週後

に採取した培養上清では約3.8倍、3週後に採取した培養上清では約4.2倍

にまで上昇した。MEM増殖培地を用いた細胞培養物の上清を添加した場合、4

15 週齢および8週齢のラット群におけるアルカリホスファターゼ活性は、MEM増

殖培地のみを添加した場合とほとんど変わらなかった。以下の略称は添加した培

養上清を示す。4週齢分化上清：4週齢ラット由来の肥大化軟骨細胞をMEM分

化因子産生培地で培養した培養上清、8週齢分化上清：8週齢ラット由来の肥大

化軟骨細胞をMEM分化因子産生培地で培養した培養上清、4週齢増殖上清：4

20 週齢ラット由来の肥大化軟骨細胞をMEM増殖培地で培養した培養上清、8週齢

増殖上清：8週齢ラット由来の肥大化軟骨細胞をMEM増殖培地で培養した培養

上清。

図3Aは、肋骨・肋軟骨由来の肥大化能を有する軟骨細胞をMEM分化因子産

生培地またはMEM増殖培地でそれぞれ培養し、各上清をマウスC3H10T1

25 /2細胞に添加して培養した場合のアルカリホスファターゼ染色の結果を示す。

マウスC3H10T1/2細胞を24穴プレート上に播種し（BME培地）、1

8 時間後に各培養上清を添加し、72 時間後にアルカリホスファターゼ染色をした。上段：MEM 分化因子産生培地で培養した培養上清を添加した場合、試料は赤く染まり、活性が有ることが確認された。下段：MEM 増殖培地で培養した培養上清を添加した場合、試料は染まらず、活性がないことが確認された。

5 図 3 B は、肋骨・肋軟骨由来の肥大化能を有する軟骨細胞を MEM 分化因子産生培地で培養し、その培養上清をマウス C3H10T1/2 細胞に添加して培養した場合のアルカリホスファターゼ染色の結果を示す。マウス C3H10T1/2 細胞をヒドロキシアパタイト上に播種し（BME 培地）、18 時間後に培養上清を添加し、72 時間後にアルカリホスファターゼ染色をした。MEM 分化因子
10 産生培地で培養した上清を添加した場合、試料は赤く染まり、活性が有ることが確認された。左下のバーは、500.00 μm 。

図 3 C は、肋骨・肋軟骨由来の肥大化能を有する軟骨細胞を MEM 分化因子産生培地で培養し、その培養上清をマウス C3H10T1/2 細胞に添加して培養した場合のトルイジン青染色の結果を示す。マウス C3H10T1/2 細胞をヒ
15 ドロキシアパタイト上に播種し（BME 培地）、18 時間後に培養上清を添加し、72 時間後にトルイジン青染色をした。トルイジン青染色で青く染まることより、試料に細胞は存在することが確認された。左下のバーは、500.00 μm 。

図 3 D は、肋骨・肋軟骨由来の肥大化能を有する軟骨細胞を MEM 増殖培地で培養し、その培養上清をマウス C3H10T1/2 細胞に添加して培養した場合
20 のアルカリホスファターゼ染色の結果を示す。マウス C3H10T1/2 細胞をヒドロキシアパタイト上に播種し（BME 培地）、18 時間後に培養上清を添加し、72 時間後にアルカリホスファターゼ染色をした。MEM 増殖培地で培養した上清を添加した場合、試料は染まらず、活性がないことが確認された。左下のバーは、500.00 μm 。

25 図 3 E は、肋骨・肋軟骨由来の肥大化能を有する軟骨細胞を MEM 増殖培で培養し、その培養上清をマウス C3H10T1/2 細胞に添加して培養した場合の

トルイジン青染色の結果を示す。マウスC3H10T1/2細胞をヒドロキシアパタイト上に播種し（BME培地）、18時間後に培養上清を添加し、72時間後にトルイジン青染色をした。トルイジン青染色で青く染まることより、試料に細胞は存在することが確認された。左下のバーは、500.00 μm 。

5 図4は、肋軟骨由来の静止軟骨細胞を、MEM分化因子産生培地およびMEM増殖培地でそれぞれ培養し、その培養上清をマウスC3H10T1/2細胞に添加して培養した場合のアルカリホスファターゼ活性を示す。MEM分化因子産生培地を用いた細胞培養物の上清を添加した場合、およびMEM増殖培地を用いた細胞培養物の上清を添加した場合、アルカリホスファターゼ活性は、MEM分化因子産生培地のみおよびMEM増殖培地のみを添加した場合とほとんど変わらなかった。以下の略称は添加した培養上清を示す。8週齢分化上清：8週齢ラット由来の静止軟骨細胞をMEM分化因子産生培地で培養した培養上清、8週齢増殖上清：8週齢ラット由来の静止軟骨細胞をMEM増殖培地で培養した培養上清。各値は、MEM分化因子産生培地のみおよびMEM増殖培地のみを添加した場合を1として表した。

15 図5Aは、関節軟骨部由来の軟骨細胞を、MEM分化因子産生培地およびMEM増殖培地でそれぞれ培養し、その培養上清をマウスC3H10T1/2細胞に添加して培養した場合のアルカリホスファターゼ活性を示す。関節軟骨部由来の軟骨細胞を、MEM分化因子産生培地で培養した培養上清を添加した場合、およびMEM増殖培地で培養した培養上清を添加した場合、アルカリホスファターゼ活性は、MEM分化因子産生培地のみおよびMEM増殖培地のみ添加した場合とほとんど変わらなかった。以下の略称は添加した培養上清を示す。8週齢分化上清：8週齢ラット由来の関節軟骨細胞をMEM分化因子産生培地で培養した培養上清、8週齢増殖上清：8週齢ラット由来の関節軟骨細胞をMEM増殖培地で培養した培養上清。各値は、MEM分化因子産生培地のみおよびMEM増殖培地のみを添加した場合を1として表した。

図5Bは、肋骨・肋軟骨部由来の肥大化能を有する軟骨細胞をHAM分化因子
産生培地で培養し、その上清をマウスC3H10T1/2細胞に添加して培養し
た場合のアルカリホスファターゼ活性を示す。値は、HAM分化因子産生培地の
みを添加した場合を1とした。肋骨・肋軟骨部由来の肥大化能を有する軟骨細胞
5 をHAM分化因子産生培地で培養した上清を添加した場合、アルカリホスファ
ターゼの活性が上昇した。

図5Cは、肋骨・肋軟骨部由来の肥大化能を有する軟骨細胞をHAM増殖培地
で培養し、その上清をマウスC3H10T1/2細胞に添加して培養した場合の
アルカリホスファターゼ活性を示す。値は、HAM増殖培地のみを添加した場合
10 を1とした。肋骨・肋軟骨部由来の肥大化能を有する軟骨細胞をHAM増殖培地
で培養した上清を添加した場合、アルカリホスファターゼの活性が上昇しなかつ
た。

図6Aは、MEM分化因子産生培地を用いて肥大化能を有する軟骨細胞を培養
した場合、この培養上清には、3T3-Swiss albino細胞、BAL
15 B/3T3細胞においてアルカリホスファターゼ活性を上昇させ、これらの未分
化細胞を骨芽細胞に分化誘導する因子が存在することを示す。一方、MEM増殖
培地を用いて肥大化能を有する軟骨細胞を培養した場合、これらの培養上清には
この因子は存在しないことを示す。さらに、MEM分化因子産生培地またはME
M増殖培地を用いて肥大化能を有さない軟骨細胞を培養した場合には、これらの
20 培養上清にはこの因子は存在しないことを示す。

図6Bは、従来型骨芽細胞分化誘導成分として、デキサメサゾン、 β -グリセ
ロホスフェート、アスコルビン酸またはこれらの組み合わせを培地に添加して肥大
化能を有する軟骨細胞を培養し、その培養上清をマウスC3H10T1/2細胞
に添加して培養した場合のアルカリホスファターゼ活性を示す。Dex：デキサ
25 メサゾン、 β GP： β -グリセロホスフェート、Asc：アスコルビン酸。

図7Aは、肋骨・肋軟骨由来の肥大化能を有する軟骨細胞をMEM分化因子産

生培地で培養し、その上清の分子量50,000以上の画分を、24穴プレート上に播種したマウスC3H10T1/2細胞に添加して培養した場合のアルカリホスファターゼ染色の結果を示す。試料は赤く染まり、この上清の分子量50,000以上の画分には、アルカリホスファターゼ活性を上昇させる活性を有する因子が存在することが分かった。

図7Bは、肋骨・肋軟骨由来の肥大化能を有する軟骨細胞をMEM分化因子產生培地で培養し、その上清の分子量50,000以上の画分を、ヒドロキシアパタイト上に播種したマウスC3H10T1/2細胞に添加して培養した場合のアルカリホスファターゼ染色の結果を示す。ヒドロキシアパタイトは赤く染まり、この上清の分子量50,000以上の画分には、アルカリホスファターゼ活性を上昇させる活性を有する因子が存在することが分かった。

図7Cは、肋骨・肋軟骨由来の肥大化能を有する軟骨細胞をMEM分化因子產生培地で培養し、この上清の分子量50,000未満の画分を、24穴プレート上に播種したマウスC3H10T1/2細胞に添加して培養した場合のアルカリホスファターゼ染色の結果を示す。分子量50,000未満の画分には、アルカリホスファターゼ活性を上昇させる活性を有する因子は認められなかった。左下のバーは、500.00μm。

図7Dは、肋骨・肋軟骨由来の肥大化能を有する軟骨細胞をMEM分化因子產生培地で培養し、この上清の分子量50,000未満の画分を、ヒドロキシアパタイト上に播種したマウスC3H10T1/2細胞に添加して培養した場合のアルカリホスファターゼ染色の結果を示す。分子量50,000未満の画分には、アルカリホスファターゼ活性を上昇させる活性を有する因子は認められなかった。左下のバーは、500.00μm。

図8は、マウスの肋骨・肋軟骨から採取した肥大化能を有する軟骨細胞および肋軟骨から採取した静止軟骨細胞を、MEM分化因子產生培地およびMEM増殖培地でそれぞれ培養し、各培養上清をマウスC3H10T1/2細胞に添加して

培養した場合のアルカリホスファターゼ活性を示す。肥大化能を有する軟骨細胞をMEM分化因子産生培地で培養した培養上清を添加した場合、アルカリホスファターゼ活性は、3.1倍に上昇した。肥大化能を有する軟骨細胞をMEM増殖培地で培養した培養上清を添加した場合、肋軟骨由来の静止軟骨細胞をMEM分化因子産生培地およびMEM増殖培地で培養した培養上清をそれぞれ添加した場合、アルカリホスファターゼ活性は、MEM増殖培地のみおよびMEM分化因子産生培地のみを添加した場合とほとんど変わらなかった。以下の略称は添加した培養上清を示す。GC分化上清：肥大化能を有する軟骨細胞をMEM分化因子産生培地で培養した培養上清、GC増殖上清：肥大化能を有する軟骨細胞をMEM増殖培地で培養した培養上清、RC分化上清：静止軟骨細胞をMEM分化因子産生培地で培養した培養上清、RC増殖上清：静止軟骨細胞をMEM増殖培地で培養した培養上清。各値は、MEM分化因子産生培地のみおよびMEM増殖培地のみを添加した場合を1として表した。

図9は、未分化細胞を培養する培地が、未分化細胞の骨芽細胞への分化誘導に与える影響を示す。肥大化能を有する軟骨細胞、静止軟骨細胞、および関節軟骨細胞を、MEM分化因子産生培地およびMEM増殖培地でそれぞれ培養した。それぞれの培養上清をマウスC3H10T1/2細胞に添加して培養した場合のアルカリホスファターゼ活性を測定した。マウスC3H10T1/2細胞を培養する培地として、HAM培地またはMEM培地を使用した。C3H10T1/2細胞の培養にHAM培地を用いた場合、肥大化能を有する軟骨細胞をMEM分化因子産生培地で培養した培養上清を添加した場合のみ、アルカリホスファターゼ活性の上昇が認められた。C3H10T1/2細胞の培養にMEM培地を用いた場合も同様の結果が得られた。以下の略称は添加した培養上清を示す。GC分化上清：肥大化能を有する軟骨細胞をMEM分化因子産生培地で培養した培養上清、GC増殖上清：肥大化能を有する軟骨細胞をMEM増殖培地で培養した培養上清、RC分化上清：静止軟骨細胞をMEM分化因子産生培地で培養した培養上清、R...

C増殖上清：静止軟骨細胞をMEM増殖培地で培養した培養上清、AC分化上清：関節軟骨細胞をMEM分化因子産生培地で培養した培養上清、AC増殖上清：関節軟骨細胞をMEM増殖培地で培養した培養上清。各値は、MEM分化因子産生培地のみおよびMEM増殖培地のみを添加した場合を1として表した。

- 5 図10は、肥大化能を有する軟骨細胞によって産生された、未分化細胞を骨芽細胞に分化誘導させる因子を加熱処理したときのアルカリホスファターゼ活性を示す。肥大化能を有する軟骨細胞をMEM分化因子産生培地で培養した培養上清を、沸騰水中で3分間加熱処理した。加熱処理をしていない培養上清、加熱処理した培養上清、MEM分化因子産生培地のみを、マウスC3H10T1/2細胞
- 10 にそれぞれ添加し、72時間後にアルカリホスファターゼ活性を測定した。培養上清を加熱処理した場合、アルカリホスファターゼ活性は上昇しなかった。未分化細胞を骨芽細胞に分化誘導させる能力を有する因子は、加熱処理により熱変性する（失活する）ことが確認された。以下の略称は添加した培養上清を示す。GC熱処理：肥大化能を有する軟骨細胞をMEM分化因子産生培地で培養した培養
- 15 上清を加熱処理したもの、GC分化上清：肥大化能を有する軟骨細胞をMEM分化因子産生培地で培養した培養上清、分化上清のみ：MEM分化因子産生培地のみ。各値は、MEM分化因子産生培地のみを添加した場合を1として表した。

図11Aは、誘導骨芽細胞分化誘導因子を含むMEM分化因子産生培地上清におけるTGF β の活性を示す。

- 20 図11Bは、誘導骨芽細胞分化誘導因子を含むMEM分化因子産生培地上清におけるBMPの活性を示す。

図12は、試験試料液を超多孔体ヒドロキシアパタイト（アパセラムAXフィラー）に付着させ、18時間培養したマウスC3H10T1/2細胞に添加した。72時間後にアパタイトを取り出し、アルカリホスファターゼ活性を測定した。

- 25 添加した超多孔体ヒドロキシアパタイトを以下に示す。HA pAXGC/分化浸漬：アパセラムAXフィラーに、肥大化能を有する軟骨細胞をMEM分化因子産

生培地で培養した培養上清を付着させたもの；HApAX分化培地浸漬：アパセラムAXフィラーに、MEM分化因子産生培地を付着させたもの；HApAXのみ：アパセラムAXフィラー単独；分化培地のみ（MEM）：MEM分化因子産生培地のみ（アパセラムAXフィラー無し）

5 図13A～Dは、移植前のコラーゲンゲルと肥大化能を有する軟骨細胞との複
合材料を示す。図13Aは、HE染色した標本（接眼レンズ倍率20倍視野）で
ある。図13Bは、TB染色した標本（接眼レンズ倍率20倍視野）である。図
13Cは、AB染色した標本（接眼レンズ倍率20倍視野）である。図13Dは、
SO染色した標本（接眼レンズ倍率20倍視野）である。図13Eは、コラーゲ
10 ンゲルと肥大化能を有する軟骨細胞との複合材料をラット背部皮下に移植し、移
植4週間後に移植部位を摘出し、レントゲン撮影した図である。円形のものは移
植部位を特定するために埋入したシリコンリングである。リングの中央部には、
石灰化が認められる。図13Fは、図13Eと同じ標本をマイクロCT撮影した
図である。円形のものは移植部位を特定するために埋入したシリコンリングであ
15 る。リング中央部には、石灰化が認められる。

図14は、コラーゲンゲルと肥大化能を有する軟骨細胞との複合材料をラット
背部皮下に移植し、移植4週間後に移植部位を摘出して染色した組織の全体像を
示す。図14Aは、HE染色（拡大レンズ倍率35倍視野）である。図14Bは、
TB染色（拡大レンズ倍率35倍視野）である。図14Cは、AB染色（拡大レ
20 ンズ倍率35倍視野）である。図14Dは、SO染色（拡大レンズ倍率35倍視
野）である。

図15は、図13に示すコラーゲンゲルと肥大化能を有する軟骨細胞との複合
材料をラット背部皮下に移植し、移植4週間後に移植部位を摘出して染色した組
織像の拡大図（接眼レンズ倍率4倍視野）を示す。図15A～図15Dは、図1
25 4A～図14Dに対応する。

図16は、図13に示すコラーゲンゲルと肥大化能を有する軟骨細胞との複合材料をラット背部皮下に移植し、移植4週間後に移植部位を摘出して染色した組織像の拡大図（接眼レンズ倍率10倍視野）を示す。図16A～図16Dは、図14A～図14Dに対応する。

5 図17A～Dは、移植前のアルギン酸と肥大化能を有する軟骨細胞との複合材料を示す。図17Aは、HE染色した標本（接眼レンズ倍率20倍視野）である。図17Bは、TB染色した標本（接眼レンズ倍率20倍視野）である。図17Cは、AB染色した標本（接眼レンズ倍率20倍視野）である。図17Dは、SO染色した標本（接眼レンズ倍率20倍視野）である。図17Eは、アルギン酸と
10 肥大化能を有する軟骨細胞との複合材料をラット背部皮下に移植し、移植4週間後に移植部位を摘出し、レントゲン撮影した図である。円状のものはシリコンリングであり、中央部には、石灰化が認められる。図17Fは、図17Eと同じ標本をマイクロCT撮影した図である。円状のものはシリコンリングであり、中央部には、石灰化が認められる。

15 図18は、アルギン酸と肥大化能を有する軟骨細胞との複合材料をラット背部皮下に移植し、移植4週間後に移植部位を摘出して染色した組織の全体像を示す。図18Aは、HE染色（拡大レンズ倍率35倍視野）である。図18Bは、TB染色（拡大レンズ倍率35倍視野）である。図18Cは、AB染色（拡大レンズ倍率35倍視野）である。図18Dは、SO染色（拡大レンズ倍率35倍視野）
20 である。

図19は、図17に示すアルギン酸と肥大化能を有する軟骨細胞との複合材料をラット背部皮下に移植し、移植4週間後に移植部位を摘出して染色した組織像の拡大図（接眼レンズ倍率4倍視野）を示す。図19A～図19Dは、図18A～図18Dに対応する。

25 図20は、図17に示すアルギン酸と肥大化能を有する軟骨細胞との複合材料をラット背部皮下に移植し、移植4週間後に移植部位を摘出して染色した組織像

の拡大図（接眼レンズ倍率10倍視野）を示す。図20A～図20Dは、図18A～図18Dに対応する。

図21A～Dは、移植前のマトリゲルと肥大化能を有する軟骨細胞との複合材料を示す。図21Aは、HE染色した標本（接眼レンズ倍率20倍視野）である。
5 図21Bは、TB染色した標本（接眼レンズ倍率20倍視野）である。図21Cは、AB染色した標本（接眼レンズ倍率20倍視野）である。図21Dは、SO染色した標本（接眼レンズ倍率20倍視野）である。図21Eは、マトリゲルと肥大化能を有する軟骨細胞との複合材料をラット背部皮下に移植し、移植4週間後に移植部位を摘出し、レントゲン撮影した図である。円状のものはシリコンリングであり、中央部には、石灰化が認められる。図21Fは、図21Eと同じ標本をマイクロCT撮影した図である。円状のものはシリコンリングであり、中央部には、石灰化が認められる。
10

図22は、マトリゲルと肥大化能を有する軟骨細胞との複合材料をラット背部皮下に移植し、移植4週間後に移植部位を摘出して染色した組織の全体像を示す。
15 図22Aは、HE染色（拡大レンズ倍率35倍視野）である。図22Bは、TB染色（拡大レンズ倍率35倍視野）である。図22Cは、AB染色（拡大レンズ倍率35倍視野）である。図22Dは、SO染色（拡大レンズ倍率35倍視野）である。

図23は、図22に示すマトリゲルと肥大化能を有する軟骨細胞との複合材料をラット背部皮下に移植し、移植4週間後に移植部位を摘出して染色した組織像の拡大図（接眼レンズ倍率4倍視野）を示す。図23A～図23Dは、図22A～図22Dに対応する。
20

図24は、図22に示すマトリゲルと肥大化能を有する軟骨細胞との複合材料をラット背部皮下に移植し、移植4週間後に移植部位を摘出して染色した組織像の拡大図（接眼レンズ倍率10倍視野）を示す。図24A～図24Dは、図22A～図22Dに対応する。
25

図 2 5 A～D は、移植前のコラーゲンゲルと肥大化能を有さない軟骨細胞との複合材料を示す。図 2 5 A は、H E 染色した標本（接眼レンズ倍率 2 0 倍視野）である。図 2 5 B は、T B 染色した標本（接眼レンズ倍率 2 0 倍視野）である。図 2 5 C は、A B 染色した標本（接眼レンズ倍率 2 0 倍視野）である。図 2 5 D は、S O 染色した標本（接眼レンズ倍率 2 0 倍視野）である。図 2 5 E は、コラーゲンゲルと肥大化能を有さない軟骨細胞との複合材料をラット背部皮下に移植し、移植 4 週間後に移植部位を摘出し、レントゲン撮影した図である。円状のものはシリコンリングであり、中央部には、石灰化は認められない。図 2 5 F は、図 2 5 E と同じ標本をマイクロ C T 撮影した図である。円状のものはシリコンリングであり、中央部には、石灰化は認められない。

図 2 6 は、コラーゲンゲルと肥大化能を有さない軟骨細胞との複合材料をラット背部皮下に移植し、移植 4 週間後に移植部位を摘出して染色した組織の全体像を示す。図 2 6 A は、H E 染色（拡大レンズ倍率 3 5 倍視野）である。図 2 6 B は、T B 染色（拡大レンズ倍率 3 5 倍視野）である。図 2 6 C は、A B 染色（拡大レンズ倍率 3 5 倍視野）である。図 2 6 D は、S O 染色（拡大レンズ倍率 3 5 倍視野）である。

図 2 7 は、図 2 6 に示すコラーゲンゲルと肥大化能を有さない軟骨細胞との複合材料をラット背部皮下に移植し、移植 4 週間後に移植部位を摘出して染色した組織像の拡大図（接眼レンズ倍率 4 倍視野）を示す。図 2 7 A～図 2 7 D は、図 2 6 A～図 2 6 D に対応する。

図 2 8 A～D は、移植前のアルギン酸と肥大化能を有さない軟骨細胞との複合材料を示す。図 2 8 A は、H E 染色した標本（接眼レンズ倍率 2 0 倍視野）である。図 2 8 B は、T B 染色した標本（接眼レンズ倍率 2 0 倍視野）である。図 2 8 C は、A B 染色した標本（接眼レンズ倍率 2 0 倍視野）である。図 2 8 D は、S O 染色した標本（接眼レンズ倍率 2 0 倍視野）である。図 2 8 E は、アルギン酸と肥大化能を有さない軟骨細胞との複合材料をラット背部皮下に移植し、移植

4週間後に移植部位を摘出し、レントゲン撮影した図である。円状のものはシリコンリングであり、中央部には、石灰化は認められない。図28Fは、図28Eと同じ標本をマイクロCT撮影した図である。円状のものはシリコンリングであり、中央部には、石灰化は認められない。

5 図29は、アルギン酸と肥大化能を有さない軟骨細胞との複合材料をラット背部皮下に移植し、移植4週間後に移植部位を摘出して染色した組織の全体像を示す。図29Aは、HE染色（拡大レンズ倍率35倍視野）である。図29Bは、TB染色（拡大レンズ倍率35倍視野）である。図29Cは、AB染色（拡大レンズ倍率35倍視野）である。図29Dは、SO染色（拡大レンズ倍率35倍視野）である。

図30は、図28に示すアルギン酸と肥大化能を有さない軟骨細胞との複合材料をラット背部皮下に移植し、移植4週間後に移植部位を摘出して染色した組織像の拡大図（接眼レンズ倍率4倍視野）を示す。図30A～図30Dは、図29A～図29Dに対応する。

15 図31A～Dは、移植前のマトリゲルと肥大化能を有さない軟骨細胞との複合材料を示す。図31Aは、HE染色した標本（接眼レンズ倍率20倍視野）である。図31Bは、TB染色した標本（接眼レンズ倍率20倍視野）である。図31Cは、AB染色した標本（接眼レンズ倍率20倍視野）である。図31Dは、SO染色した標本（接眼レンズ倍率20倍視野）である。図31Eは、マトリゲルと肥大化能を有さない軟骨細胞との複合材料をラット背部皮下に移植し、移植4週間後に移植部位を摘出し、レントゲン撮影した図である。円状のものはシリコンリングであり、中央部には、石灰化は認められない。図31Fは、図31Eと同じ標本をマイクロCT撮影した図である。円状のものはシリコンリングであり、中央部には、石灰化は認められない。

25 図32は、マトリゲルと肥大化能を有さない軟骨細胞との複合材料をラット背部皮下に移植し、移植4週間後に移植部位を摘出して染色した組織の全体像を示す。

す。図 3 2 A は、H E 染色（拡大レンズ倍率 3 5 倍視野）である。図 3 2 B は、T B 染色（拡大レンズ倍率 3 5 倍視野）である。図 3 2 C は、A B 染色（拡大レンズ倍率 3 5 倍視野）である。図 3 2 D は、S O 染色（拡大レンズ倍率 3 5 倍視野）である。

5 図 3 3 は、図 3 1 に示すマトリゲルと肥大化能を有さない軟骨細胞との複合材料をラット背部皮下に移植し、移植 4 週間後に移植部位を摘出して染色した組織像の拡大図（接眼レンズ倍率 4 倍視野）を示す。図 3 3 A ～図 3 3 D は、図 3 2 A ～図 3 2 D に対応する。

図 3 4 A は、ヒドロキシアパタイトのみをラット背部皮下に移植し、移植 4 週間後に移植部位を摘出し、レントゲン撮影した図である。左上のバーは、1 0 0 0 . 0 0 μ m。図 3 4 B は、図 3 4 A の拡大図（接眼レンズ倍率 2 0 倍視野）である。図 3 4 C は、コラーゲルのみをラット背部皮下に移植し、移植 4 週間後に移植部位を摘出し、レントゲン撮影した図である。図 3 4 D は、図 3 4 C と同じ標本をマイクロ C T 撮影した図である。図 3 4 E は、アルギン酸のみをラット背部皮下に移植し、移植 4 週間後に移植部位を摘出し、レントゲン撮影した図である。図 3 4 F は、図 3 4 E と同じ標本をマイクロ C T 撮影した図である。図 3 4 G は、マトリゲルのみをラット背部皮下に移植し、移植 4 週間後に移植部位を摘出し、レントゲン撮影した図である。図 3 4 H は、図 3 4 G と同じ標本をマイクロ C T 撮影した図である。図 3 4 C ～H における円状のものはシリコンリングである。すべての足場において石灰化は認められないことが確認された。

図 3 5 A は、ペレット状にして培養したラット肋骨由来の肥大化能を有する軟骨細胞を示す（拡大レンズ倍率 3 5 倍視野）。肥大化した細胞形態が観察される。図 3 5 B は、ペレット状にして培養したラット肋骨由来の肥大化能を有さない軟骨細胞を示す（拡大レンズ倍率 3 5 倍視野）。肥大化能を有さない軟骨細胞は肥大化していないことが観察される。図 3 5 C は、ペレット状にして培養したラット肋骨由来の肥大化能を有する軟骨細胞をラット背部皮下に移植し、移植 4 週間

後に移植部位を摘出し、レントゲン撮影した図である。円状のものはシリコンリングであり、中央部には、石灰化が認められる。図35Dは、図35Cと同じ標本をマイクロCT撮影した図である。円状のものはシリコンリングであり、中央部には、石灰化が認められる。図35Eは、ペレット状にして培養したラット肋骨由来の肥大化能を有さない軟骨細胞をラット背部皮下に移植し、移植4週間後に移植部位を摘出し、レントゲン撮影した図である。円状のものはシリコンリングであり、中央部には、石灰化が認められない。図35Fは、図35Eと同じ標本をマイクロCT撮影した図である。円状のものはシリコンリングであり、中央部には、石灰化が認められない。

図36は、ペレット状にして培養したラット肋骨由来の肥大化能を有する軟骨細胞をラット背部皮下に移植し、移植4週間後に移植部位を摘出して染色した組織像を示す。図36Aは、HE染色（接眼レンズ倍率4倍視野）である。図36Bは、TB染色（接眼レンズ倍率4倍視野）である。図36Cは、AB染色（接眼レンズ倍率4倍視野）である。図36Dは、SO染色（接眼レンズ倍率4倍視野）である。

図37は、図35に示すペレット状にして培養したラット肋骨由来の肥大化能を有する軟骨細胞をラット背部皮下に移植し、移植4週間後に移植部位を摘出して染色した組織像の拡大図（接眼レンズ倍率10倍視野）を示す。図37A～図37Dは、図36A～図36Dに対応する。

図38は、ペレット状にして培養したラット肋骨由来の肥大化能を有さない軟骨細胞をラット背部皮下に移植し、移植4週間後に移植部位を摘出して染色した組織像を示す。図38Aは、HE染色（接眼レンズ倍率4倍視野）である。図38Bは、TB染色（接眼レンズ倍率4倍視野）である。図38Cは、AB染色（接眼レンズ倍率4倍視野）である。図38Dは、SO染色（接眼レンズ倍率4倍視野）である。

図39(1)は、肥大化能を有する軟骨細胞を因子産生培地で培養した上清
(因子を含む分化培地)を添加したヒト未分化間葉系幹細胞をアルカリホスファ
ターゼ染色した写真である。ヒト未分化間葉系幹細胞が赤く染色されることが確
認された。図39(2)は、(2)MEM分化因子産生培地のみ;本発明による
5 因子を含まないが、デキサメサゾンを含む培地(M a n i a t o p o o r u s の
骨芽細胞分化培地)を添加したヒト未分化間葉系幹細胞をアルカリホスファター
ゼ染色した写真である。ヒト未分化間葉系幹細胞はわずかに赤く染色された。図
39(3)は、(3)MEM増殖培地のみ(因子もデキサメサゾンも含まないM
EM増殖培地)を添加したヒト未分化間葉系幹細胞をアルカリホスファターゼ染
10 色した写真である。ヒト未分化間葉系幹細胞はほとんど染色されなかった。n =
3で行った。

図40Aは、大腿骨欠損部に、該因子の濃縮凍結乾燥物をコラーゲンゲルの複
合材料を移植し、4週間経過したものの写真である。

図40Bは、大腿骨欠損部にコラーゲンゲルのみを移植し、4週間経過したも
15 の写真である。

図41Aは、ラット大腿骨に作製した直径3.0mmの骨欠損に移植した4週
後の結果である。左列はコラーゲンゲルのみを移植した結果であり、右列は本発
明による因子の濃縮凍結乾燥物とコラーゲンゲルとからなる複合材料を移植した
結果である。移植後4週目に試料を摘出して、10%中性緩衝ホルマリン液(和
20 光純薬株式会社)で固定した。この試料をマイクロCTスキャナで撮影した。マ
イクロCTは、東陽テクニカ社製SKYSCAN1172高分解能X線マイクロ
CTスキャナを使用した。撮影後、同スキャナに付属の再構成ソフトウェアNR
e c o nを用いて再構成した。さらに、この再構成画像を三次元ボリュームレン
ダリングソフトVGStudio Max(日本ビジュアルサイエンス株式会
25 社)を用いて可視化した。上段は、マイクロCT撮影後再構成し可視化した移植
中心部の断層画像で、大腿骨に対する水平断層図。下段は、同部分の立体画像。

図41Bは、41A試料のHE染色結果である。図41AでのマイクロCT撮影後、脱脂脱灰を行い、パラフィン包埋して、薄切標本を作製し、HE染色した。左図はコラーゲンゲルのみを移植したHE標本であり、右図は該因子の凍結乾燥物とコラーゲンゲルから成る複合材料を移植したHE標本である。右図において

5 は左図に比べて、旺盛な骨形成像が診られる。

図42Aは、大腿骨に作製した骨欠損のサイズが直径2.5mmの骨欠損に移植した4週後の結果である。左列はコラーゲンゲルのみを移植した結果であり、右列は該因子の濃縮凍結乾燥物とコラーゲンゲルから成る複合材料を移植した結果である。移植後4週目に試料を摘出して、10%中性緩衝ホルマリン液（和光純薬株式会社）で固定した。この試料をマイクロCTスキャナで撮影した。マイクロCTは、東陽テクニカ社製SKYSCAN1172高分解能X線マイクロCTスキャナを使用した。撮影後、同スキャナに付属の再構成ソフトウェアNReconを用いて再構成した。さらに、この再構成画像を三次元ボリュームレンダリングソフトVGStudio Max（日本ビジュアルサイエンス株式会社）を用いて可視化した。上段は、マイクロCT撮影後再構成し可視化した移植中心部の断層画像で、大腿骨に対する水平断層図。下段は、同部分の立体画像。

10

15

図42Bは、図42A試料のHE染色結果である。図42AでのマイクロCT撮影後、脱脂脱灰を行い、パラフィン包埋して、薄切標本を作製し、HE染色した。右図（本発明による因子の凍結乾燥物とコラーゲンゲルとからなる複合材料を移植したHE標本）においては左図（コラーゲンゲルのみを移植したHE標本）に比べて、良好な骨欠損の修復が診られる。

20

発明を実施するための最良の形態

以下、本発明を説明する。本明細書の全体にわたり、単数形の表現は、特に言及しない限り、その複数形の概念をも含むことが理解されるべきである。従って、単数形の冠詞（例えば、英語の場合は「a」、「an」、「the」など）は、

25

特に言及しない限り、その複数形の概念をも含むことが理解されるべきである。

また、本明細書において使用される用語は、特に言及しない限り、当上記分野で通常用いられる意味で用いられることが理解されるべきである。したがって、他に定義されない限り、本明細書中で使用されるすべての専門用語および科学技術用語は、本発明の属する分野の当業者によって一般的に理解されるのと同じ意味を有する。矛盾する場合、本明細書（定義を含めて）が優先する。

（用語の定義）

以下に本明細書において特に使用される用語の定義を列挙する。

本明細書において「複合材料」とは、細胞と足場を含む材料をいう。

10 本明細書における「骨欠損」には、骨腫瘍、骨粗しょう症、リウマチ性関節炎、変形性関節症、骨髄炎および骨壊死などの病変；骨固定術、椎間拡張術および骨切術などの矯正手術；複雑骨折などの外傷および腸骨採取などによって生じる骨の欠損などが挙げられるが、これらに限定されない。

15 本明細書において使用される場合、骨形成の「促進」とは、すでに骨形成が起こっている場合に、目的とする変化を加えると、その骨形成の速度が増加することをいう。骨形成の「誘発」とは、骨形成が起こっていない場合に、目的とする変化を加えると骨形成が生じることをいう。

骨の欠損部位の「修復」とは、その欠損部位が健常状態になるか、またはそれに近づくことをいう。

20 本明細書において「固定のみでは修復できない大きさ」とは、インプラントおよび骨補填材料の使用が不可欠である大きさをいう。

（細胞）

25 本明細書において「成長軟骨細胞 (growth cartilage cell)」とは、発生期または成長期および骨折修復期または骨増殖期に、骨を形成する組織（すなわち成長軟骨）にある細胞をいう。成長期に骨を形成する組織を成長軟骨と呼ぶのが一般的であるが、本明細書では、発生期、成長期、骨増殖期または骨折修復期

に骨を形成する組織を意味する。成長軟骨細胞はまた、肥大（化）軟骨細胞、石灰化軟骨細胞、または骨端（線）軟骨細胞ともいわれる。成長軟骨細胞がヒトに対して用いられる場合、この成長軟骨細胞はヒト由来であることが好ましいが、周知技術により拒絶反応等の問題が克服できることから、ヒト以外に由来する細胞でも用いることができる。

本発明における成長軟骨細胞は、哺乳類動物、好ましくは、ヒト、マウス、ラットまたはウサギ由来である。

本発明における成長軟骨細胞は、肋骨の骨軟骨移行部、大腿骨、脛骨、腓骨、上腕骨、尺骨および橈骨などの長管骨の骨端線部、脊椎骨の骨端線部、手骨、足骨および胸骨などの成長軟骨帯、軟骨膜、胎児の軟骨から形成された骨原基部、骨折治癒時の仮骨部、ならびに骨増殖期の軟骨部から採取され得る。これらの成長軟骨細胞は、例えば、本明細書の実施例に記載される方法によって調製され得る。

本明細書において「肥大化能を有する軟骨細胞」とは、将来的に肥大化する能力のある細胞をいう。肥大化能を有する軟骨細胞は、天然でとれる「成長軟骨細胞」に加えて、本明細書において以下に定義される「肥大化能」の判定法により肥大化能を有する任意の細胞を含む。

本発明における肥大化能を有する軟骨細胞は、哺乳類動物、好ましくは、ヒト、マウス、ラットまたはウサギ由来である。肥大化能を有する軟骨細胞がヒトに対して用いられる場合、この肥大化能を有する軟骨細胞はヒト由来であることが好ましいが、周知技術により拒絶反応等の問題が克服できることから、ヒト以外に由来する細胞でも用いることができる。本発明における肥大化能を有する軟骨細胞は、例えば、肋骨の骨軟骨移行部、大腿骨、脛骨、腓骨、上腕骨、尺骨および橈骨などの長管骨の骨端線部、脊椎骨の骨端線部、手骨、足骨および胸骨などの成長軟骨帯、軟骨膜、胎児の軟骨から形成された骨原基部、骨折治癒時の仮骨部、ならびに骨増殖時の軟骨部から採取され得る。本発明における肥大化能を有する

軟骨細胞は、未分化細胞を分化誘導させて得ることも可能である。

本発明における肥大化能を有する軟骨細胞は、上記部位に限らずどのような場所から採取されたものであってもよい。なぜなら、内軟骨性骨化（軟骨内骨化）によって形成される骨は、体の部位に依らず、すべて同じ機序で形成されるからである。すなわち、軟骨が形成されて、それが骨に置換される。頭蓋骨と鎖骨を除く体のほとんどの骨は、この内軟骨性骨化（軟骨内骨化）によって形成される。したがって、頭蓋骨と鎖骨を除く体のほとんどの骨には、肥大化能を有する軟骨細胞が存在し、その細胞は骨形成を行なう能力を有する。

肥大化能を有する軟骨細胞は、形態学的には肥大化することを特徴とする。

本明細書において「肥大化」とは、検鏡下で形態学的に判断され得る。細胞の肥大化は、細胞が柱状配列をしている場合には増殖層に続いて観察され、柱状配列していない場合には、周囲細胞と比較してより大きい状態をいう。

肥大化能は、 5×10^5 個の前記細胞を含むHAM's F12培養液を遠心することにより該細胞のペレットを作製し、該細胞ペレットを一定期間培養し、顕微鏡下に確認した培養前の細胞の大きさと培養後の細胞の大きさを比較し、有意な成長が確認されたときに、肥大化能を有すると判定される。

本明細書において、「静止軟骨細胞」とは、肋軟骨の肋骨移行部（成長軟骨部）から離れた部分に位置する軟骨をいい、生涯に亘って軟骨として存在する組織である。静止軟骨部にある細胞を静止軟骨細胞という。本明細書において、

「関節軟骨細胞」とは、関節面に存在する軟骨組織（関節軟骨）にある細胞をいう。

本明細書において、軟骨細胞は、マーカーとして、II型コラーゲン、軟骨型プロテオグリカン（アグリカン）またはその成分、ヒアルロン酸、IX型コラーゲン、XI型コラーゲンまたはコドロモジュリンからなる群より選択される少なくとも1つを発現していることを確認することにより判定される。軟骨細胞のうち、肥大化能を有する細胞は、さらにX型コラーゲン、アルカリホスファターゼ

およびオステオネクチンからなる群より選択される少なくとも1つを発現していることを確認することによって判定される。X型コラーゲン、アルカリホスファターゼまたはオステオネクチンのいずれも発現していない軟骨細胞は、肥大化能を有していないと判定される。従って、本明細書における肥大化能を有する軟骨細胞は、形態学的に肥大化することを確認する代わりに、軟骨細胞マーカー群より選択される少なくとも1つおよび肥大化能を有する軟骨細胞マーカー群より選択される少なくとも1つを発現していることを確認することによっても判定され得る。マーカーは、特異的な染色法、免疫組織化学的な手法、*in situ*ハイブリダイゼーション法、ウェスタンブロッティング法またはPCR法などの培養細胞から抽出したタンパク質またはRNAを解析する手法で、局在または発現が同定される。

本明細書において「軟骨細胞マーカー」とは、軟骨細胞において、その局在または発現が軟骨細胞を同定するにおいて補助となるものをいう。好ましくは、その局在または発現（例えば、I型コラーゲン、軟骨型プロテオグリカン（アグリカン）またはその成分、ヒアルロン酸、IX型コラーゲン、XI型コラーゲンまたはコドロモジュリンの局在または発現）によって軟骨細胞であることが同定できるものをいう。本明細書において「肥大化能を有する軟骨細胞マーカー」とは、肥大化能を有する軟骨細胞において、その局在または発現が軟骨細胞を同定するにおいて補助となるものをいう。好ましくは、その局在または発現（例えば、X型コラーゲン、アルカリホスファターゼまたはオステオネクチンの局在または発現）によって肥大化能を有する軟骨細胞であることが同定できるものをいう。

本明細書において、「軟骨型プロテオグリカン」とは、コアタンパク質にコンドロイチン4硫酸、コンドロイチン6硫酸、ケラタン硫酸、O-結合オリゴ糖、N-結合オリゴ糖などのグルコサミノグリカンが多数結合した高分子をいう。この軟骨型プロテオグリカンは、さらにリンクタンパクを介してヒアルロン酸と結合して軟骨型プロテオグリカン集合体を形成する。軟骨組織においてグルコサミ

ノグリカンが豊富で、乾燥重量の20～40%を占める。軟骨型プロテオグリカンは、アグリカンとも称される。

本明細書において、「骨型プロテオグリカン」とは、軟骨型プロテオグリカンより分子量が小さく、コアタンパク質にコンドロイチン硫酸、デルマトン硫酸、
5 O-結合オリゴ糖、N-結合オリゴ糖などのグルコサミノグリカンが結合した高分子をいう。骨組織におけるグルコサミノグリカンは、脱灰骨の乾燥重量の1%以下である。骨型プロテオグリカンとしては、例えば、デコリン、バイグリカンが挙げられ得る。

本明細書において「骨芽細胞」とは、骨基質上に存在し、骨基質形成およびその石灰化を行う細胞である。骨芽細胞は、20～30 μm で、立方体または円柱状の細胞である。本明細書において使用される場合、骨芽細胞は、骨芽細胞の前駆体細胞である「前骨芽細胞」を含み得る。

骨芽細胞は、マーカーとして、I型コラーゲン、骨型プロテオグリカン（例えば、デコリン、バイグリカン）、アルカリホスファターゼ、オステオカルシン、
15 基質Glaタンパク質、オステオグリシン、オステオポンチン、骨シアル酸タンパク質、オステオネクチンまたはプレイオトロフィン（Pleiotrophin）からなる群より選択される少なくとも1つを発現することによって判定される。加えて、骨芽細胞は、軟骨細胞マーカーであるII型コラーゲン、軟骨型プロテオグリカン（アグリカン）またはその成分、ヒアルロン酸、IX型コラーゲン、
20 XI型コラーゲンまたはコドロモジュリンを発現していないことを確認することによって確定され得る。マーカーは、特異的な染色法、免疫組織化学的な手法、in situハイブリダイゼーション法、ウェスタンブロッティング法またはPCR法などの培養細胞から抽出したタンパク質またはRNAを解析する手法で、局在または発現が同定される。

本明細書において「骨芽細胞マーカー」とは、骨芽細胞において、その局在または発現が骨芽細胞を同定するにおいて補助となるものをいう。好ましくは、そ

の局在または発現（例えば、I型コラーゲン、骨型プロテオグリカン（例えば、デコリン、バイグリカン）、アルカリホスファターゼ、オステオカルシン、基質Glaタンパク質、オステオグリシン、オステオポンチン、骨シアル酸タンパク質、オステオネクチンまたはプレイオトロフィンの局在または発現）によって骨芽細胞であることを確認することができるものをいう。オステオグリシンは、骨誘導因子（OIF）ともいわれる。オステオポンチンは、BSP-I、2arともいわれる。骨シアル酸タンパク質は、BSP-IIともいわれる。プレイオトロフィンは、osteoblast specific protein(OSF-1)、骨芽細胞特異的因子-1ともいわれる。オステオネクチンは、SPARC、BM-40ともいわれる。

骨芽細胞であると認定するためには、骨芽細胞のみを陽性と識別するマーカーで陽性であることを示すか；骨芽細胞と肥大化能を有する軟骨細胞とを陽性と識別し、軟骨細胞を陰性と識別するマーカーで陽性であり、かつ骨芽細胞と軟骨細胞とを陽性と識別し、肥大化能を有する軟骨細胞を陰性と識別するマーカーで陽性であることを示すか；骨芽細胞と肥大化能を有する軟骨細胞とを陽性と識別するマーカーで陽性であり、かつ、骨芽細胞を陰性と識別し肥大化能を有する軟骨細胞を陽性と識別するマーカーで陰性であることを示すか；または骨芽細胞と軟骨細胞とを陽性と識別するマーカーで陽性であり、かつ、骨芽細胞を陰性と識別し軟骨細胞を陽性と識別するマーカーで陰性であることなどを示せばよい。

肥大化能を有する軟骨細胞であると認定するためには、肥大化能を有する軟骨細胞のみを陽性と識別するマーカーで陽性であることを示すか；肥大化能を有する軟骨細胞と骨芽細胞とを陽性と識別し軟骨細胞を陰性と識別するマーカーで陽性であり、かつ、肥大化能を有する軟骨細胞と軟骨細胞とを陽性と識別し骨芽細胞を陰性と識別するマーカーで陽性であることを示すか；肥大化能を有する軟骨細胞と骨芽細胞とを陽性と識別するマーカーで陽性であり、かつ、肥大化能を有する軟骨細胞を陰性と識別し骨芽細胞を陽性と識別するマーカーで陰性であることを示すか；または肥大化能を有する軟骨細胞と軟骨細胞とを陽性と識別するマ-

カーで陽性であり、かつ、肥大化能を有する軟骨細胞を陰性と識別し軟骨細胞を陽性と識別するマーカーで陰性であることなどを示せばよい。

(肥大化能を有しない) 軟骨細胞であると認定するためには、軟骨細胞のみを陽性と識別するマーカーで陽性あることを示すか；軟骨細胞と骨芽細胞とを陽性と識別し肥大化能を有する軟骨細胞を陰性と識別するマーカーで陽性であり、かつ、軟骨細胞と肥大化能を有する軟骨細胞とを陽性と識別し骨芽細胞を陰性と識別するマーカーで陽性であることを示すか；軟骨細胞と骨芽細胞とを陽性と識別するマーカーで陽性であり、かつ、軟骨細胞を陰性と識別し骨芽細胞を陽性と識別するマーカーで陰性であることを示すか；または軟骨細胞と肥大化能を有する軟骨細胞とを陽性と識別するマーカーで陽性であり、かつ、軟骨細胞を陰性と識別し肥大化能を有する軟骨細胞を陽性と識別するマーカーで陰性であることなどを示せばよい。

本明細書において、軟骨細胞、肥大化能を有する軟骨細胞、骨芽細胞および誘導骨芽細胞を認定するためには、例えば、以下の表に列挙される細胞マーカーの組み合わせが用いられ得る。

	軟骨細胞	肥大化能を有する軟骨細胞	骨芽細胞 誘導骨芽細胞
II型コラーゲン、軟骨型プロテオグリカン(アグリカン)、ヒアルロン酸、IX型コラーゲン、XI型コラーゲン、コドロモジュリン	○	○	×
X型コラーゲン	×	○	×
アルカリホスファターゼ、オステオネクチン	×	○	○
I型コラーゲン、骨型プロテオグリカン(例えば、デコリン、バイグリカン)、オステオカルシン、基質Glaタンパク質、オステオグリシン、オステオポンチン、骨シアル酸タンパク質、プレイオトロフィン	×	×	○

本明細書において、軟骨細胞と、肥大化能を有する軟骨細胞と、骨芽細胞とは、前記マーカー以外にも細胞の形態、各種染色を観察することにより識別することができる。

5 軟骨細胞は、検鏡下では、数個の細胞が集まり、酸性トルイジン青染色でメタクロマジーを示し、アルシアン青染色で青く染まり、サフラニンO染色で赤く染まり、かつアルカリホスファターゼ染色されない細胞である。

肥大化能を有する軟骨細胞は、検鏡下では、細胞が柱状配列をしている場合には増殖層に続いて観察されて増殖層細胞より大きい状態を示し、柱状配列していない場合には、周囲細胞と比較してより大きい状態を示し、酸性トルイジン青染色でメタクロマジーを示し、アルシアン青染色で青く染まり、サフラニンO染色
10 で赤く染まり、かつアルカリホスファターゼ染色される細胞である。

骨芽細胞は、20～30 μm で、立方体または円柱状の形態を示し、かつアルカリホスファターゼ活性を示す細胞である。

上記アルカリホスファターゼ活性は、A) サンプル100 μl に、50 μl の
15 4 mg/mlのp-ニトロフェニルリン酸を含む溶液およびアルカリバッファー（シグマ社、A9226）を加え、37℃で15分間反応させ、1N NaOHを50 μl 添加することによって反応を止めたときの吸光度と、その後濃塩酸を20 μl 添加したときの405 nmの吸光度とを測定する工程；およびB) 該濃塩酸の添加前後の該吸光度の差を計算する工程によって決定される。この吸光度
20 の差が該アルカリホスファターゼ活性の指標であり、吸光度の差の絶対値を増加させたときに、活性があることを示すと判断される。

このアルカリホスファターゼ活性はまた、A) サンプル100 μl に、50 μl の4 mg/mlのp-ニトロフェニルリン酸を含む溶液およびアルカリバッファー（シグマ社、A9226）を加え、37℃で15分間反応させ、1N NaOHを50 μl 添加することによって反応を止めたときの吸光度と、その後濃塩酸を20 μl 添加したときの405 nmの吸光度とを測定する工程；およびB)

25

濃塩酸の添加前後の吸光度の差を計算する工程によって決定される。この吸光度の差が該アルカリホスファターゼ活性の指標であり、吸光度の差の相対値を少なくとも約1倍より高く上昇させたときに、活性があることを示すと判断される。実験ごとにp-ニトロフェノール濃度が0～10mMの溶液を作製し、その吸光度を測定し、横軸に濃度を、縦軸に吸光度を取り、それらの値を一次直線で近似したものを用いる。吸光度から絶対値は、この検量線より算出することができる。

本明細書において「誘導骨芽細胞」とは、本発明による誘導骨芽細胞分化誘導因子によって未分化細胞から誘導された細胞をいう。この誘導骨芽細胞は、A) 肥大化能を有する軟骨細胞を、グルコルチコイド、 β -グリセロホスフェートおよびアスコルビン酸からなる群より選択される少なくとも1つを含む分化因子産生培地において培養して得られる上清または該上清中に存在する誘導骨芽細胞分化誘導因子を提供する工程；およびB) 該上清または該誘導骨芽細胞分化誘導因子と、培地成分とを含む未分化細胞培養培地で、未分化細胞を誘導骨芽細胞への誘導に十分な条件下で培養する工程を包含する方法によって産生され得る。上記誘導骨芽細胞はまた、A) 肥大化能を有する軟骨細胞を、デキサメサゾン、 β -グリセロホスフェート、アスコルビン酸および血清成分を含む分化因子産生培地において培養した結果得られる誘導骨芽細胞分化誘導因子を提供する工程；およびB) 該誘導骨芽細胞分化誘導因子と培地成分とを含む未分化細胞培養培地で、未分化細胞を培養して誘導骨芽細胞へ分化させる工程を包含する方法によっても誘導され得る。本発明の誘導骨芽細胞は、酸性トリジン青染色により異染性を示さず、かつサフラニンO染色において陰性を示し得る。

本明細書において「誘導骨芽細胞マーカー」とは、誘導骨芽細胞において、その局在または発現が誘導骨芽細胞を同定するにおいて補助となるものをいう。例えば、その局在または発現によって誘導骨芽細胞であることを確認することができるものをいう。誘導骨芽細胞は、天然の骨芽細胞と同様に、以下のようなマ-

カーの局在または発現（例えば、I型コラーゲン、骨型プロテオグリカン（例えば、デコリン、バイグリカン）、アルカリホスファターゼ、オステオカルシン、基質G1aタンパク質、オステオグリシン、オステオポンチン、骨シアル酸タンパク質、オステオネクチンまたはプレイオトロフィンの局在または発現）によって誘導骨芽細胞であることを確認することができる。

本明細書において「分化誘導」とは、細胞、組織または器官のような生物の部分の状態の発達過程であって、特徴のある組織または器官の形成を誘導する過程をいう。「分化」、「分化誘導」は、主に発生学（embryology）、発生生物学（developmental biology）などにおいて使用されている。1個の細胞からなる受精卵が分裂を行い成体になるまで、生物は種々の組織および器官を形成する。分化前または分化が十分でない場合のような生物の発生初期は、一つ一つの細胞または細胞群が何ら形態的または機能的特徴を示さず区別することが困難である。このような状態を「未分化」であるという。「分化」は、器官のレベルでも生じ、器官を構成する細胞がいろいろの違った特徴的な細胞または細胞群へと発達する。これも器官形成における器官内での分化といい、このような発達を誘導することも、分化誘導という。

本明細書において、「誘導骨芽細胞分化誘導能」とは、未分化細胞、好ましくは、胚性幹（ES）細胞、胚性生殖（EG）細胞または体性幹細胞、より好ましくは、間葉系幹細胞を本発明の誘導骨芽細胞に分化誘導する能力をいう。この誘導骨芽細胞分化誘導能の一つの指標として、誘導骨芽細胞マーカー（例えば、アルカリホスファターゼ）が使用され得る。具体的には、本発明において使用される因子は、イーグル基礎培地中でC3H10T1/2細胞にこの因子を曝露した場合あるいは最小必須培地（MEM）中で間葉系幹細胞にこの因子を曝露した場合、因子を含まない各培地において各細胞を培養した場合と比較して、各細胞のアルカリホスファターゼ（ALP）活性（例えば、この細胞全体におけるアルカリホスファターゼ活性）を、少なくとも約1倍より高く上昇させたときに誘導骨

芽細胞分化誘導能を有すると判断される。このアルカリホスファターゼ活性は、
A) 該因子を含むかまたは含まないサンプル $100\mu\text{l}$ に、それぞれ $50\mu\text{l}$ の
 $4\text{mg}/\text{ml}$ の p-ニトロフェニルリン酸を含む溶液およびアルカリバッファー
(シグマ社、A9226) を加え、 37°C で 15 分間反応させ、 1N NaOH
5 を $50\mu\text{l}$ 添加することによって反応を止めたときの吸光度と、その後濃塩酸を
 $20\mu\text{l}$ 添加したときの 405nm の吸光度とを測定する工程；および B) 該濃
塩酸の添加前後の該吸光度の差を計算する工程であって、該吸光度の差が、該ア
ルカリホスファターゼ活性の指標である、工程によって決定される。また、本発
明において使用される因子は、イーグル基礎培地中で $\text{C3H10T1}/2$ 細胞に
10 この因子を曝露した場合あるいは最小必須培地 (MEM) 中で間葉系幹細胞にこ
この因子を曝露した場合、各細胞のアルカリホスファターゼ (ALP) 活性 (例え
ば、この細胞全体におけるアルカリホスファターゼ活性) を増加させたときに誘
導骨芽細胞分化誘導能を有すると判断される。このアルカリホスファターゼ活性
は、A) 該因子を含むかまたは含まないサンプル $100\mu\text{l}$ に、それぞれ 50μ
15 1 の $4\text{mg}/\text{ml}$ の p-ニトロフェニルリン酸を含む溶液およびアルカリバッフ
ァー (シグマ社、A9226) を加え、 37°C で 15 分間反応させ、 1N Na
 OH を $50\mu\text{l}$ 添加することによって反応を止めたときの吸光度と、その後濃塩
酸を $20\mu\text{l}$ 添加したときの 405nm の吸光度とを測定する工程；および B)
濃塩酸の添加前後の吸光度の差を計算する工程であって、吸光度の差が、アルカ
20 リホスファターゼ活性の指標である、工程によって決定される。実験ごとに p-
ニトロフェノール濃度が $0\sim 10\text{mM}$ の溶液を作製し、その吸光度を測定し、横
軸に濃度を、縦軸に吸光度を取り、それらの値を一次直線で近似したものを検量
線とする。吸光度から絶対値は、この検量線より算出することができる。

このアルカリホスファターゼ活性は、骨形成の指標として従来使用されており、
25 アルカリホスファターゼ活性が上昇すると、一般に骨形成が促進したと判断され

ている（須田立雄編、「骨形成と骨吸収及びそれらの調節因子 1」、株式会社
廣川書店、平成7年、3月30日、p. 39-44）。

本明細書において、未分化細胞（例えば、胚性幹細胞、胚性生殖細胞、間葉系
幹細胞、造血系幹細胞、血管幹細胞、肝幹細胞、膝幹細胞、神経幹細胞など）に
5 対する「誘導骨芽細胞分化誘導能」とは、未分化細胞を誘導骨芽細胞に分化誘導
させる能力をいう。例えば、誘導骨芽細胞分化誘導能は、グルココルチコイド、
 β -グリセロホスフェートおよびアスコルビン酸によって分化誘導されない未分
化細胞を、誘導骨芽細胞に分化誘導させる能力を含み得る。誘導骨芽細胞分化誘
導能は、対象とする細胞を、 1.25×10^4 細胞/cm²で24穴プレート
10 （ベクトン・ディッキンソン社製、 2.5×10^4 /穴）に均一に播種し、3
7℃にて5% CO₂インキュベーター中で72時間培養した場合、誘導骨芽細
胞マーカーの少なくとも一種を発現誘導また発現上昇を測定することによって判
定され得る。

本明細書において「未分化細胞」とは、最終分化に至っていない細胞、まだ分
15 化し得る細胞をいう。本明細書で使用する場合、未分化細胞は幹細胞（例えば、
胚性幹細胞、胚性生殖細胞または体性幹細胞）であり得、例えば、間葉系幹細胞
（例えば、骨髄由来間葉系幹細胞など）、造血幹細胞、血管幹細胞、肝幹細胞、
膝幹細胞または神経幹細胞であり得る。さらに、未分化細胞は、分化経路にある
すべての細胞を含み、例えば、C3H10T1/2細胞、ATDC5細胞、3T
20 3-Swiss albino細胞、BALB/3T3細胞、NIH3T3細胞、
PT-2501、初代ラット骨髄由来幹細胞であり得る。これらの細胞は、大日
本住友製薬だけでなく、国内外の販売会社（三光純薬、コスモバイオ社、タカラ
バイオ社、東洋紡績社、住商ファーマバイオメディカル社、Cambrex社、StemCell
Technology社、Invitrogen社）や細胞バンク等からも入手可能である。本発明に
25 おいて使用される未分化細胞は、誘導骨芽細胞への分化を達成することができる
限りどのような細胞でもあってもよい。本発明において使用される未分化細胞は、

哺乳動物（例えば、ヒト、ラット、マウス、ウサギなど）に由来する細胞であり得る。これらとしては、例えば、ラット骨髄から採取した間葉系幹細胞が挙げられ得る。

本明細書において「幹細胞」とは、自己複製能を有し、多分化能（すなわち多能性）（「pluripotency」）を有する細胞をいう。幹細胞は通常、組織が傷害を受けたときにその組織を再生することができる。本明細書では幹細胞は、胚性幹（E S）細胞、胚性生殖（E G）幹細胞または体性幹細胞（組織幹細胞、組織特異的幹細胞ともいう）であり得るがそれらに限定されない。また、上述の能力を有している限り、人工的に作製した細胞（たとえば、本明細書において記載される融合細胞、再プログラム化された細胞など）もまた、幹細胞であり得る。胚性幹細胞とは初期胚に由来する多能性幹細胞をいう。胚性幹細胞は、1981年に初めて樹立され、1989年以降ノックアウトマウス作製にも応用されている。1998年にはヒト胚性幹細胞が樹立されており、再生医学にも利用されつつある。胚性生殖幹細胞は、始原生殖細胞が特定の環境因子にさらされることにより脱分化して形成されると考えられている細胞であり、胚性幹細胞としての性質をもちながら、由来した始原生殖細胞の性質も一部保持している。体性幹細胞は、胚性幹細胞とは異なり、組織中に存在し、胚性幹細胞より多能性のレベルが低く、分化の方向性が限定されている細胞である。一般に幹細胞は未分化な細胞内構造をしており、核／細胞質比が高く、細胞内小器官が乏しい。本明細書において使用される場合は、幹細胞は好ましくは間葉系幹細胞であり得るが、状況に応じて他の体性幹細胞、胚性生殖細胞または胚性幹細胞も使用され得る。

由来する部位により分類すると、体性幹細胞は、例えば、皮膚系、消化器系、骨髄系、神経系などに分けられる。皮膚系の体性幹細胞としては、表皮幹細胞、毛嚢幹細胞などが挙げられる。消化器系の体性幹細胞としては、膵幹細胞、肝幹細胞などが挙げられる。骨髄系の体性幹細胞としては、造血幹細胞、間葉系幹細胞

胞などが挙げられる。神経系の体性幹細胞としては、神経幹細胞、網膜幹細胞などが挙げられる。

細胞は、由来により、外胚葉、中胚葉および内胚葉に由来する幹細胞に分類され得る。外胚葉由来の細胞は、主に脳に存在し、神経幹細胞などが含まれる。中
5 胚葉由来の細胞は、主に骨髄に存在し、血管幹細胞、造血幹細胞および間葉系幹細胞などが含まれる。内胚葉由来の細胞は主に内臓器に存在し、肝幹細胞、膵幹細胞などが含まれる。

本明細書において「間葉系幹細胞」とは、間葉系の組織に見出される幹細胞をいう。間葉系の組織としては、骨髄、脂肪、血管内皮、平滑筋、心筋、骨格筋、
10 軟骨、骨、じん帯が挙げられるが、これらに限定されない。間葉系幹細胞は、代表的には、骨髄、脂肪組織、滑膜組織、筋組織、末梢血、胎盤組織、月経血または臍帯血（好ましくは、骨髄）に由来する幹細胞であり得る。

本明細書において「増殖培地」とは、基礎培地、抗生物質（例えば、ペニシリンおよびストレプトマイシン）、抗菌剤（例えば、アンホテリシンB）および血
15 清成分（例えば、ヒト血清、ウシ血清、ウシ胎仔血清）を含んでいる培地をいう。代表的には、血清成分は、0～20%程度添加され得る。さらに、基礎培地が最小必須培地（MEM）である場合、「MEM増殖培地」といい、基礎培地がHam's F12培地（HAM）である場合、「HAM増殖培地」という。

本明細書において「分化因子産生培地」とは、基礎培地を含み、かつグルココ
20 ルチコイド、 β -グリセロホスフェートおよびアスコルビン酸からなる群より選択される従来型骨芽細胞分化誘導成分の少なくとも1つを含んでいる培地をいう。分化因子産生培地は、 β -グリセロホスフェートおよびアスコルビン酸からなる群より選択される従来型骨芽細胞分化誘導成分の少なくとも1つを含んでいてもよい。分化因子産生培地は、従来型骨芽細胞分化誘導成分として、グルココ
25 ルチコイド、 β -グリセロホスフェートおよびアスコルビン酸のすべてを含んでいてもよい。好ましくは、分化因子産生培地は、基礎成分として、最小必須培地（M

EM) を含み、従来型骨芽細胞分化誘導成分として β -グリセロホスフェートおよびアスコルビン酸のすべてを含む。好ましくは、「分化因子産生培地」は、血清成分（例えば、ヒト血清、ウシ血清、ウシ胎仔血清）をさらに含んでもよい。代表的には、血清成分は、0～20%程度添加され得る。分化因子産生培地は、より好ましくは、グルココルチコイド、 β -グリセロホスフェート、アスコルビン酸および血清成分を含み得る。さらに、基礎培地が最小必須培地（MEM）である場合、「MEM分化因子産生培地」といい、基礎培地がHam's F12培地（HAM）である場合、「HAM分化因子産生培地」という。この分化因子産生培地自体には、C3H10T1/2細胞、3T3-Swiss albino細胞、Balb 3T3細胞、NIH3T3細胞を骨芽細胞に分化誘導させる能力は見出されていない。従って、本発明による因子は、分化因子産生培地中に含まれる成分とは異なると考えられる。

本明細書において「従来型骨芽細胞分化誘導成分」とは、Maniopoulosらによって提唱されたもので（Maniopoulos, C: Bone formation in vitro by stromal cells obtained from bone marrow of young adult rats. Cell Tissue Res, 254: 317-330, 1988.）、以来、骨髓細胞から骨芽細胞を分化誘導させる場合に使用されている成分であって、グルココルチコイド、 β -グリセロホスフェートおよびアスコルビン酸の組み合わせをいう。

本明細書において「グルココルチコイド」とは、副腎皮質ホルモンであり、糖質代謝に関係するステロイドホルモンの総称である。グルココルチコイドは、骨髓細胞が骨芽細胞に分化誘導するための成分としても知られている（Maniopoulos, C: Bone formation in vitro by stromal cells obtained from bone marrow of young adult rats. Cell Tissue Res, 254: 317-330, 1988.）が、上記の細胞に対する分化誘導の効果は知られていない。グルココルチコイドは、糖質コルチコイドとも称される。代表的には、デキサメサゾン、ベタメタゾン、プレドニロン、プレドニソン、コルチゾン、コルチゾル、コルチコステロンなどが

挙げられるが、これらに限定されない。好ましくは、デキサメサゾンが使用される。天然のグルココルチコイドと同様な作用を有する化学合成物質も含まれ得る。これらの代表的なグルココルチコイドは、 β -グリセロホスフェートおよびアスコルビン酸とともに、肥大化能を有する軟骨細胞の培養に使用されると、C3H 10T1/2細胞を骨芽細胞へと分化誘導する活性を有する因子を産生することから、本発明においていずれも分化因子産生培地中に含ませることができる。グルココルチコイドは、分化因子産生培地中に、0.1 nM~10 mMの濃度で含ませることができ、好ましくは、10~100 nMの濃度である。

本明細書において「 β -グリセロホスフェート」とは、グリセリン酸 ($C_3H_5(OH)_2OPO_3H_2$) のうちリン酸基が β 位に結合したものの塩の総称である。塩としては、カルシウム塩、ナトリウム塩などを挙げることができる。 β -グリセロホスフェートは、骨髄細胞が骨芽細胞に分化誘導するための成分としても知られている (Maniatopoulos, C: Bone formation in vitro by stromal cells obtained from bone marrow of young adult rats. Cell Tissue Res, 254: 317-330, 1988.) が、上記の細胞に対する分化誘導の効果は知られていない。 β -グリセロホスフェートは、グルココルチコイドおよびアスコルビン酸とともに、肥大化能を有する軟骨細胞の培養に使用されると、C3H 10T1/2細胞を骨芽細胞へと分化誘導する活性を有する因子を産生することから、本発明においていずれも分化因子産生培地中に含ませることができる。 β -グリセロホスフェートは、分化因子産生培地中に、0.1 mM~1 Mの濃度で含ませることができ、好ましくは、10 mMの濃度である。

本明細書において「アスコルビン酸」とは、白色、結晶性の水溶性ビタミンであり、多くの植物体とくに柑橘類に含まれている。ビタミンCとも称される。アスコルビン酸は、骨髄細胞が骨芽細胞に分化誘導するための成分としても知られている (Maniatopoulos, C: Bone formation in vitro by stromal cells obtained from bone marrow of young adult rats. Cell Tissue Res, 254 317-330, ...)

1988.) が、上記の細胞に対する分化誘導の効果は知られていない。本発明において、アスコルビン酸は、アスコルビン酸およびその誘導体を含み得る。アスコルビン酸としては、例えば、L-アスコルビン酸、L-アスコルビン酸ナトリウム、L-アスコルビン酸パルミチン酸エステル、L-アスコルビン酸ステアリン酸エステル、L-アスコルビン酸2-グルコシド、アスコルビン酸リン酸エステル、L-アスコルビン酸2-リン酸マグネシウム、アスコルビン酸グルコシドが挙げられるが、これらに限定されない。天然のアスコルビン酸と同様な作用を有する化学合成物質も含まれ得る。これらの代表的なアスコルビン酸は、グルココルチコイド、 β -グリセロホスフェートとともに、肥大化能を有する軟骨細胞の培養に使用されると、C3H10T1/2細胞を骨芽細胞へと分化誘導する活性を有する因子を産生することから、本発明においていずれも分化因子産生培地中に含ませることができる。アスコルビン酸は、分化因子産生培地中に、 $0.1 \mu\text{g}/\text{ml} \sim 5 \text{mg}/\text{ml}$ の濃度で含ませることができ、好ましくは、 $10 \sim 50 \mu\text{g}/\text{ml}$ の濃度である。

(好ましい実施形態の説明)

以下に本発明の最良の形態を説明する。以下に提供される実施形態は、本発明のよりよい理解のために提供されるものであり、本発明の範囲は以下の記載に限定されるべきでないことが理解される。従って、当業者は、本明細書中の記載を参酌して、本発明の範囲内で適宜改変を行うことができることは明らかである。

(複合材料)

1つの局面において、本発明は、生体内の骨形成を促進または誘発するための複合材料を提供する。この複合材料は、A) 肥大化能を有する軟骨細胞を、グルココルチコイド、 β -グリセロホスフェートおよびアスコルビン酸からなる群より選択される少なくとも1つを含む培地において培養することによって得ることができる、誘導骨芽細胞分化誘導因子、およびB) 生体適合性を有する足場を含み得る。

一つの実施形態において、本発明は、生体内の骨形成を促進または誘発するための複合材料を提供する。この複合材料は、A) 肥大化能を有する軟骨細胞を、デキサメサゾン、 β -グリセロホスフェート、アスコルビン酸および血清成分を含む分化因子産生培地において培養した結果得られる誘導骨芽細胞分化誘導因子、
5 およびB) 生体適合性を有する足場を含み得る。

一つの実施形態において、前記誘導骨芽細胞分化誘導因子は、(1) 前記肥大化能を有する軟骨細胞を培養した培地に存在し得るか、または(2) 該肥大化能を有する軟骨細胞を培養した上清を、分子量50,000の限外濾過に供することにより得られる分子量50,000以上の画分に存在し得る。

10 一つの実施形態において、本発明において使用される誘導骨芽細胞分化誘導因子は、濃縮されたものであり得る。本明細書において「濃縮された」とは、濃度を濃くされた状態をいう。この誘導骨芽細胞分化誘導因子は、1倍以上に濃縮されたものであり得る。好ましくは、この上清は、2倍以上に濃縮されたものであり得る。

15 一つの実施形態において、本発明において使用され得る誘導骨芽細胞分化誘導因子は、固体（例えば、凍結乾燥されたもの）であり得るが、これらに限定されない。なぜなら、足場が溶液である場合には、その足場と接触させることにより液体になり得る。また、足場が固体である場合には十分に接触させるために、溶媒を用いて溶液にすることもあり得るからである。本明細書において「凍結乾燥
20 された」とは、水溶液を凍結させ、凍結状態のまま真空装置で水分を直接昇華させて乾燥させた状態をいう。

一つの実施形態において、本発明の複合材料では、誘導骨芽細胞分化誘導因子は、前記生体適合性を有する足場に付着され得る。本明細書において、「付着」とは、ものがついて離れないこと、くっつくことをいう。本明細書において、誘
25 導骨芽細胞分化誘導因子と生体適合性有する足場とが「付着されている状態」とは、誘導骨芽細胞分化誘導因子と生体適合性有する足場とが接触し、誘導骨芽細

胞分化誘導因子が生体適合性を有する足場の表面または内部孔内について離れない状態（例えば、吸着、含浸、浸漬、接着、粘着、固着等している状態）をいう。

本明細書において「接触」とは、ものが接すること、触れることをいう。誘導骨芽細胞分化誘導因子と生体適合性を有する足場とを「接触させる」とは、誘導骨芽細胞分化誘導因子が生体適合性を有する足場に付着する程度、触れることをいう。

一つの実施形態において、本発明の複合材料では、誘導骨芽細胞分化誘導因子は、前記生体適合性を有する足場に分散され得る。例えば、上記誘導骨芽細胞分化誘導因子と生体適合性を有する足場とが分散されている状態とは、一箇所以上の場所に分かれて存在している状態であり得る。

一つの実施形態において、本発明の複合材料では、前記誘導骨芽細胞分化誘導因子は、例えば、生体適合性を有する足場の表面、該生体適合性を有する足場の内部孔内等の領域に、付着または分散され得る。

一つの実施形態において、本発明の複合材料において使用される生体適合性を有する足場は、ゲル状足場、3次元状足場であり得るが、これらに限定されない。なぜなら、該因子が付着または分散するもの、もしくは付着または分散させることが出来るものであれば、どんなものでも使用できるからである。

一つの実施形態において、本発明の複合材料において使用される生体適合性を有する足場は、例えば、リン酸カルシウム、炭酸カルシウム、アルミナ、ジルコニア、アパタイトーウォラストナイト析出ガラス、ゼラチン、コラーゲン、キチン、フィブリン、ヒアルロン酸、細胞外基質混合物、絹、セルロース、デキストラン、アガロース、寒天、合成ポリペプチド、ポリ乳酸、ポリロイシン、アルギン酸、ポリグリコール酸、ポリメタクリル酸メチル、ポリシアノアクリレート、ポリアクリロニトリル、ポリウレタン、ポリプロピレン、ポリエチレン、ポリ塩化ビニル、エチレン酢酸ビニル共重合体、ナイロン、またはそれらの組み合わせ等であり得るが、これらに限定されない。なぜなら、該因子が付着または分散す

るもの、もしくは付着または分散させることが出来るものであれば、どんなものでも使用できるからである。

好ましくは、前記生体適合性を有する足場は、例えば、多孔質ヒドロキシアパタイト（例えば、HOYA社製アパセラム気孔率50%等）、超多孔質ヒドロキシアパタイト（例えば、HOYA社製アパセラム気孔率85%、BD社製3Dスキヤホールド等）、アパタイトコラーゲン混合体（例えば、HOYA社製アパセラム顆粒と新田ゼラチン社製コラーゲングルとの混合物等）、アパタイトコラーゲン複合体（例えば、HOYA社製アパコラ等）、コラーゲングル（例えば、新田ゼラチン社製等）、コラーゲンスポンジ（例えば、新田ゼラチン社製等）、ゼラチンスポンジ（例えば、山之内製薬社製止血用ゼラチンスポンジ等）、フィブリンゲル（例えば、ニプロ社製ベリプラスTP等）、合成ペプチド（例えば、3Dマトリックス社製プラマックス等）、細胞外基質混合物（例えば、BD社製マトリゲル等）、アルギン酸（例えば、ケルコ社製ケルトンLVCR等）、アガロース（例えば、和光純薬社製アガロース等）、ポリグリコール酸、ポリ乳酸、ポリグリコール酸／ポリ乳酸共重合体、それらの組合せであり得る。より好ましくは、前記生体適合性を有する足場は、ヒドロキシアパタイト、コラーゲングル、細胞外基質であり得る。

好ましい実施形態において、前記生体適合性を有する足場は、ヒドロキシアパタイト、コラーゲン、アルギン酸、ラミニンとコラーゲンIVとエンタクチンとの混合物等であり得る。

一つの実施形態において、本発明の複合材料において肥大化能を有する軟骨細胞を培養するのに使用される培地（本明細書では、分化因子産生培地ともいう。）は、グルココルチコイド（例えば、デキサメサゾン、プレドニソロン、プレドニソン、コルチゾン、ベタメタゾン、コルチゾル、コルチコステロン）、 β -グリセロホスフェート、アスコルビン酸等の少なくとも1つを含んでいてもよい。好ましくは、この培地は、 β -グリセロホスフェートおよびアスコルビン酸

の両方を含み得る。好ましくは、この培地は、グルコルチコイド、 β -グリセロホスフェートおよびアスコルビン酸のすべてを含む。この培地は、さらに、例えば、トランスフォーミング増殖因子- β (TGF- β)、骨形成因子 (BMP)、白血病阻止因子 (LIF)、コロニー刺激因子 (CSF)、インスリン様成長因子 (IGF)、線維芽細胞増殖因子 (FGF)、多血小板血漿 (PRP)、血小板由来増殖因子 (PDGF)、血管内皮増殖因子 (VEGF) などのような他の成分を含んでいてもよい。この培地は、血清成分 (例えば、ヒト血清、ウシ血清、ウシ胎仔血清) をさらに含むことが有用であり得る。代表的には、血清成分は、0~20%程度添加され得る。

また、本発明の複合材料において肥大化能を有する軟骨細胞を培養するのに使用される培地としては、例えば、HAM's F12 (HamF12)、ダルベッコ改変イーグル培地 (DMEM)、最小必須培地 (MEM)、 α MEM、イーグル基礎培地 (BME)、フィットナー-ジャクソン改変培地 (BGJb) のような培地が挙げられるが、これらに限定されない。この培地は、細胞の増殖および分化誘導を促進する物質を含んでいてもよい。この培地には、C3H10T1/2細胞、3T3-Swiss albino細胞、Balb/3T3細胞を骨芽細胞に分化誘導させる能力は見出されていない。

一つの実施形態において、本発明の複合材料では、前記誘導骨芽細胞分化誘導因子は、凍結乾燥した状態でコラーゲン溶液と混合され、かつ前記培地は、基礎成分として、最小必須培地 (MEM) を含んでいてもよく、さらにグルコルチコイド、 β -グリセロホスフェートおよびアスコルビン酸を含んでいてもよい。

他の実施形態において、本発明の複合材料では、前記誘導骨芽細胞分化誘導因子は、ヒドロキシアパタイトに付着または分散され、かつ前記培地は、基礎成分として、最小必須培地 (MEM) を含んでいてもよく、さらにグルコルチコイド、 β -グリセロホスフェートおよびアスコルビン酸を含んでいてもよい。

一つの実施形態において、本発明の複合材料は、骨の欠損を修復または治療す

るための骨形成において使用され得る。このような骨の欠損としては、例えば、骨腫瘍、骨粗しょう症、リウマチ性関節炎、変形性関節症、骨髄炎および骨壊死などの病変；骨固定術、椎管拡張術および骨切術などの矯正手術；複雑骨折などの外傷および腸骨採取などによって生じる骨の欠損などが挙げられるが、これら
5 に限定されない。前記欠損は、固定のみでは修復できない大きさを有するものであってもよい。

他の実施形態において、本発明の複合材料は、周辺に骨がない部位に骨を形成させるための骨形成において使用され得る。周辺に骨がない部位とは、例えば、皮下、筋肉や脂肪などの軟部組織、消化器、呼吸器、泌尿器、生殖器、内分泌器、
10 脈管、神経、感覚器であり得るが、これらに限定されない。

本発明において使用される誘導骨芽細胞分化誘導因子は、イーグル基礎培地中でC 3 H 1 0 T 1 / 2 細胞にこの因子を曝露した場合、該因子を含まないイーグル基礎培地において培養した場合と比較して、C 3 H 1 0 T 1 / 2 細胞のアルカリホスファターゼ（A L P）活性（例えば、この細胞全体におけるアルカリホス
15 ファターゼ活性）を、少なくとも約1倍より高く上昇させる能力を有し、アルカリホスファターゼ活性は、A）該因子を含むかまたは含まないサンプル1 0 0 μ l に、それぞれ5 0 μ l の4 m g / m l のp - ニトロフェニルリン酸を含む溶液およびアルカリバッファー（シグマ社、A 9 2 2 6）を加え、3 7 $^{\circ}$ Cで1 5 分間
20 反応させ、1 N N a O Hを5 0 μ l 添加することによって反応を止めたときの吸光度と、その後濃塩酸を2 0 μ l 添加したときの4 0 5 n mの吸光度とを測定する工程；およびB）該濃塩酸の添加前後の該吸光度の差を計算する工程であって、該吸光度の差が、該アルカリホスファターゼ活性の指標である、工程によって決定される。好ましくは、アルカリホスファターゼ活性は、少なくとも2倍、
25 少なくとも3倍、少なくとも4倍、少なくとも5倍、少なくとも6倍、少なくとも7倍、少なくとも8倍、少なくとも9倍、少なくとも1 0倍、少なくとも1 1倍、少なくとも1 2倍または少なくとも1 3倍の増加を示す。

本発明において使用される誘導骨芽細胞分化誘導因子はまた、イーグル基礎培地中でC 3 H 1 0 T 1 / 2 細胞に該因子を曝露した場合、C 3 H 1 0 T 1 / 2 細胞のアルカリホスファターゼ (A L P) 活性 (例えば、この細胞全体におけるアルカリホスファターゼ活性) を増加させる能力を有し、このアルカリホスファターゼ活性は、A) 該因子を含むかまたは含まないサンプル 1 0 0 μ l に、それぞれ 5 0 μ l の 4 m g / m l の p - ニトロフェニルリン酸を含む溶液およびアルカリバッファー (シグマ社、A 9 2 2 6) を加え、3 7 $^{\circ}$ C で 1 5 分間反応させ、1 N N a O H を 5 0 μ l 添加することによって反応を止めたときの吸光度と、その後濃塩酸を 2 0 μ l 添加したときの 4 0 5 n m の吸光度とを測定する工程; および B) 該濃塩酸の添加前後の該吸光度の差を計算する工程であって、該吸光度の差が、該アルカリホスファターゼ活性の指標である、工程によって決定される。好ましくは、アルカリホスファターゼ活性は、少なくとも 2 倍、少なくとも 3 倍、少なくとも 4 倍、少なくとも 5 倍、少なくとも 6 倍、少なくとも 7 倍、少なくとも 8 倍、少なくとも 9 倍、少なくとも 1 0 倍、少なくとも 1 1 倍、少なくとも 1 2 倍または少なくとも 1 3 倍の増加を示す。

一つの実施形態において、本発明の複合材料において使用される誘導骨芽細胞分化誘導因子は、固体 (好ましくは、凍結乾燥されたもの) であり得るが、これらに限定されない。なぜなら、足場が溶液である場合には、その足場と接触させることにより液体になり得る。また、足場が固体である場合には十分に接触させるために、溶媒を用いて溶液にすることもあり得るからである。

本明細書において「因子」 (factor、agent) とは、意図する目的を達成することができる限りどのような物質または他の要素でもあってもよい。本発明において使用される誘導骨芽細胞分化誘導因子は、例えば、タンパク質、ポリペプチド、オリゴペプチド、ペプチド、アミノ酸、核酸、ポリサッカライド、脂質、有機低分子、またはそれらの複合体であり得る。

本明細書において「誘導骨芽細胞分化誘導因子」とは、未分化細胞を誘導骨芽

細胞に分化させる因子をいい、その活性を保持する限り単体であっても複合体であってもよい。この誘導骨芽細胞分化誘導因子は、肥大化能を有する軟骨細胞を、グルココルチコイド、 β -グリセロホスフェートおよびアスコルビン酸からなる群より選択される少なくとも1つを含む分化因子産生培地において培養すること
5 によって得ることができる。本発明において使用される誘導骨芽細胞分化誘導因子と同一の生物学的活性を有する因子であれば、別の手法で得られた因子または別の形態の因子であっても、本発明において未分化細胞を誘導骨芽細胞に分化させる因子と交換可能に用いられ得ることが理解される。このような因子は、実施例において基本的に同定されたもの以外であっても、本明細書における開示に基づいて、当該分野における技術常識を用いることによって同定することができる。
10

本発明において使用される誘導骨芽細胞分化誘導因子は、I型コラーゲン、骨型プロテオグリカン（例えば、デコリン、バイグリカン）、アルカリホスファターゼ、オステオカルシン、基質G1aタンパク質、オステオグリシン、オステオポンチン、骨シアル酸タンパク質、オステオネクチンおよびプレイオトロフィン
15 からなる群より選択される誘導骨芽細胞に特異的な物質の発現を増大させる能力を有する。従って、本明細書における誘導骨芽細胞分化誘導因子は、酵素活性においては、未分化細胞のアルカリホスファターゼ活性を上昇させることを特徴とし、または遺伝子発現レベルもしくはタンパク質レベルにおいては、未分化細胞において骨芽細胞のマーカー群より選択させる少なくとも1つを発現させる能力
20 を有する因子である。好ましい実施形態において、本発明において使用される誘導骨芽細胞分化誘導因子は、未分化細胞の、アルカリホスファターゼ活性の上昇、誘導骨芽細胞マーカーの局在または発現を確認することによって同定され得る。別の実施形態において、本発明において使用される誘導骨芽細胞分化誘導因子は、沸騰水中（通常、約96℃～約100℃、例えば、約96℃、約97℃、約9
25 8℃、約99℃および約100℃が挙げられる）で3分間の加熱処理により未分化細胞を誘導骨芽細胞に分化誘導する活性が消失する。沸騰しているかどうかは

目視にて確認する。未分化細胞を誘導骨芽細胞に分化誘導する活性の消失は、誘導骨芽細胞マーカーの局在または発現が実質的に増加しない状態をいう。別の実施形態において、本発明において使用される誘導骨芽細胞分化誘導因子は、沸騰水中で3分間の加熱処理により未分化細胞のアルカリホスファターゼ活性の上昇を誘導する活性が消失する。未分化細胞のアルカリホスファターゼ活性の上昇を誘導する活性の消失は、アルカリホスファターゼ活性が実質的に上昇しない状態をいう。

本明細書において使用される用語「タンパク質」、「ポリペプチド」、「オリゴペプチド」および「ペプチド」は、本明細書において同じ意味で使用され、任意の長さのアミノ酸のポリマーをいう。このポリマーは、直鎖であっても分岐していてもよく、環状であってもよい。アミノ酸は、天然のものであっても非天然のものであってもよく、改変されたアミノ酸であってもよい。本明細書において用いられる場合、この用語は、好ましくは、核酸分子によって翻訳された形態であることから、通常、直鎖であり、天然のアミノ酸のみから構成されるがそれに限定されない。この用語はまた、複数のポリペプチド鎖の複合体にアSEMBルされたものを包含し得る。この用語はまた、天然または人工的に改変されたアミノ酸ポリマーも包含する。そのような改変としては、例えば、ジスルフィド結合形成、グリコシル化、脂質化、アセチル化、リン酸化または任意の他の操作もしくは改変（例えば、標識成分との結合体化）がある。この定義にはまた、例えば、アミノ酸の1または2以上のアナログを含むポリペプチド（例えば、非天然のアミノ酸などを含む）、ペプチド様化合物（例えば、ペプトイド）および当該分野において公知の他の改変が包含される。

本明細書では、特に言及するときは、「タンパク質」は、比較的大きな分子量を有するアミノ酸のポリマーまたはその改変体を指し、「ペプチド」というときは、比較的小さな分子量を有するアミノ酸のポリマーまたはその改変体を指すことがあることが理解されるべきである。

(肥大化能を有する軟骨細胞)

本発明において使用される肥大化能を有する軟骨細胞は、哺乳類動物、好ましくは、ヒト、マウス、ラット、またはウサギ由来である。哺乳類動物において骨化方式は共通しており、膜性骨化(membranous ossification)と軟骨性骨化(chondral ossification)の二種類の方式がある。膜性骨化は、頭蓋骨の大部分または鎖骨のように体表面の近くにあつて平板な骨が形成されるときに機能する様式である。膜性骨化では、軟骨を経ないで結合組織中に直接、膜状の骨が形成される。膜性骨化は、膜内骨化(intramembraous ossification)または結合組織性骨化とも呼ばれる。軟骨性骨化は、椎骨、肋骨、肢骨などのような体の内側にある内骨格の形成されるときに機能する様式である。軟骨性骨化では、まず軟骨が形成され、その骨幹部に血管が侵入して軟骨が石灰化し、石灰化軟骨(calcified cartilage)が形成される。この石灰化軟骨は、形成されると直ぐに破壊され、骨化が起こり、骨および原始骨髄が形成される。この際、軟骨内部に軟骨原基が形成された後、これに成長ホルモン等が作用して長軸および短軸方向へと軟骨が伸長、拡大する。その後、骨端部にも血管が侵入して骨化が生じる。軟骨性骨化は、内軟骨性骨化(endochondral ossification)または軟骨内骨化(enenchondral ossification)とも呼ばれる。(藤田尚男、藤田恒夫、「骨の発生」、標準組織学総論、127頁；硬組織の起源と進化一序説一、須田立夫、The BONE、18巻、421-426頁、2004；内軟骨性骨形成の過程、鈴木不二男、「骨はどのようにしてできるか」鈴木不二男著、大阪大学出版会、21頁、2004；鈴木隆雄ら編「骨の事典」、朝倉書店を参照のこと。)従って、本件の未分化細胞を誘導骨芽細胞に分化誘導する能力を有する因子を産生する能力を有する、肥大化能を有する軟骨細胞は、ラット、マウス、ウサギ、ヒト等を含む哺乳類動物に一樣に存在し、骨化において重要な役割を果たしている。このように、本件因子は、内軟骨性骨形成を行う哺乳類動物等であれば種にかかわらず、肥大化能を有する軟骨細胞から同様の手順を用いて生成することができる。

ラットにヒト組換えBMPタンパク質を移植すると骨形成を誘導され、ヒト由来BMPがラット由来BMPと同様に機能することが分子生物学的に実証され

(Wozney, J. M. ら、Science, 242:1528-1534, 1988. およびWuerzler KKら、J. Craniofacial Surg., 9:131-137, 1998を参照のこと。)、ヒトとラットでは、骨化に関連

5 する因子が交換可能に使用されていることが判明している。BMP自体は互いにアミノ酸配列レベルでは異なっているが、他方でタンパク質としての性質（すなわち生成の条件等の物性値）は実質的に同一といえる。本発明における肥大化能を有する軟骨細胞は、肋骨の骨軟骨移行部、長管骨の骨端線部（例えば、大腿骨、脛骨、腓骨、上腕骨、尺骨および橈骨）、脊椎骨の骨端線部、小骨の成長軟骨帯
10 （例えば、手骨、足骨または胸骨）、軟骨膜または胎児の軟骨から形成された骨原基部、骨折治癒時の仮骨部ならびに骨増殖時の軟骨部のような部位から分離または誘導され得る。本発明において使用される肥大化能を有する軟骨細胞は、肥大化能を有する限り、どのような部位から得られた軟骨細胞であってもよい。肥大化能を有する軟骨細胞は、分化誘導によっても得られ得る。

15 本発明において誘導骨芽細胞分化誘導因子を、肥大化能を有する軟骨細胞に產生させるときには、この肥大化能を有する軟骨細胞は、代表的に、 4×10^4 細胞/ cm^2 の細胞密度に調整され得る。通常、 10^4 細胞/ $\text{cm}^2 \sim 10^6$ 細胞/ cm^2 の間で用いられるが、 10^4 細胞/ cm^2 未満または 10^6 細胞/ cm^2 より多い密度に調整されていてもよい。

20 本発明において、肥大化能を有する軟骨細胞の培養は上述のようにして分離または誘導された細胞を用いて行われる。

本発明において用いられる肥大化能を有する軟骨細胞は、どのような培地で培養されてもよく、例えば、HAM's F12 (HamF12)、ダルベッコ改変イーグル培地 (DMEM)、最小必須培地 (MEM)、最小必須培地 α (α MEM)、イーグル基礎培地 (BME)、フィットナーズジャクソン改変培地 (BGJb) のような培地中で培養された細胞であるが、これらに限定されない。肥大
25

化能を有する軟骨細胞は、細胞の増殖および分化誘導を促進する物質を含んでい
る培地で培養された細胞であってもよい。本発明において、分化因子産生培地は、
グルココルチコイド（例えば、デキサメサゾン、プレドニソロン、プレドニソン、
コルチゾン、ベタメタゾン、コルチゾル、コルチコステロン）、 β -グリセロホ
5 スフェートおよびアスコルビン酸からなる群より選択される従来型骨芽細胞分化
誘導成分の少なくとも1つを含んでいてもよい。本発明において使用される因子
は、 β -グリセロホスフェートおよびアスコルビン酸のみを含む分化因子産生培
地によっても産生される。好ましくは、この分化因子産生培地は、グルココルチ
コイド、 β -グリセロホスフェートおよびアスコルビン酸のすべてを含む。本発
10 明において、分化因子産生培地は、さらに、例えば、トランスフォーミング増殖
因子- β （TGF- β ）、骨形成因子（BMP）、白血病阻止因子（LIF）、
コロニー刺激因子（CSF）、インスリン様成長因子（IGF）、線維芽細胞増
殖因子（FGF）、多血小板血漿（PRP）、血小板由来増殖因子（PDGF）、
血管内皮増殖因子（VEGF）などのような他の成分を含んでいてもよい。分化
15 因子産生培地は、血清成分（例えば、ヒト血清、ウシ血清、ウシ胎仔血清）をさ
らに含むことが有用であり得る。代表的には、血清成分は、0～20%程度添加
され得る。

本明細書において、肥大化能を有する軟骨細胞の培養期間は、十分量の因子が
産生される期間（例えば、数ヶ月～半年、あるいは3日～3週間（例えば、3日、
20 4日、5日、6日、7日、8日、9日、10日、20日、1ヶ月以上であり、半
年、5ヶ月、4ヶ月、3ヶ月、2ヶ月、1ヶ月、3週間以下の任意の範囲の可能
な組み合わせ））であり得る。培養期間が進み、細胞が培養容器にコンフルエン
トになれば、継代することが好ましい。

一つの局面において、本発明は、A) 肥大化能を有する軟骨細胞、およびB)
25 アルギン酸を含む、生体内の骨形成を促進または誘発するための複合材料を提供
する。

別の局面において、本発明は、A) 肥大化能を有する軟骨細胞、およびB) ラミニンとコラーゲンI Vとエンタクチンとの混合物を含む、生体内の骨形成を促進または誘発するための複合材料を提供する。

5 これらの複合材料には、上述の（肥大化能を有する軟骨細胞）等に記載される任意の形態が使用され得る。

（製造方法）

一つの局面において、本発明は、生体内の骨形成を促進または誘発するための複合材料を製造するための方法を提供する。この製造方法は、以下の工程：A) 肥大化能を有する軟骨細胞を、グルココルチコイド、 β -グリセロホスフェート
10 およびアスコルビン酸からなる群より選択される少なくとも1つを含む培地において培養する工程；B) 該培養によって得られた上清と、該生体適合性を有する足場とを合わせる工程、を包含し得る。

一つの実施形態において、本発明は、生体内の骨形成を促進または誘発するための複合材料を製造するための方法を提供する。本製造方法は、以下の工程：
15 A) 肥大化能を有する軟骨細胞を、デキサメサゾン、 β -グリセロホスフェート、アスコルビン酸および血清成分を含む分化因子産生培地において培養した結果得られる誘導骨芽細胞分化誘導因子を提供する工程、およびB) 該誘導骨芽細胞分化誘導因子と、生体適合性を有する足場とを合わせる工程を包含し得る。

一つの実施形態において、本製造方法において使用される誘導骨芽細胞分化誘導因子は、（1）前記肥大化能を有する軟骨細胞を培養した培地に存在し得るか、
20 または（2）該肥大化能を有する軟骨細胞を培養した上清を、分子量50,000の限外濾過に供することにより得られる分子量50,000以上の画分に存在し得るが、これらに限定されない。

一つの実施形態において、本製造方法では、前記A) 工程は、前記肥大化能を
25 有する軟骨細胞を、デキサメサゾン、 β -グリセロホスフェート、アスコルビン

酸および血清成分を含む分化因子産生培地において培養し、該培養した上清を採取することを含み得る。

別の実施形態において、本製造方法では、A) 工程は、前記肥大化能を有する軟骨細胞を培養した上清を、限外濾過に供し、分子量 50,000 以上の画分に
5 分離することを含み得る。

一つの実施形態において、本製造方法は、前記凍結乾燥した状態の上清とコーゲン溶液とを合わせる工程を包含し得る。

一つの実施形態において、本製造方法は、前記上清とヒドロキシアパタイトとを接触させる工程を包含し得る。

10 一つの実施形態において、本発明の製造方法は、前記 A) 工程の後に、前記上清を濃縮する工程をさらに包含してもよい。この濃縮する工程では、前記上清は、1 倍以上に濃縮されたものであり得る。好ましくは、この上清は、2 倍以上に濃縮されたものであり得る。

一つの実施形態において、本発明の製造方法は、前記上清を凍結乾燥する工程
15 をさらに包含してもよい。例えば、この凍結乾燥する工程は、前記上清を凍結し、室温～約 40℃（好ましくは、室温）、一晚、真空下（-80～100 kPa）で、遠心乾燥する工程であり得るが、これに限定されない。なぜなら、因子が変性しない温度以下（約 40℃以下）で乾燥出来れば充分できさえすれば充分だからである。

20 一つの実施形態において、本製造方法は、前記上清を濃縮する工程と、上清を凍結乾燥する工程の両方を包含していてもよい。

一つの実施形態において、本発明の製造方法は、前記 B) 工程において、前記上清を、前記生体適合性を有する足場に接触させる工程を包含してもよい。例えば、この接触させる工程は、前記上清に、前記生体適合性を有する足場を漬ける
25 ことによって達成され得る。他の実施形態において、この接触させる工程は、前記上清を上部から滴下させること、一方向から吸引すること、一方向から加圧す

ること、該上清と該足場とを陰圧下で共存させることによっても達成され得る。

一つの実施形態において、本発明の製造方法は、前記B)工程において、前記上清から因子を得る工程、および該因子を前記生体適合性を有する足場と混合する工程を包含し得る。

5 一つの実施形態において、本発明の製造方法の前記B)工程は、前記濃縮によって得られた上清濃縮物を、前記生体適合性を有する足場と接触させるのに十分な体積に希釈し、該生体適合性を有する足場を接触させる工程を包含し得る。例えば、上記濃縮物は、分化因子産生培地、増殖培地、水、生理食塩水、ダルベッコリン酸緩衝液(DPBS)などにより、2～10倍に希釈され得る。

10 一つの実施形態において、本発明の製造方法の前記B)工程は、前記濃縮によって得られた上清濃縮物を凍結乾燥する工程、および該上清濃縮物を前記生体適合性を有する足場と接触させるのに十分な体積に希釈し、該希釈した上清濃縮物と生体適合性を有する足場とを接触させる工程を包含し得る。

15 一つの実施形態において、本発明の製造方法において使用される生体適合性を有する足場は、ゲル状足場、3次元状足場等であり得るが、これらに限定されない。

20 一つの実施形態において、本発明の製造方法において使用される生体適合性を有する足場は、例えば、リン酸カルシウム、炭酸カルシウム、アルミナ、ジルコニア、アパタイトーウォラストナイト析出ガラス、ゼラチン、コラーゲン、キチン、フィブリン、ヒアルロン酸、細胞外基質混合物、絹、セルロース、デキストラン、アガロース、寒天、合成ポリペプチド、ポリ乳酸、ポリロイシン、アルギン酸、ポリグリコール酸、ポリメタクリル酸メチル、ポリシアノアクリレート、ポリアクリロニトリル、ポリウレタン、ポリプロピレン、ポリエチレン、ポリ塩化ビニル、エチレン酢酸ビニル共重合体、ナイロン、またはそれらの組み合わせ等であり得るが、これらに限定されない。なぜなら、該因子が付着または分散するもの、もしくは付着または分散させることが出来るものであれば、どんなもの

25

でも使用できるからである。

好ましくは、前記生体適合性を有する足場は、例えば、多孔質ヒドロキシアパタイト（例えば、HOYA社製アパセラム気孔率50%等）、超多孔質ヒドロキシアパタイト（例えば、HOYA社製アパセラム気孔率85%、BD社製3Dスキヤホールド等）、アパタイトコラーゲン混合体（例えば、HOYA社製アパセラム顆粒と新田ゼラチン社製コラーゲングルとの混合物等）、アパタイトコラーゲン複合体（例えば、HOYA社製アパコラ等）、コラーゲングル（例えば、新田ゼラチン社製等）、コラーゲンスポンジ（例えば、新田ゼラチン社製等）、ゼラチンスポンジ（例えば、山之内製薬社製止血用ゼラチンスポンジ等）、フィブリンゲル（例えば、ニプロ社製ベリプラスTP等）、合成ペプチド（例えば、3Dマトリックス社製プラマックス等）、細胞外基質混合物（例えば、BD社製マトリゲル等）、アルギン酸（例えば、ケルコ社製ケルトンLVCR等）、アガロース（例えば、和光純薬社製アガロース等）、ポリグリコール酸、ポリ乳酸、ポリグリコール酸／ポリ乳酸共重合体、それらの組合せであり得る。より好ましくは、前記生体適合性を有する足場は、ヒドロキシアパタイト、コラーゲングル、細胞外基質であり得る。

好ましい実施形態において、前記生体適合性を有する足場は、ヒドロキシアパタイト、コラーゲン、アルギン酸、ラミニンとコラーゲンIVとエンタクチンとの混合物等であり得るがこれらに限定されない。

一つの実施形態において、本発明の製造方法において肥大化能を有する軟骨細胞を培養するのに使用される培地（分化因子産生培地ともいう。）は、グルココルチコイド（例えば、デキサメサゾン、プレドニソロン、プレドニソン、コルチゾン、ベタメタゾン、コルチゾル、コルチコステロン）、 β -グリセロホスフェート、アスコルビン酸等の少なくとも1つを含んでいてもよい。好ましくは、この培地は、 β -グリセロホスフェートおよびアスコルビン酸の両方を含み得る。好ましくは、この培地は、グルココルチコイド、 β -グリセロホスフェートおよ

びアスコルビン酸のすべてを含む。この培地は、さらに、例えば、トランスフォーミング増殖因子- β (TGF- β)、骨形成因子 (BMP)、白血病阻止因子 (LIF)、コロニー刺激因子 (CSF)、インスリン様成長因子 (IGF)、線維芽細胞増殖因子 (FGF)、多血小板血漿 (PRP)、血小板由来増殖因子 (PDGF)、血管内皮増殖因子 (VEGF) などのような他の成分を含んでいてもよい。この培地は、血清成分 (例えば、ヒト血清、ウシ血清、ウシ胎仔血清) をさらに含むことが有用であり得る。代表的には、血清成分は、0~20% 程度添加され得る。

また、本発明の製造方法において肥大化能を有する軟骨細胞を培養するのに使用される培地としては、例えば、HAM's F12 (HamF12)、ダルベッコ改変イーグル培地 (DMEM)、最小必須培地 (MEM)、最小必須培地 α (α MEM)、イーグル基礎培地 (BME)、フィットン-ジャクソン改変培地 (BGJb) のような培地が挙げられるが、これらに限定されない。この培地は、細胞の増殖および分化誘導を促進する物質を含んでいてもよい。この培地には、C3H10T1/2細胞、3T3-Swiss albino細胞、Balb/3T3細胞を骨芽細胞に分化誘導させる能力は見出されていない。

本発明の製造方法には、上述の (複合材料)、 (肥大化能を有する軟骨細胞) 等に記載される任意の形態が使用され得る。

(足場)

本明細書において「足場 (scaffold)」とは、細胞を支持するための材料を意味する。足場は、一定の強度、生体適合性を有する。本明細書中で使用される場合、足場は、生物学的物質または天然から供給される物質、天然に存在する物質または合成で供給される物質から製造される。特に言及する場合、足場は、有機体 (例えば、組織、細胞) 以外の物質 (非細胞物質) から形成される。本明細書で使用される場合、足場は、有機体 (例えば、組織、細胞) 以外の物質から形成された構成物 (生物由来の材料 (例えば、コラーゲン、ヒドロキシアパタイトも

含む)である。本明細書で使用する場合、「有機体」とは、生活機能をもつように組織された物質系をいう。すなわち、有機体は、生物を他の物質系と区別していう。細胞、組織などは有機体の概念に含まれるが、有機体から取り出した生物由来の材料は、有機体には含まれない。細胞が定着する足場の部分としては、足場の表面のほか、内部に孔が存在し、その孔が細胞を収容し得る場合、その内部孔を挙げることができる。例えば、ヒドロキシアパタイトで作製した足場には、通常、細胞を十分に収容し得る孔が多数存在する。

足場の材料としては、リン酸カルシウム、炭酸カルシウム、アルミナ、ジルコニア、アパタイトーウォラストナイト析出ガラス、ゼラチン、コラーゲン、キチン、フィブリン、ヒアルロン酸、細胞外基質混合物、絹、セルロース、デキストラン、アガロース、寒天、合成ポリペプチド、ポリ乳酸、ポリロイシン、アルギン酸、ポリグリコール酸、ポリメタクリル酸メチル、ポリシアノアクリレート、ポリアクリロニトリル、ポリウレタン、ポリプロピレン、ポリエチレン、ポリ塩化ビニル、エチレン酢酸ビニル共重合体、ナイロン、またはそれらの組み合わせ等であり得るが、これらに限定されない。なぜなら、該因子が付着または分散するもの、もしくは付着または分散させることが出来るものであれば、どんなものでも使用できるからである。

好ましくは、生体適合性を有する足場は、例えば、多孔質ヒドロキシアパタイト（例えば、HOYA社製アパセラム気孔率50%等）、超多孔質ヒドロキシアパタイト（例えば、HOYA社製アパセラム気孔率85%、BD社製3Dスキャホールド等）、アパタイトコラーゲン混合体（例えば、HOYA社製アパセラム顆粒と新田ゼラチン社製コラーゲングルとの混合物等）、アパタイトコラーゲン複合体（例えば、HOYA社製アパコラ等）、コラーゲングル（例えば、新田ゼラチン社製等）、コラーゲンスポンジ（例えば、新田ゼラチン社製等）、ゼラチンスポンジ（例えば、山之内製薬社製止血用ゼラチンスポンジ等）、フィブリンゲル（例えば、ニプロ社製ベリプラスTP等）、合成ペプチド（例えば、3Dマ

トリックス社製プラマックス等)、細胞外基質混合物(例えば、BD社製マトリゲル等)、アルジネート(例えば、ケルコ社製ケルトンLVCR等)、アガロース(例えば、和光純薬社製アガロース等)、ポリグリコール酸、ポリ乳酸、ポリグリコール酸/ポリ乳酸共重合体、それらの組合せであり得る。より好ましくは、
5 前記生体適合性を有する足場は、ヒドロキシアパタイト、コラーゲンゲル、細胞外基質である。

これらの足場は、顆粒形態、ブロック形態、スポンジ形態などの任意の形態で提供され得る。これらの足場は、孔があってもなくてもよい。このような足場は、市販されているものを使用してもよく、例えば、HOYA株式会社、オリンパス株式会社、京セラ株式会社、三菱ウェルファーマ株式会社、大日本住友製薬株式会社、小林製薬株式会社、ジンマー株式会社などから市販されている。一般的な足場の調製および特徴付けは当該分野において公知であり、そして慣用的な実験および当該分野の技術常識しか必要としない。例えば、米国特許第4,975,526号;同第5,011,691号;同第5,171,574号;同第5,266,683号;同第5,354,557号および同
10 第5,468,845号を参照のこと(これらの開示は本明細書中に参考として援用される)。他の足場はまた、例えば、以下の文献において記載されている:LeGerosおよびDaculsi Handbook of Bioactive Ceramics, II 17-28頁(1990,CRC Press)のような生体適合物質論文;および、Yang Cao, Jie Weng Biomaterials 17, (1996) 419-424頁のような他の公開された記載;LeGeros, Adv. Dent. Res. 2, 164
15 (1988); Johnsonら、J. Orthopaedic Research, 1996, 14巻、351-369頁;ならびにPiattelliら、Biomaterials 1996、17巻、1767-1770頁を参照のこと(これらの開示は本明細書中に参考として援用される)。

本明細書において「リン酸カルシウム」とは、カルシウムリン酸塩の総称である。例えば、 CaHPO_4 、 $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ 、 $\text{Ca}_4\text{O}(\text{PO}_4)_2$ 、 $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ 、 $\text{CaP}_4\text{O}_{11}$ 、 $\text{Ca}(\text{PO}_3)_2$ 、 $\text{Ca}_2\text{P}_2\text{O}_7$ 、
20 $\text{Ca}(\text{H}_2\text{PO}_4)_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ などの化学式で示される化合物が挙げられるが、これらに限定されない。

本明細書において「ヒドロキシアパタイト」とは、一般組成を $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ とする化合物であり、コラーゲンとともに哺乳類動物の硬組織（骨および歯）の主要構成成分である。ヒドロキシアパタイトは、上記の一連のリン酸カルシウムを含むが、生体硬組織中のアパタイトの PO_4 および OH 成分は体液中の CO_3 成分と置換していることが多い。また、ヒドロキシアパタイトは、厚生労働省および米国連邦食品医薬品局(FDA (U. S. Food and Drug Administration))により安全性が承認されている物質である。ヒドロキシアパタイトは、市販のものは生体非吸収性材料であるものが多く、生体内にほとんど吸収されず残存するが、吸収性のものもある。

本明細書において、「細胞外基質混合物」とは、細胞外基質と成長因子の混合物をいう。細胞外基質としては、ラミニン、コラーゲンなどが挙げられるが、これらに限定されない。この細胞外基質は、生体由来であっても、合成されたものであってもよい。

（生体内の骨形成を促進または誘発するための方法）

一つの局面において、本発明は、生体内の骨形成を促進または誘発するための方法を提供する。この方法は、誘導骨芽細胞分化誘導因子と生体適合性を有する足場とを含む複合材料を、生体内の骨形成を促進または誘発する必要がある部位に移植する工程を包含し得る。

一つの実施形態において、本発明の方法では、前記骨形成は、骨の欠損を修復または治療するためのものであり得る。前記欠損は、例えば、固定のみでは修復できない大きさを有するものであってもよい。

他の実施形態において、前記骨形成は、周辺に骨がない部位に骨を形成させるためのものであってもよい。

本発明の生体内の骨形成を促進または誘発するための方法には、上述の（複合材料）、（肥大化能を有する軟骨細胞）等に記載される任意の形態が使用され得る。

本明細書において「被験体」とは、本発明の処置が適用される生物をいい、「患者」ともいわれる。患者または被験体は、イヌ、ネコ、またはウマ、好ましくは、ヒトであり得る。

5 骨形成の皮下試験は、本来骨の無い部分に骨を形成（異所性骨形成とも呼ばれる）させ、骨形成能を評価する試験である。この試験は容易に実施できるので、当該分野で広く使用されている。骨を治療するときの試験方法には、骨欠損試験が用いられ得る。この試験における骨形成は、骨形成の条件が準備されている環境下で起こり、既に近傍に存在する骨芽細胞および誘導・遊走した骨芽細胞によって骨が形成されるので、通常、皮下試験よりも骨形成率は良いと考えられている。皮下試験の結果は、実際の骨欠損における骨形成の結果によく一致することが知られている（例えば、Urist, M. R.: Science, 150: 893-899 (1965)、Wozney, J. M. ら: Science, 242: 1528-1532 (1988)、Johnson, E. E. ら: Clin. Orthop., 230: 257-265 (1988)、Ekelund, A. ら: Clin. Orthop., 263: 102-112 (1991)、およびRiley, E. H. ら: Clin. Orthop., 324: 39-46 (1996)を参照のこと）。従って、皮下試験の結果で骨形成が得られる場合、当業者は、骨欠損試験において当然に骨形成が得られることを理解する。

20 本発明の肥大化能を有する軟骨細胞の産生する因子と生体適合性を有する足場とを含む複合材料は、皮下に移植した場合も、骨欠損部に移植した場合も、骨形成が生じることが予測される。足場単独を皮下に移植すると、骨形成は観察されないことが予測される。足場単独を骨欠損部位に移植すると、骨形成は生じるが、その量は、肥大化能を有する軟骨細胞の産生する誘導骨芽細胞分化誘導因子と足場との複合材料を移植したときに比べてはるかに少ないと予測される。

25 本発明の複合材料は、移植することにより骨の修復および再構成に用いることができる。移植する部位としては、特に限定されないが、通常、骨の修復および再構成が望まれる、外傷または骨腫瘍の除去等に起因する骨欠損部が挙げられる。本発明の複合材料は、周辺に骨がない部位に骨を形成させるためにも使用され得

る。移植は、公知の骨髄由来幹細胞移植と同様に行うことができる。移植する複合材料の量は、骨欠損部の大きさおよび症状等に応じて適宜選択される。

本発明はまた、必要に応じて、生理活性物質、サイトカインなどとともに使用することができる。

- 5 本明細書において「細胞生理活性物質」または「生理活性物質」(physiologically active substance) とは、細胞または組織に作用する物質をいう。そのような作用としては、例えば、その細胞または組織の制御、変化などが挙げられるがそれらに限定されない。生理活性物質には、サイトカインおよび増殖因子が含まれる。生理活性物質は、天然に存在するものであっても、合成されたものでも
- 10 よい。好ましくは、生理活性物質は、細胞が産生するものまたはそれと同様の作用を有するものであるが改変された作用を持つものであってもよい。本明細書では、生理活性物質は、ペプチドを含むタンパク質形態または核酸形態あるいは他の形態であり得る。

- 本明細書において使用される「サイトカイン」は、当該分野において用いられる最も広義の意味と同様に定義され、細胞から産生され同じまたは異なる細胞に作用する生理活性物質をいう。サイトカインは、一般にタンパク質またはポリペプチドであり、免疫応答の制御作用、内分泌系の調節、神経系の調節、抗腫瘍作用、抗ウイルス作用、細胞増殖の調節作用、細胞分化の調節作用、細胞機能の調節作用などを有する。本明細書では、サイトカインはタンパク質形態または核酸
- 15 形態あるいは他の形態であり得るが、実際に細胞に作用する時点において、サイトカインは、通常、ペプチドを含むタンパク質形態であることが多い。

- 本明細書において用いられる「増殖因子」または「細胞増殖因子」とは、本明細書では互換的に用いられ、細胞の増殖および分化誘導を促進または制御する物質をいう。増殖因子は、成長因子または発育因子ともいわれる。増殖因子は、細胞培養または組織培養において、培地に添加されて血清高分子物質の作用を代替
- 20 し得る。多くの増殖因子は、細胞の増殖以外に、分化状態の制御因子としても機

能することが判明している。

骨形成関連のサイトカインには、代表的には、トランスフォーミング増殖因子
- β (TGF- β)、骨形成因子 (BMP)、白血病阻止因子 (LIF)、コロ
ニー刺激因子 (CSF)、インスリン様成長因子 (IGF)、線維芽細胞増殖因
子 (FGF)、多血小板血漿 (PRP)、血小板由来増殖因子 (PDGF) およ
び血管内皮増殖因子 (VEGF) などの因子、ならびにアスコルビン酸、グルコ
コルチコイド、グリセロリン酸などの化合物が挙げられる。

サイトカインおよび増殖因子などの生理活性物質は一般に、機能重複現象 (re
dundancy) があることから、他の名称および機能 (例えば、細胞接着活性または
細胞-基質間の接着活性など) で知られるサイトカインまたは増殖因子であって
も、本発明に使用される生理活性物質の活性を有する限り、本発明において使用
され得る。また、サイトカインまたは増殖因子は、本発明における好ましい活性
(例えば、幹細胞を増殖させる活性あるいは誘導骨芽細胞を形成させる活性、肥
大化能を有する軟骨細胞に本発明による因子の産生を促す活性) を有してさえい
れば、本発明の実施において使用することができる。

本発明において使用される誘導骨芽細胞分化誘導因子は、同系に由来する細胞
に由来してもよく、生体と同種異系の関係にある個体由来であってもよく、生体
と異種の関係にある個体由来であってもよい。

本明細書において「同系に由来する」とは、自己 (自家)、純系または近交系
に由来することをいう。

本明細書において「生体と同種異系の関係にある個体由来」とは、同種であっ
ても遺伝的には異なる他の個体を起源とすることをいう。

本明細書において「生体と異種の関係にある個体由来」とは、異種個体を起源
とすることをいう。従って、例えば、ヒトがレシピエントである場合、ラット由
来の細胞は「生体と異種の関係にある個体由来」である。

以下に、実施例に基づいて本発明を説明するが、以下の実施例は、例示の目的

のみに提供される。従って、本発明の範囲は、上記発明の詳細な説明にも下記実施例にも限定されるものではなく、特許請求の範囲によってのみ限定される。

実施例

- 5 以下の実施例に用いられる試薬は、例外を除き、和光純薬社、Invitrogen社、Cambrex社、Aldrich Sigma社などから市販されるものを用いた。

(培地の調製)

本明細書の実施例では、特に言及する場合を除き、以下の培地を使用した。

- 10 (各細胞について用いた培地)

細胞の種類		使用培地
軟骨細胞		HAM培地
C3H10T1/2細胞		BME培地
3 T3	Swiss albino細胞	D-MEM培地
	BALB細胞	D-MEM培地
	NIH細胞	D-MEM培地
骨髓細胞		MEM増殖培地
ヒト間葉系幹細胞(h-MSC)		MSCGM (増殖培地)

- 15

HAM培地、BME培地、D-MEM培地、MEM増殖培地およびMSCGM (増殖培地) は、下記表に示す組成となるように調製した。

*HAM培地、BME培地、D-MEM培地・・・共通

- 20

培地 (HAM, BME, D-MEM)	88.9%
ウシ胎仔血清	10%
ペニシリン・ストレプトマイシン	1%
Fungizone	0.1%
合計	100%

培地：各培地について基礎培地として使用した培地

- 25 HAM：HAM's F12培地

BME：イーグル基礎培地

D-MEM：ダルベッコ改変イーグル培地

Fungizone：250 μ g/ml アンホテリシンB、Invitrogen社、15290-018

*MEM増殖培地

最小必須培地	83.9%
ウシ胎仔血清	15%
ペニシリン・ストレプトマイシン	1%
Fungizone	0.1%
合計	100%

*MEM分化因子産生培地

最小必須培地	80.9%
ウシ胎仔血清	15%
ペニシリン・ストレプトマイシン	1%
Fungizone	0.1%
β -グリセロホスフェート	1%
デキサメサゾン	1%
ビタミンC	1%
合計	100%

*MSCGM（増殖培地）

MSCBM	88%
MSCGS	10%
L-グルタミン	2%
ペニシリン・ストレプトマイシン	0.1%
合計	100%

Fungizone：250 μ g/ml アンホテリシンB、Invitrogen社、15290-018

MSCBM：Cambrex社、PT-3238

MSCGS：Cambrex社、PT-3001

（実施例1：肋骨・肋軟骨由来の肥大化能を有する軟骨細胞をMEM分化因子
産生培地で培養した場合に産生する細胞機能調節因子の調製および検出）

（肋骨・肋軟骨部からの肥大化能を有する軟骨細胞の調製）

4週齢雄性ラット（Wistar系）および8週齢雄性ラット（Wistar系）をそれぞれのグループとして本実施例において実験した。ラットは、クロロホルムを使用して屠殺した。ラットの胸部をバリカンで剃毛し、ヒビテン液（10倍希釈）に全身を浸し消毒した。胸部を切開し、無菌的に肋骨・肋軟骨部を採取した。この肋骨・肋軟骨部の境界部分より半透明の成長軟骨部を採取した。この成長軟骨部を細切し、0.25%トリプシン-EDTA/D-PBS（Dulbecco's Phosphate Buffered Saline）中で、37℃で1時間攪拌した。次いで、遠心分離170×gで3分間により洗浄し、その後0.2%コラゲナーゼ（Collagenase：インビトロジェン社製）/D-PBSとともに37℃で、2.5時間攪拌した。遠心分離（170×gで3分間）により洗浄した後、攪拌用フラスコ中で0.2%ディスパーゼ（Dispase：インビトロジェン社製）/（HAM+10% FBS）とともに、37℃にて、1晩攪拌した。翌日、濾過し、遠心分離（170×gで3分間）により洗浄した。細胞をトリパンブルーにより染色し、顕微鏡を用いて細胞数をカウントした。

評価は、呈色しなかった細胞を生細胞とし、青色に呈色した細胞を死細胞とした。

（肥大化能を有する軟骨細胞の確認）

実施例1によって得られた細胞は、分離の際に使用した酵素（トリプシン、コラゲナーゼ、ディスパーゼ）によって障害を受けているので、培養によって障害を回復させ、肥大化能を有する軟骨細胞を、軟骨細胞マーカーの局在、マーカーの発現、および顕微鏡下で形態学的な肥大化を確認することによって同定した。

（肥大化能を有する軟骨細胞特異的マーカーの発現）

上記の操作により得られた細胞の溶解物をSDS（ドデシル硫酸ナトリウム）

で処理する。SDS処理した溶液をSDSポリアクリルアミド電気泳動に供する。その後、転写用膜にブロッティング（ウェスタンブロッティング）し、軟骨細胞マーカーに対する一次抗体を反応させて、ペルオキシダーゼ、アルカリホスファターゼ、グルコシダーゼなどの酵素またはフルオレセインイソチオシアネート（FITC）、フィコエリトリン（PE）、テキサスレッド、7-アミノ-4-メチルクマリナー-3-酢酸（AMCA）、ローダミンなどの蛍光を標識した二次抗体で検出する。

（肥大化能を有する軟骨細胞マーカー遺伝子の発現）

前記の操作により得られた細胞からRNAを抽出して、PCRでマーカーの発現を検出することもできる。本実施例では、アルカリホスファターゼ、I型コラーゲン、アグリカン、オステオカルシンの発現量について、リアルタイムPCRで測定した。内在性コントロール遺伝子として、GAPDHを用いた。

試料として、本実施例において調製した肥大化能を有する軟骨細胞（ 5×10^5 個）を遠心分離（ $170 \sim 200 \times g$ で3～5分間）することによりペレットにして、 37°C 、5% CO_2 インキュベーター中で1週間培養したもの（Gp1およびGp2）を用いた。培地には、HAM培地+10%FBSまたはMEM培地+15%FBSを用いた。

（全RNAの抽出）

培養物（培養面積 12 cm^2 ）に対して、ISOGEN（和光純薬）1mlを加えた。セルスクレイパーを使って細胞を剥がして、2mlチューブに回収し、室温で10分放置した。クロロホルム0.2mlを加え、激しくVortexし、 4°C で5分静置した。 $12,000 \times g$ 、 4°C で15分遠心し、上清の水相を1.5mlチューブに採取した。イソプロパノール0.5mlを加えて、Vortexし、室温で10分放置した。 $12,000 \times g$ 、 4°C で15分遠心し、上清を

充分に除き、70%エタノール1mlを加えVortexした。約20 μ lのRNaseフリー水に溶かし、-80℃に保存した。

5 全RNAからHigh-Capacity cDNA Archive Kit (アプライドバイオシステムズ社)を用いて、cDNAを合成した。上記cDNAをテンプレートとして、アルカリホスファターゼ、I型コラーゲン、軟骨型プロテオグリカン (アグリカン)、オステオカルシン、およびGAPDHの発現を、Taqmanアッセイ法 (Taqman(登録商標)Gene Expression Assays (アプライドバイオシステムズ社))を用いて確認した。

10 次いで、リアルタイムPCR機器 (ABI社、PRISM 7900HT)にて測定を行った。リアルタイムPCR反応液 (25 μ Lの2 $\times$ TaqMan Universal PCR Master Mix、2.5 μ Lの20 $\times$ Taqman(登録商標)Gene Expression Assay Mix、21.5 μ LのRNase-free water、1 μ LのテンプレートcDNA)を調製し、96ウェル反応プレートに分注した。50℃で2分、および95℃で10分の後、95℃で15秒、および60℃、1分を40サイクルでPCRを行った。PCR反応後、
15 しきい値の設定および到達サイクルの算出を、機器 (PRISM 7900HT) 内蔵の解析ソフトにより実施した。各細胞マーカーの値を、GAPDHの値で除して発現量の平均値を算出した。その結果、肥大化能を有する軟骨細胞はアルカリホスファターゼ、I型コラーゲンおよびアグリカンを発現するが、オステオカルシンは発現していなかった (表I)。

(表 I)

アルカリホスファターゼ

	量 (GAPDHによる補正值) 平均値			
試料	1	2	3	平均
Gp1	0.0455	0.0490	0.0596	0.0514
Gp2	0.0656	0.0571	0.0650	0.0626

Ⅱ型コラーゲン

	量 (GAPDHによる補正值) 平均値			
試料	1	2	3	平均
Gp1	0.2574	0.2576	0.2628	0.2593
Gp2	0.3724	0.4158	0.5251	0.4378

アグリカン

	量 (GAPDHによる補正值) 平均値			
試料	1	2	3	平均
Gp1	0.6254	0.6284	0.6227	0.6255
Gp2	0.9471	0.9735	1.0005	0.9737

オステオカルシン

	量 (GAPDHによる補正值) 平均値			
試料	1	2	3	平均
Gp1	0.0006	0.0007	0.0005	0.0006
Gp2	0.0065	0.0062	0.0087	0.0071

G p 1 および G p 2 : 肥大化能を有する軟骨細胞のペレットを1週間培養したもの

X型コラーゲン、I型コラーゲン、基質G l a タンパク質、プレイオトロフィ
ン、デコリン、パイグリカンについても本実施例と同様の方法により、発現の有
無を観察することができる。

(肥大化能を有する軟骨細胞特異的マーカーの局在)

上記の操作により得られた細胞培養物を、10%中性ホルマリン緩衝液で固定し、軟骨細胞マーカーに対する一次抗体を反応させて、ペルオキシダーゼ、アルカリホスファターゼ、グルコシダーゼなどの酵素またはFITC、PE、テキサスレッド、AMCA、ローダミンなどの蛍光を標識した二次抗体で検出する。

アルカリホスファターゼについては染色法で検出することもできる。上記の操作によって得られた細胞培養物を、60%アセトン/クエン酸バッファーで固定し、蒸留水で洗浄後、ファーストバイオレットBとナフトールAS-MXとのを混合液に浸漬し、室温暗所で30分反応させることにより、呈色させた。

肥大化能を有する軟骨細胞を希釈した細胞液に、肥大化能を有する軟骨細胞が存在するか否かを確認するために、以下の実験を行った。 1×10^6 細胞/mlでヒドロキシアパタイト上に播種し、37℃にて、5% CO₂インキュベーター中で1週間培養した。次いで、この試料（細胞を播種したヒドロキシアパタイト）をアルカリホスファターゼ染色した後、トルイジン青染色した。アルカリホスファターゼ染色は、試料を60%アセトン/クエン酸バッファー中に30秒浸漬して固定し、水洗後、アルカリホスファターゼ染色液（2mlの0.25%ナフトールAS-MXリン酸アルカリ溶液（シグマアルドリッチ社）+48mlの25%ファーストバイオレットB塩溶液（シグマアルドリッチ社））とともに、室温、遮光下で30分間インキュベートすることにより行い、トルイジン青染色は、トルイジン青染色液（0.25%トルイジン青溶液、pH7.0、和光純薬工業）とともに室温、5分間インキュベートすることにより行った。アルカリホスファターゼ染色では、試料は、赤く斑点状に染まった（図1Aを参照のこと）。トルイジン青では同一部分が青く斑点状に染まり、細胞が存在することが分かる（図1Bを参照のこと）。従って、ヒドロキシアパタイト上に存在する細胞がアルカリホスファターゼ活性を有することが分かった。

(軟骨細胞の肥大化能に関する形態学的検索)

5 5×10^5 個の細胞を含む HAM' s F 1 2 培養液を遠心することにより細胞のペレットを作製し、この細胞ペレットを一定期間培養し、顕微鏡下に確認した培養前の細胞の大きさと培養後の細胞の大きさを比較する。有意な成長が確認されたときに、細胞を肥大化能を有すると判定した。

(結果)

10 実施例 1 によって得られた細胞は、軟骨細胞マーカーを発現しており、形態学的には肥大化していることを確認した。このことにより、実施例 1 によって得られた細胞は、肥大化能を有する軟骨細胞であることが確認された。この細胞を以下の実験に用いた。

(肋骨・肋軟骨部から採取した肥大化能を有する軟骨細胞によって産生された因子の検出)

15 実施例 1 により得られた肥大化能を有する軟骨細胞を、MEM 分化因子産生培地 (最小必須培地 (MEM 培地) および 15% FBS (ウシ胎仔血清)、デキサメサゾン 10 nM、 β -グリセロホスフェート 10 mM、アスコルビン酸 50 μ g/ml、100 U/ml ペニシリン、0.1 mg/ml ストレプトマイシン、および 0.25 μ g/ml アンホテリシン B) に加えて 4×10^4 細胞/cm²
20 に希釈した。この細胞液を、ディッシュ (ベクトン・ディッキンソン社製) に均一に播種し、37℃にて、5% CO₂ インキュベーター中で培養し、経時的に (4日目、7日目、11日目、14日目、18日目、21日目に) 培地の上清を回収した。

25 (回収した培養上清が、未分化細胞を誘導骨芽細胞に分化誘導する活性を有するか否かの検討)

マウスC3H10T1/2細胞（大日本住友製薬社製、CCL-226）を、
1. 2.5×10^4 細胞/cm²で24穴プレート（ベクトン・ディッキンソン社
製、 2.5×10^4 /穴）に均一に播種した。これらの細胞は、大日本住友製薬
だけでなく、国内外の販売会社（三光純薬、コスモバイオ社、タカラバイオ社、
5 東洋紡績社、住商ファーマバイオメディカル社、ステムセル際センス社、Cambrex社、StemCell TechnologyStem社、Invitrogen社、Osiris社）や組織資源活用機
関（組織細胞バンク）（ヒューマンサイエンス振興財団研究資源バンク、理化学
研究所細胞開発バンク、厚生省国立医薬品食品衛生研究所細胞バンク、東北大学
加齢医学研究所などの国内機関、およびI I AM、ATCCなどの海外機関な
10 ど）よりからも入手可能である。播種から18時間後に、上記の培養上清1ml
を添加して、37℃にて5% CO₂インキュベーター中で培養した。72時間
後に、以下に示す手順を用いてアルカリホスファターゼ活性を測定した。

（アルカリホスファターゼ活性の測定）

15 アルカリホスファターゼ活性を測定するために、該因子を含むかまたは含まな
いサンプル100μlに、それぞれ50μlの4mg/mlのp-ニトロフェニ
ルリン酸を含む溶液およびアルカリバッファー（シグマ社、A9226）を加え、
37℃で15分間反応させた。その後、1N NaOHを50μl添加すること
によって反応を止めて、吸光度（405nm）を測定した。次いで、濃塩酸を2
20 0μl添加し、吸光度（405nm）を測定した。これらの吸光度の差を「絶対
活性値」と呼び（表では「絶対値」と表示する。）、アルカリホスファターゼ活
性の一つの指標として用いた。4週齢において、5回の実験を行い、1回の実験
では3試行を行った。8週齢では、3回の実験を行い、1回目2試行、2回目2
試行、3回目1試行を行った。各試料の絶対活性値を、対照となる培地のみの絶
25 対値（対照となる培地のみを同様にマウスC3H10T1/2細胞に加えて測定
した絶対活性値）で除した値を、本明細書で「相対活性値」（表では「相対値」

と表示する) と呼び、本明細書においてアルカリホスファターゼの別の指標として用いた。本実施例では、マウスC3H10T1/2細胞に本因子含む培地を添加した場合、本因子を含まない培地を添加して培養した場合と比較して、マウスC3H10T1/2細胞の細胞全体のアルカリホスファターゼ (ALP) 活性の値を、少なくとも約1.5倍より高く上昇させる能力を有するときに、アルカリホスファターゼ活性を上昇させる活性を有すると判断した。

相対活性値レベルで評価した場合、MEM分化因子産生培地のみを添加した場合のアルカリホスファターゼ活性を1とすると、4週齢のラット群では、4日後に採取した培養上清を添加すると約4.1倍、1週後に採取した培養上清では約5.1倍、2週後に採取した培養上清では約5.4倍、3週後に採取した培養上清では約4.9倍にまで上昇した。8週齢のラット群では、4日後に採取した培養上清を添加すると約2.9倍、1週後に採取した培養上清では約3.1倍、2週後に採取した培養上清では約3.8倍、3週後に採取した培養上清では約4.2倍にまで上昇した。(表1上段および図2を参照のこと)。

(誘導骨芽細胞の確認)

(アルカリホスファターゼの染色)

(肥大化能を有する軟骨細胞を、MEM分化因子産生培地で培養した上清を添加した場合)

マウスC3H10T1/2細胞(大日本住友製薬社製、CCL-226)を、 1.25×10^4 細胞/cm²(すなわち、 2.5×10^4 /穴)で24穴プレート(ベクトン・ディッキンソン社製)および 1×10^6 細胞/mlでヒドロキシアパタイト上に均一に播種した。播種から18時間後に、肥大化能を有する軟骨細胞をMEM分化因子産生培地で培養した培養上清1mlを添加して、37℃にて5% CO₂インキュベーター中で培養した。この細胞培養物を、60%アセトン/クエン酸バッファーで固定し、蒸留水で洗浄後、ファーストバイオレット

BとナフトールAS-MXとのを混合液に浸漬し、室温暗所で30分反応させることにより、呈色させた。

(肥大化能を有する軟骨細胞を、MEM増殖培地で培養した上清を添加した場合)

マウスC3H10T1/2細胞（大日本住友製薬社製、CCL-226）を、
1. 2.5×10^4 細胞/cm²（すなわち、 2.5×10^4 /穴）で24穴プレート（ベクトン・ディッキンソン社製）および 1×10^6 細胞/mlでヒドロキシアパタイト上に均一に播種した。播種から18時間後に、肥大化能を有する軟骨細胞をMEM増殖培地（最小必須培地（MEM培地）および15% FBS、100U/mlペニシリン、0.1mg/mlストレプトマイシン、および0.25μg/mlアンホテリシンB）で培養した培養上清1mlを添加して、37℃にて5% CO₂インキュベーター中で培養した。この細胞培養物を、60%アセトン/クエン酸バッファーで固定し、蒸留水で洗浄後、ファーストバイオレットBとナフトールAS-MXとのを混合液に浸漬し、室温暗所で30分反応させることにより、呈色させた。

上に示したように、誘導骨芽細胞分化誘導能を有する因子によって、誘導骨芽細胞マーカーの一つである、マウスC3H10T1/2細胞のアルカリホスファターゼ（ALP）活性が上昇することが示された。さらにC3H10T1/2細胞のアルカリホスファターゼ染色においても、この誘導骨芽細胞分化誘導能を有する因子をC3H10T1/2細胞に添加すると、C3H10T1/2細胞は著しい赤色を示した。このことにより、染色法によってもアルカリホスファターゼが発現していることが示された。この結果、C3H10T1/2細胞が誘導骨芽細胞に分化したことが確認された（表1上段、図2、図3A上段および図3Bを参照のこと）。また、前記の方法により細胞のペレットを作製し、酸性トルイジン青およびサフラニンOでこの細胞を染色すると、異染性（メタクロマジー）は

示さず、サフラニンには陰性であった。従って、この細胞は、軟骨細胞ではないことが確認された。従って、分化した細胞は、肥大化能を有する軟骨細胞ではないことが確認できた。

5 (比較例 1 A：肋骨・肋軟骨由来の肥大化能を有する軟骨細胞をMEM増殖培地で培養した場合に産生する因子の調製および検出)

実施例 1 と同様の方法により、肋骨・肋軟骨部から肥大化能を有する軟骨細胞を採取した。肥大化能を有する軟骨細胞を、MEM増殖培地（最小必須培地（MEM培地）および 15% FBS、100 U/ml ペニシリン、0.1 mg/ml
10 1 ストレプトマイシン、および 0.25 μ g/ml アンホテリシン B）を加えて 4×10^4 細胞/cm² に希釈し、培養し、経時的に（4 日目、7 日目、11 日目、14 日目、18 日目、21 日目に）培地の上清を回収した。

マウス C3H10T1/2 細胞（大日本住友製薬社製、CCL-226）を、
1. 2.5×10^4 細胞/cm² で 24 穴プレート（ベクトン・ディッキンソン社
15 製、 2.5×10^4 /穴）に均一に播種した。播種から 18 時間後に、上記の培養上清 1 ml を添加して、37℃にて 5% CO₂ インキュベーター中で培養した。72 時間後に、実施例 1 と同様の方法によりアルカリホスファターゼ活性を測定した。MEM増殖培地のみを添加した場合を 1 とすると、4 週齢のラット群では、4 日後に採取した培養上清を添加すると約 1.0 倍、1 週後に採取した培養上清では約 1.3 倍、2 週後に採取した培養上清では約 1.1 倍、3 週後に採取した培養上清では約 1.0 倍であった。8 週齢のラット群では、4 日後に採取した培養上清を添加すると約 1.2 倍、1 週後に採取した培養上清では約 1.0 倍、2 週後に採取した培養上清では約 1.0 倍、3 週後に採取した培養上清では約 0.9 倍であった（表 1 下段および図 2 を参照のこと）。MEM増殖培地を用
20 いた細胞培養物の上清を添加した場合、4 週齢および 8 週齢のラット群における
25

アルカリホスファターゼ活性は、MEM増殖培地のみを添加した場合とほとんど変わらなかった。

(誘導骨芽細胞の確認)

5 (アルカリホスファターゼの染色)

マウスC3H10T1/2細胞を24穴プレートおよびヒドロキシアパタイト上に播種し(BME培地)、18時間培養した。次いで、この細胞培養物に、肋骨・肋軟骨由来の肥大化能を有する軟骨細胞をMEM増殖培地で培養した培養上清を添加し、72時間後にアルカリホスファターゼ染色をした。MEM増殖培地で培養した上清を添加した場合、アルカリホスファターゼ染色は染まらず、活性

10 がないことが確認された(図3A下段および図3Dを参照のこと)。

(表1. 肥大化能を有する軟骨細胞をMEM分化因子産生培地およびMEM増殖培地で培養した上清を添加した場合のアルカリホスファターゼ活性)

		MEM分化因子産生培地(平均値)				
		0日	4日	1週間	2週間	3週間
15	4週齢	相対値	1	4.1	5.1	5.4
		絶対値(上清添加)		0.077	0.098	0.103
		絶対値(培地のみ添加)	0.023	0.023	0.024	0.023
	8週齢	相対値	1	2.9	3.1	3.8
		絶対値(上清添加)		0.065	0.066	0.077
		絶対値(培地のみ添加)	0.021	0.021	0.021	0.019
		MEM増殖培地(平均値)				
		0日	4日	1週間	2週間	3週間
20	4週齢	相対値	1	1.0	1.3	1.1
		絶対値(上清添加)		0.020	0.023	0.027
		絶対値(培地のみ添加)	0.022	0.022	0.020	0.024
	8週齢	相対値	1	1.2	1.0	0.9
		絶対値(上清添加)		0.023	0.021	0.019
		絶対値(培地のみ添加)	0.020	0.020	0.021	0.019

4週齢：5回実験を行った。1回の実験で3試行した。

8週齢：3回実験を行った。1回目2試行、2回目2試行、3回目1試行した。

25 実施例1と同様の方法を用いて、上記の操作により得られた肋骨・肋軟骨由来

の肥大化能を有する軟骨細胞をMEM増殖培地で培養した培養上清は、C 3 H 1 0 T 1 / 2 細胞の骨芽細胞マーカーを発現させるか否かを確認することができる。

(実施例 1 および比較例 1 A のまとめ)

5 MEM分化因子産生培地を用いて肥大化能を有する軟骨細胞を培養した場合、この培養上清には、未分化細胞であるマウス C 3 H 1 0 T 1 / 2 細胞のアルカリホスファターゼ活性を上昇させ、誘導骨芽細胞に分化誘導する因子が存在することが確認された。一方、MEM増殖培地を用いて肥大化能を有する軟骨細胞を培養した場合、この培養上清にはこの因子が存在しないことが確認された。肥大化能を有する軟骨細胞は、MEM分化因子産生培地で培養すると、未分化細胞を誘導骨芽細胞に分化誘導させる因子を産生することが見出された。従来、このような因子は知られておらず、その因子の存在自体が予想外な効果といえる。なお、従来知られている BMP は、別の場所で詳述するように、直接的に誘導骨芽細胞へと分化誘導させる効果はないようである。

15

(比較例 1 B : 肋軟骨由来の静止軟骨細胞をMEM分化因子産生培地で培養した場合に産生する因子の調製および検出)

(肋軟骨からの静止軟骨細胞の調製)

4 週齢雄性ラット (W i s t a r 系) および 8 週齢雄性ラット (W i s t a r 系) をクロロホルムを使用して屠殺した。ラットの胸部をバリカンで剃毛し、ヒビテン液 (10 倍希釈) に全身を浸し消毒した。胸部を切開し、無菌的に肋軟骨部を採取した。この肋軟骨部分より不透明の静止軟骨部を採取した。この静止軟骨部を細切し、0.25%トリプシン-EDTA/D-PBS (D u l b e c c o ' s P h o s p h a t e B u f f e r e d S a l i n e) 中で、37℃
20
25
で 1 時間攪拌した。次いで、遠心分離 (170×g で 3 分間) により洗浄し、その後 0.2% コラゲナーゼ (C o l l a g e n a s e : インビトロジェン社製)

／D－PBSとともに37℃で、2.5時間攪拌した。遠心分離（170×gで3分間）により洗浄した後、攪拌用フラスコ中で0.2%ディスパーゼ（Dispase：インビトロジェン社製）／（HAM+10% FBS）とともに、37℃にて、1晩攪拌した。0.2%ディスパーゼでの1晩処理を除く場合もある。

5 翌日、濾過し、遠心分離（170×gで3分間）により洗浄した。細胞をトリパンブルーにより染色し、顕微鏡を用いて細胞数をカウントした。

評価は、呈色しなかった細胞を生細胞とし、青色に呈色した細胞を死細胞とした。

10 （肋軟骨由来の肥大化能を有さない軟骨細胞の確認）

肋軟骨由来の静止軟骨細胞を希釈した細胞液に、肥大化能を有する軟骨細胞が存在するか否かを、実施例1と同様の手順を用いて確認した。アルカリホスファターゼ染色では、ヒドロキシアパタイトは染まらなかった（図1Cを参照のこと）。トルイジン青染色では、ヒドロキシアパタイトは青く斑点状に染まり、細胞が存在することが確認された（図1Dを参照のこと）。ヒドロキシアパタイト上に存在する細胞にはアルカリホスファターゼ活性がないことが確認された。このことにより、本比較例で使用する細胞液には、肥大化能を有さない軟骨細胞が存在することが確認できた。

15

20 （肥大化能を有する軟骨細胞マーカー遺伝子の発現の確認）

本比較例では、実施例1と同様の方法を用いて、アルカリホスファターゼ、I型コラーゲン、アグリカン、オステオカルシンの発現量について、リアルタイムPCRで測定した。内在性コントロール遺伝子として、GAPDHを用いた。

試料として、本比較例において調製した肥大化能を有なさい軟骨細胞（5×10⁵個）を遠心分離（170～200×gで3～5分間）することによりペレットにして、37℃、5% CO₂インキュベーター中で1週間培養したもの

25

(R p 1 および R p 2) を用いた。培地には、HAM培地+10%FBSまたはMEM培地+15%FBSを用いた。

実施例1と同様の方法を用いて、リアルタイムPCR反応を行い、リアルタイムPCR機器(ABI社、PRISM 7900HT)にて各細胞マーカーの発現量の測定を行った。PCR反応後、しきい値の設定および到達サイクルの算出を、機器(PRISM 7900HT)内蔵の解析ソフトにより実施した。各細胞マーカーの値を、GAPDHの値で除して発現量の平均値を算出した。その結果、肥大化能を有さない軟骨細胞はI型コラーゲンおよびアグリカンを発現するが、アルカリホスファターゼおよびオステオカルシンはいずれも発現しなかった(表II)。

(表 I I)

アルカリホスファターゼ

	量 (GAPDHによる補正值) 平均値			
試料	1	2	3	平均
Rp1	0.0002	0.0003	0.0003	0.0002
Rp2	0.0001	0.0001	0.0001	0.0001

Ⅱ型コラーゲン

	量 (GAPDHによる補正值) 平均値			
試料	1	2	3	平均
Rp1	0.3448	0.4111	0.4168	0.3909
Rp2	0.2838	0.2762	0.2877	0.2826

アグリカン

	量 (GAPDHによる補正值) 平均値			
試料	1	2	3	平均
Rp1	1.0586	1.1427	1.1478	1.1164
Rp2	1.0437	0.8835	0.9133	0.9468

オステオカルシン

	量 (GAPDHによる補正值) 平均値			
試料	1	2	3	平均
Rp1	0.0001	0.0001	0.0002	0.0001
Rp2	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000

R p 1 および R p 2 : 肥大化能を有さない軟骨細胞のペレットを1週間培養したもの

実施例1と同様の方法を使用して軟骨細胞マーカーの局在または発現を検出し、形態学的にも検索して、得られた細胞が肥大化能を有さない軟骨細胞であることを確認した。

(肋軟骨から採取した静止軟骨細胞をMEM分化因子産生培地で培養した場合に産生する因子の検出)

肋軟骨から採取した静止軟骨細胞を、MEM分化因子産生培地（最小必須培地（MEM培地）、15% FBS（ウシ胎仔血清）、デキサメサゾン10 nM、
5 β -グリセロホスフェート10 mM、アスコルビン酸50 μ g/ml、100 U/ml ペニシリン、0.1 mg/ml ストレプトマイシン、および0.25 μ g/ml アンホテリシンB）を加えて 4×10^4 細胞/cm²に希釈し、培養し、経時的に（4日目、7日目、11日目、14日目、18日目、21日目に）各培地の上清を回収した。

10 マウスC3H10T1/2細胞（大日本住友製薬社製、CCL-226）を24穴プレートに播種し、18時間後に上記の培養上清1 mlを添加して、37℃にて5% CO₂インキュベーター中で培養した。72時間後に、実施例1と同様の方法によりアルカリホスファターゼ活性を測定した。相対活性値レベルで評価した場合、アルカリホスファターゼ活性は、MEM分化因子産生培地のみを添加した場合を1とすると、4日後に採取した培養上清を添加すると約0.9倍、
15 1週後に採取した培養上清では約1.1倍、2週後に採取した培養上清では約1.0倍、3週後に採取した培養上清では約1.1倍であった（表2上段および図4を参照のこと）。

MEM分化因子産生培地を用いた細胞培養物の上清を添加した場合、アルカリ
20 ホスファターゼ活性は、MEM分化因子産生培地のみを添加した場合とほとんど変わらなかった。上記の操作により得られた細胞培養物の上清が、C3H10T1/2細胞の誘導骨芽細胞マーカーを発現させるか否かを実施例1と同様の方法および判定基準で確認することができる。

25 （比較例1C：肋軟骨由来の静止軟骨細胞をMEM増殖培地で培養した場合に産生する因子の調製および検出）

比較例 1 B と同様の方法により、肋軟骨から静止軟骨細胞を採取した。静止軟骨細胞を、MEM 増殖培地（最小必須培地（MEM 培地）、15% FBS、100 U/ml ペニシリン、0.1 mg/ml ストレプトマイシン、および 0.25 μ g/ml アンホテリシン B）を加えて 4×10^4 細胞/cm² に希釈し、培養し、経時的に（4 日目、7 日目、11 日目、14 日目、18 日目、21 日目に）培地の上清を回収した。

マウス C3H10T1/2 細胞（大日本住友製薬社製、CCL-226）を 24 穴プレートに均一に播種し、18 時間後に上記の培養上清 1 ml を添加して、37℃にて 5% CO₂ インキュベーター中で培養した。72 時間後に、実施例 1 と同様の方法によりアルカリホスファターゼ活性を測定した。相対活性値レベルで評価した場合、アルカリホスファターゼ活性は、MEM 増殖培地のみを添加した場合を 1 とすると、4 日後に採取した培養上清を添加すると約 1.0 倍、1 週後に採取した培養上清では約 1.0 倍、2 週後に採取した培養上清では約 0.9 倍、3 週後に採取した培養上清では約 1.1 倍であった（表 2 下段および図 4 を参照のこと）。

MEM 増殖培地を用いた細胞培養物の上清を添加した場合、アルカリホスファターゼ活性は、MEM 増殖培地のみを添加した場合とほとんど変わらなかった（表 2 下段および図 4 を参照のこと）。上記の操作により得られた細胞培養物の培養上清が、C3H10T1/2 細胞の誘導骨芽細胞マーカーを発現させるか否かを実施例 1 と同様の方法および判定基準で確認することができる。

(表2: 肋軟骨由来の静止軟骨細胞を、MEM分化因子産生培地およびMEM増殖培地で培養した上清を添加した場合のアルカリホスファターゼ活性)

		MEM分化因子産生培地(平均値)				
		0 日	4 日	1 週間	2 週間	3 週間
8 週齢	相対値	1	0.9	1.1	1.0	1.1
	絶対値(上清添加)		0.014	0.015	0.015	0.014
	絶対値(培地のみ添加)	0.015	0.015	0.014	0.014	0.014
		MEM増殖培地(平均値)				
		0 日	4 日	1 週間	2 週間	3 週間
8 週齢	相対値	1	1.0	1.0	0.9	1.1
	絶対値(上清添加)		0.014	0.012	0.012	0.012
	絶対値(培地のみ添加)	0.013	0.013	0.012	0.011	0.011

8 週齢：3 回実験を行った。1 回目 3 試行、2 回目 1 試行、3 回目 3 試行した。

(比較例 1 B および比較例 1 C のまとめ)

肋軟骨から採取した肥大化能を有さない静止軟骨細胞は、MEM 分化因子産生培地で培養しても、MEM 増殖培地で培養しても、未分化細胞を誘導骨芽細胞に分化誘導させる能力を有する因子を産生しないことが確認された。

(比較例 1 D：関節軟骨由来の軟骨細胞を MEM 分化因子産生培地で培養した場合に産生する因子の調製および検出)

(関節軟骨からの軟骨細胞の調製)

8 週齢雄性ラット (Wistar 系) をクロロホルムを使用して屠殺した。ラットの膝関節周囲をバリカンで剃毛し、ヒビテン液 (10 倍希釈) に全身を浸し消毒した。膝関節部を切開し、無菌的に関節軟骨を採取した。この関節軟骨を細切し、0.25% トリプシン-EDTA/D-PBS 中で、37℃ で 1 時間攪拌した。次いで、遠心分離 (170 × g で 3 分間) により洗浄し、その後 0.2% コラゲナーゼ/D-PBS とともに 37℃ で、2.5 時間攪拌した。遠心分離 (170 × g で 3 分間) により洗浄した後、攪拌用フラスコ中で 0.2% ディス

パーゼ／（HAM＋１０％ FBS）とともに、３７℃にて、１晩攪拌した。０．２％ディスパーゼでの１晩処理を省く場合もある。翌日、濾過し、遠心分離（１７０×gで３分間）により洗浄した。細胞を、トリパンブルーにより染色し、顕微鏡を用いて細胞数をカウントした。

- ５ 評価は、呈色しなかった細胞を生細胞とし、青色に呈色した細胞を死細胞とした。

（関節軟骨部由来の肥大化能を有さない軟骨細胞の確認）

- １０ 関節軟骨部由来の軟骨細胞を希釈した細胞液に、肥大化能を有する軟骨細胞が存在するか否かを、実施例１と同様の手順を用いて確認した。アルカリホスファターゼ染色では、ヒドロキシアパタイトは染まらなかった（図１Eを参照のこと）。トルイジン青染色では、ヒドロキシアパタイトは青く斑点状に染まり、細胞が存在することが確認された（図１Fを参照のこと）。ヒドロキシアパタイト上に存在する細胞にはアルカリホスファターゼ活性がないことが確認された。このことにより、本比較例で使用する細胞液には、肥大化能を有さない軟骨細胞が存在することが確認できた。

実施例１と同様の方法および判定基準を使用して軟骨細胞マーカーの局在または発現を検出し、形態学的にも検索して、得られた細胞が肥大化能を有さない軟骨細胞であるか否かを確認する。

２０

（関節軟骨部から採取した軟骨細胞をMEM分化因子産生培地で培養した場合に産生する因子の検出）

- ２５ 関節軟骨部から採取した軟骨細胞を、MEM分化因子産生培地（最小必須培地（MEM培地）、１５％ FBS（ウシ胎仔血清）、デキサメサゾン１０nM、β-グリセロホスフェート１０mM、アスコルビン酸５０μg/ml、１００U/mlペニシリン、０．１mg/mlストレプトマイシン、および０．２５μg

／m l アンホテリシン B) を加えて 4×10^4 細胞／c m² に希釈し、培養し、経時的に (4 日目、7 日目、11 日目、14 日目、18 日目、21 日目に) 各培地の上清を回収した。

マウス C3H10T1／2 細胞 (大日本住友製薬社製、CCL-226) を 2
4 穴プレートに播種し、18 時間後に上記の培養上清 1 m l を添加して、37℃
にて 5% CO₂ インキュベーター中で培養した。72 時間後に、実施例 1 と同様の方法によりアルカリホスファターゼ活性を測定した。相対活性値レベルで評価した場合、アルカリホスファターゼ活性は、MEM 分化因子産生培地のみを添加した場合を 1 とすると、4 日後に採取した培養上清を添加すると約 1.4 倍、
1 週後に採取した培養上清では約 1.1 倍、2 週後に採取した培養上清では約 1.1 倍、3 週後に採取した培養上清では約 1.1 倍であった (表 3 上段および図 5 A を参照のこと)。

MEM 分化因子産生培地を用いた細胞培養物の上清を添加した場合、アルカリホスファターゼ活性は、MEM 分化因子産生培地のみを添加した場合とほとんど変わらなかった。上記の操作により得られた細胞培養物の上清が、C3H10T1／2 細胞の誘導骨芽細胞マーカーを発現させるか否かを実施例 1 と同様の方法および判定基準で確認することができる。

(比較例 1 E : 関節軟骨部から採取した軟骨細胞を MEM 増殖培地で培養した場合に産生する因子の調製および検出)

比較例 1 D と同様の方法により、関節軟骨部から軟骨細胞を採取した。軟骨細胞を、MEM 増殖培地 (最小必須培地 (MEM 培地)、15% FBS、100 U／m l ペニシリン、0.1 mg／m l ストレプトマイシン、および 0.25 μg／m l アンホテリシン B) を加えて 4×10^4 細胞／c m² に希釈し、培養し、経時的に (4 日目、7 日目、11 日目、14 日目、18 日目、21 日目に) 培地の上清を回収した。

マウスC3H10T1/2細胞（大日本住友製薬社製、CCL-226）を24穴プレートに播種し、18時間後に上記の培地1mlを添加して、37℃にて5% CO₂インキュベーター中で培養した。72時間後に、実施例1と同様の方法によりアルカリホスファターゼ活性を測定した。相対活性値レベルで評価した場合、アルカリホスファターゼ活性は、MEM増殖培地のみを添加した場合を1とすると、4日後に採取した培養上清を添加すると約1.1倍、1週後に採取した培養上清では約1.0倍、2週後に採取した培養上清では約1.1倍、3週後に採取した培養上清では約1.2倍であった（表3下段および図5Aを参照のこと）。

関節軟骨部由来の軟骨細胞をMEM増殖培地で培養した培養上清を添加した場合、アルカリホスファターゼ活性は、MEM増殖培地のみ添加した場合とほとんど変わらなかった（表3および図5Aを参照のこと）。上記の操作により得られた細胞培養物の上清が、C3H10T1/2細胞の誘導骨芽細胞マーカーを発現させるか否かを実施例1と同様の方法および判定基準で確認することができる。

（表3：関節軟骨部由来の軟骨細胞をMEM分化因子産生培地およびMEM増殖培地で培養した上清を添加した場合のアルカリホスファターゼ活性）

		MEM分化因子産生培地(平均値)				
		0日	4日	1週間	2週間	3週間
8週齢	相対値	1	1.4	1.1	1.1	1.1
	絶対値(上清添加)		0.020	0.019	0.019	0.020
	絶対値(培地のみ添加)	0.016	0.016	0.017	0.016	0.017
8週齢:6回実験した。1回目1試行、2回目1試行、3回目3試行、4回目2試行、5回目1試行、6回目1試行した。						

		MEM増殖培地(平均値)				
		0日	4日	1週間	2週間	3週間
8週齢	相対値	1	1.1	1.0	1.1	1.2
	絶対値(上清添加)		0.019	0.017	0.017	0.019
	絶対値(培地のみ添加)	0.018	0.018	0.018	0.014	0.017
8週齢:5回実験した。1回目2試行、2回目2試行、3回目3試行、4回目1試行、5回目1試行した。						

(比較例 1 D および 1 E のまとめ)

関節軟骨部由来の肥大化能を有さない軟骨細胞は、MEM 分化因子産生培地で培養しても、MEM 増殖培地で培養しても、未分化細胞を誘導骨芽細胞に分化誘導させる能力を有する因子を産生しないことが確認された。

5

(実施例 2 : 胸骨軟骨部由来の肥大化能を有する軟骨細胞を MEM 分化因子産生培地で培養した場合に産生する細胞機能調節因子の調製および検出)

(胸骨軟骨部からの肥大化能を有する軟骨細胞の調製)

8 週齢雄性ラット (W i s t a r 系) をクロロホルムを使用して屠殺する。ラット
10 の胸部をバリカンで剃毛し、ヒビテン液 (10 倍希釈) に全身を浸し消毒する。胸部を切開し、無菌的に胸骨軟骨部体下部および剣状突起部を採取する。この胸骨軟骨部体下部および剣状突起部より半透明の成長軟骨部を採取する。これらの成長軟骨部を細切し、0.25%トリプシン-EDTA/Dulbecco's phosphate buffered saline(D-PBS)中で、37℃で1時間攪拌する。次いで、遠心分離 (1
15 70×gで3分間)により洗浄し、その後0.2%コラゲナーゼ (インビトロジェン社製) /D-PBSとともに37℃で、2.5時間攪拌する。遠心分離 (170×gで3分間)により洗浄した後、攪拌用フラスコ中で0.2%ディスパーゼ (インビトロジェン社製) / (HAM+10% FBS)とともに、37℃にて、1晩攪拌した。0.2%ディスパーゼでの1晩処理を省く場合もある。翌日、
20 濾過し、遠心分離 (170×gで3分間)により洗浄する。細胞を、トリパンブルーにより染色し、顕微鏡を用いて細胞数をカウントする。

評価は、呈色しなかった細胞を生細胞とし、青色に呈色した細胞を死細胞とする。

(肥大化能を有する軟骨細胞の確認)

実施例 1 と同様の方法および判定基準を使用して、採取した細胞が肥大化能を有する軟骨細胞であるか否かを確認する。

- 5 (胸骨軟骨部由来の肥大化能を有する軟骨細胞をMEM分化因子産生培地で培養した場合に産生する因子の検出)

胸骨軟骨部由来の肥大化能を有する軟骨細胞を、MEM分化因子産生培地（最小必須培地（MEM培地）、15% FBS（ウシ胎仔血清）、デキサメサゾン 10 nM、 β -グリセロホスフェート 10 mM、アスコルビン酸 50 μ g/ml、
10 100 U/ml ペニシリン、0.1 mg/ml ストレプトマイシン、および 0.25 μ g/ml アンホテリシンBを加えて 4×10^4 細胞/cm² に希釈し、培養し、経時的に（4日目、7日目、11日目、14日目、18日目、21日目に）培地の上清を回収する。

マウス C3H10T1/2 細胞（大日本住友製薬社製、CCL-226）を 2
15 4 穴プレートに播種し、18時間後に上記の培養上清 1 ml を添加して、37℃にて 5% CO₂ インキュベーター中で培養する。72時間後に、実施例 1 と同様の方法によりアルカリホスファターゼ活性を測定する。

MEM分化因子産生培地を用いた細胞培養物の上清を添加した場合、アルカリホスファターゼ活性は、MEM分化因子産生培地のみを添加した場合と比べて上昇する。
20

(誘導骨芽細胞の確認)

実施例 1 と同様の方法および判定基準を用いて、上記の操作により得られた細胞培養物の培養上清は、マウス C3H10T1/2 細胞の誘導骨芽細胞マーカー
25 を発現させることを確認する。

(比較例 2 : 胸骨軟骨部由来の肥大化能を有する軟骨細胞を MEM 増殖培地で培養した場合に産生する因子の調製)

実施例 2 と同様の方法により、胸骨軟骨部より肥大化能を有する軟骨細胞を採取する。肥大化能を有する軟骨細胞を、MEM 増殖培地 (最小必須培地 (MEM 培地)、15% FBS、100 U/ml ペニシリン、0.1 mg/ml ストレプトマイシンおよび 0.25 μ g/ml アンホテリシン B) を加えて 4×10^4 細胞/cm² に希釈し、培養し、経時的に培地の上清を回収する。

マウス C3H10T1/2 細胞 (大日本住友製薬社製、CCL-226) を 24 穴プレートに播種し、18 時間後に上記の培養上清 1 ml を添加して、37℃にて 5% CO₂ インキュベーター中で培養する。72 時間後に、実施例 1 と同様の方法によりアルカリホスファターゼ活性を測定する。

MEM 増殖培地を用いた細胞培養物の上清を添加した場合、アルカリホスファターゼ活性は、MEM 増殖培地のみを添加した場合とほとんど変わらない。上記の操作により得られた細胞培養物の上清が、C3H10T1/2 細胞の誘導骨芽細胞マーカーを発現させるか否かを実施例 1 と同様の方法および判定基準で確認することができる。

(実施例 2 および比較例 2 のまとめ)

MEM 分化因子産生培地を用いて肥大化能を有する軟骨細胞を培養した場合、この培養上清が、マウス C3H10T1/2 細胞のアルカリホスファターゼ活性を上昇させたとき、誘導骨芽細胞に分化誘導する因子が存在すると判定される。一方、MEM 増殖培地を用いて肥大化能を有する軟骨細胞を培養した場合、この培養上清が、マウス C3H10T1/2 細胞のアルカリホスファターゼ活性を上昇させないとき、この因子が存在しないこと判定される。この場合、肥大化能を有する軟骨細胞は、MEM 分化因子産生培地で培養すると、未分化細胞を誘導骨芽細胞に分化誘導させる因子を産生すると判定される。

(実施例 3 : 肋骨・肋軟骨部由来の肥大化能を有する軟骨細胞をHAM分化因子産生培地で培養した場合に産生する細胞機能調節因子の調製および検出)

(肋骨・肋軟骨部から採取した肥大化能を有する軟骨細胞によって生産された因子の検出)

5 実施例 1 により得られた肥大化能を有する軟骨細胞を、HAM分化因子産生培地 (HAM培地、10% FBS (ウシ胎仔血清)、デキサメサゾン 10 nM、 β -グリセロホスフェート 10 mM、アスコルビン酸 50 μ g/ml、100 U/ml ペニシリン、0.1 mg/ml ストレプトマイシン、および 0.25 μ g/ml アンホテリシン B を加えて 4×10^4 細胞/cm² に希釈し、播種し、培養し、経時的に (4 日目、7 日目、11 日目、14 日目、18 日目、21 日目) 培地の上清を回収した。

マウス C3H10T1/2 細胞 (大日本住友製薬社製、CCL-226) を 24 穴プレートに播種し、18 時間後に上記の培養上清 1 ml を添加して、37℃ にて 5% CO₂ インキュベーター中で培養した。72 時間後に、実施例 1 と同様の方法によりアルカリホスファターゼ活性を測定した。相対活性値レベルで評価した場合、アルカリホスファターゼ活性は、HAM分化因子産生培地のみを添加した場合を 1 とすると、4 日後に採取した培養上清を添加すると約 1.2 倍、1 週後に採取した培養上清では約 2.3 倍、2 週後に採取した培養上清では約 3.1 倍、3 週後に採取した培養上清では約 2.2 倍であった (表 3-2 上段および図 5 B を参照のこと)。

誘導骨芽細胞分化誘導能を有する因子によって、誘導骨芽細胞マーカーの一つである、C3H10T1/2 細胞のアルカリホスファターゼ (ALP) 活性が上昇することが示された (表 3-2 および図 5 B)。さらにアルカリホスファターゼ染色法によってもアルカリホスファターゼが発現していることが示された。この結果、C3H10T1/2 細胞が誘導骨芽細胞に分化したことが確認された。

(表 3-2: 肥大化能を有する軟骨細胞をHAM分化因子産生培地およびHAM増殖培地で培養した上清を添加した場合のアルカリホスファターゼ活性)

HAM 分化因子産生培地 (平均値)

	0 日	4 日	1 週間	2 週間	3 週間
相対値	1	1.2	2.3	3.1	2.2
絶対値(上清添加)	0.015	0.018	0.033	0.047	0.037
絶対値(培地のみ添加)	0.015		0.014	0.015	0.017

3 回実験を行った。1 回につき 3 試行した。

HAM 増殖培地 (平均値)

	0 日	4 日	1 週間	2 週間	3 週間
相対値	1	1.0	0.9	1.2	1.2
絶対値(上清添加)	0.026	0.025	0.023	0.020	0.024
絶対値(培地のみ添加)	0.026		0.024	0.021	0.023

5 回実験を行った。1~4 回目: 3 試行、5 回目: 2 試行した。

(比較例 3 A: 肋骨・肋軟骨部由来の肥大化能を有する軟骨細胞をHAM増殖培地で培養した場合に産生する因子の調製および検出)

実施例 1 と同様の方法により、肋骨・肋軟骨部から肥大化能を有する軟骨細胞を採取した。肥大化能を有する軟骨細胞を、HAM増殖培地 (HAM培地、10% FBS、100 U/ml ペニシリン、0.1 mg/ml ストレプトマイシンおよび0.25 μ g/ml アンホテリシンB) を加えて 4×10^4 細胞/cm² に希釈し、培養し、経時的に培地の上清を回収した。

マウス C3H10T1/2 細胞 (大日本住友製薬社製、CCL-226) を 24 穴プレートに播種し、18 時間後に上記の培養上清 1 ml を添加して、37℃にて5% CO₂ インキュベーター中で培養した。72 時間後に、実施例 1 と同様の方法によりアルカリホスファターゼ活性を測定した。相対活性値レベルで評価した場合、アルカリホスファターゼ活性は、HAM増殖培地のみを添加した場合を 1 とすると、4 日後に採取した培養上清を添加すると約 1.0 倍、1 週後に採取した培養上清では約 0.9 倍、2 週後に採取した培養上清では約 1.2 倍、3 週後に採取した培養上清では約 1.2 倍であった (表 3-2 下段および図 5 C

を参照のこと)。

HAM増殖培地を用いた細胞培養物の上清を添加した場合、アルカリホスファターゼ活性は、HAM増殖培地のみを添加した場合とほとんど変わらなかった(表3-2下段および図5Cを参照のこと)。上記の操作により得られた細胞培養物の上清は、C3H10T1/2細胞の誘導骨芽細胞マーカーを発現させないことを確認した。

(実施例3および比較例3Aのまとめ)

HAM分化因子産生培地を用いて肥大化能を有する軟骨細胞を培養した場合、この培養上清には、未分化細胞であるマウスC3H10T1/2細胞のアルカリホスファターゼ活性を上昇させ、誘導骨芽細胞に分化誘導する因子が存在することが確認された。一方、HAM増殖培地を用いて肥大化能を有する軟骨細胞を培養した場合、この培養上清にはこの因子が存在しないことが確認された。肥大化能を有する軟骨細胞は、HAM分化因子産生培地で培養すると、未分化細胞を誘導骨芽細胞に分化誘導させる因子を産生することが見出された。

(比較例3B：肋軟骨由来の静止軟骨細胞を、HAM分化因子産生培地で培養した場合に産生する因子の調製および検出)

比較例1Bと同様の方法を使用して肋軟骨から採取した静止軟骨細胞を、HAM分化因子産生培地(HAM培地、10% FBS(ウシ胎仔血清)、デキサメサゾン10nM、 β -グリセロホスフェート10mM、アスコルビン酸50 μ g/ml、100U/mlペニシリン、0.1mg/mlストレプトマイシン、および0.25 μ g/mlアンホテリシンB)を加えて 4×10^4 細胞/cm²に希釈し、培養し、経時的に各培地の上清を回収する。

マウスC3H10T1/2細胞(大日本住友製薬社製、CCL-226)を24穴プレートに均一に播種し、18時間後に上記の培養上清1mlを添加して、

培養する。72時間後に、実施例1と同様の方法によりアルカリホスファターゼ活性をそれぞれ測定する。

HAM分化因子産生培地を用いた細胞培養物の上清を添加した場合、アルカリホスファターゼ活性が、HAM分化因子産生培地のみまたはHAM増殖培地のみを添加した場合とほとんど変わらず、上記の操作により得られた細胞培養物の培養上清が、C3H10T1/2細胞の誘導骨芽細胞マーカーを発現させなければ、誘導骨芽細胞に分化していないと判定する。この場合、肋軟骨由来の静止軟骨細胞は、HAM分化因子産生培地で培養すると、未分化細胞を誘導骨芽細胞に分化誘導させる能力を有する因子を産生しないと判定される。

(比較例3C：肋軟骨由来の静止軟骨細胞を、HAM増殖培地で培養した場合に産生する因子の調製および検出)

比較例1Bと同様の方法を使用して肋軟骨から採取した静止軟骨細胞を、HAM増殖培地（HAM培地、10% FBS、100U/ml ペニシリン、0.1 mg/ml ストレプトマイシン、および0.25 μg/ml アンホテリシンB）を加えて 4×10^4 細胞/cm²に希釈し、培養し、経時的に各培地の上清を回収する。

マウスC3H10T1/2細胞（大日本住友製薬社製、CCL-226）を24穴プレートに均一に播種し、18時間後に上記の培養上清1mlを添加して、培養する。72時間後に、実施例1と同様の方法によりアルカリホスファターゼ活性をそれぞれ測定する。

HAM増殖培地を用いた細胞培養物の上清を添加した場合、アルカリホスファターゼ活性が、HAM分化因子産生培地のみまたはHAM増殖培地のみを添加した場合とほとんど変わらず、上記の操作により得られた細胞培養物の培養上清が、C3H10T1/2細胞の誘導骨芽細胞マーカーを発現させなければ、誘導骨芽細胞に分化していないと判定する。この場合、肋軟骨由来の静止軟骨細胞は、H

AM増殖培地で培養すると、未分化細胞を誘導骨芽細胞に分化誘導させる能力を有する因子を産生しないと判定される。

(実施例1、実施例3、比較例1A～1E、3A～3Cのまとめ)

- 5 上記実施例より、肥大化能を有する軟骨細胞は、分化因子産生培地に含まれる基礎培地の種類にかかわらず、未分化細胞を誘導骨芽細胞に分化誘導させる因子を産生する。肥大化能を有する軟骨細胞は、いずれの増殖培地でも、未分化細胞を誘導骨芽細胞に分化誘導させる因子を産生しない。さらに、肥大化能を有さない静止軟骨細胞および関節軟骨細胞は、いずれの培地で培養しても未分化細胞を
- 10 誘導骨芽細胞に分化誘導させる因子を産生しない。このことより、未分化細胞を誘導骨芽細胞に分化誘導させる因子は、肥大化能を有する軟骨細胞を分化因子産生培地中で培養することによってのみ産生されることが示唆される。さらに、培地中に含まれる基礎培地は、通常、細胞培養に用いられ得る培地であれば、誘導骨芽細胞分化誘導因子の産生には影響を及ぼさず、本方法において使用可能であると
- 15 考えられる。

(実施例4：ヒト由来の肥大化能を有する軟骨細胞をMEM分化因子産生培地で培養した場合に産生する細胞機能調節因子の調製および検出)

(ヒト由来の肥大化能を有する軟骨細胞による因子の検出)

- 20 多肢症、腫瘍、提供軟骨組織などのヒト組織由来の肥大化能を有する軟骨細胞を、ヒト組織資源活用機関（ヒューマンサイエンス振興財団研究資源バンク、理化学研究所細胞開発バンク、厚生省国立医薬品食品衛生研究所細胞バンク、東北大学加齢医学研究所などの国内機関、およびI I A M、A T C Cなどの海外機関、O s i r i s社などの細胞提供業者）より入手する。入手した肥大化能を有する
- 25 軟骨細胞を、MEM分化因子産生培地（MEM培地、15% FBS（ウシ胎仔血清）、デキサメサゾン1.0 nM、 β -グリセロホスフェート10 mM、アスコ

ルビン酸 $50 \mu\text{g}/\text{ml}$ 、 $100 \text{U}/\text{ml}$ ペニシリン、 $0.1 \text{mg}/\text{ml}$ ストレプトマイシン、および $0.25 \mu\text{g}/\text{ml}$ アンホテリシンBを加えて 4×10^4 細胞/ cm^2 に希釈し、播種し、培養し、経時的に培地の上清を回収する。

5 研究用ヒト間葉系幹細胞を前記機関から入手し、24穴プレートに均一に播種し、18時間後に上記の培養上清 1ml を添加して、培養する。72時間後に、実施例1と同様の方法によりアルカリホスファターゼ活性を測定する。

誘導骨芽細胞分化誘導能を有する因子によって、誘導骨芽細胞マーカーの一つである、研究用ヒト未分化細胞のアルカリホスファターゼ (ALP) 活性が上昇することが示されるとき、未分化細胞が誘導骨芽細胞に分化したと判定される。
10 さらにアルカリホスファターゼ染色においても、アルカリホスファターゼが発現しているとき、未分化細胞が誘導骨芽細胞に分化したと判定される。

(比較例4A：ヒト由来の肥大化能を有する軟骨細胞をMEM増殖培地で培養した場合に産生する因子の調製および検出)

15 実施例4と同様に入手した肥大化能を有する軟骨細胞を、MEM増殖培地 (MEM培地および15% FBS、 $100 \text{U}/\text{ml}$ ペニシリン、 $0.1 \text{mg}/\text{ml}$ ストレプトマイシン、および $0.25 \mu\text{g}/\text{ml}$ アンホテリシンB) を加えて 4×10^4 細胞/ cm^2 に希釈し、培養し、経時的に培地の上清を回収する。

研究用ヒト未分化細胞を24穴プレートに播種し、18時間後に上記の培養上
20 清 1ml を添加して培養する。72時間後に、実施例1と同じ方法を用いてアルカリホスファターゼ活性を測定する。

MEM増殖培地を用いた細胞培養物の上清を添加した場合、アルカリホスファターゼ活性が、MEM増殖培地のみを添加した場合とほとんど変わらなければ、未分化細胞を誘導骨芽細胞へ分化誘導させる因子を生成しないと判定される。

25 ヒト由来の肥大化能を有する軟骨細胞は、MEM分化因子産生培地で培養する場合、未分化細胞を誘導骨芽細胞に分化誘導させる因子を産生すると予測される。

一方、ヒト由来の肥大化能を有する軟骨細胞は、MEM増殖培地で培養する場合には、未分化細胞を誘導骨芽細胞へ分化誘導させる因子を生成しないことと予測される。

5 (比較例4B：ヒト由来の肥大化能を有さない軟骨細胞を、MEM分化因子産生培地およびMEM増殖培地で培養した場合に産生する因子の調製および検出)

ヒト由来の肥大化能を有さない軟骨細胞を前記機関から入手する。この軟骨細胞に、MEM分化因子産生培地およびMEM増殖培地をそれぞれ加えて 4×10^4 細胞/cm² に希釈し、培養し、経時的に各培地の上清を回収する。研究用ヒト未分化細胞を24穴プレートに播種し、18時間後に上記の培養上清1mlをそれぞれ添加して、培養する。72時間後に実施例1と同様の方法によりアルカリホスファターゼ活性を測定する。

ヒト由来の肥大化能を有さない軟骨細胞は、MEM分化因子産生培地で培養する場合、アルカリホスファターゼ活性がほとんど変わらなければ、未分化細胞を誘導骨芽細胞に分化誘導させる能力を有する因子を産生しないと判定される。また、MEM増殖培地で培養する場合、アルカリホスファターゼ活性がほとんど変わらなければ、未分化細胞を誘導骨芽細胞に分化誘導させる能力を有する因子を産生しないと判定される。

ヒト由来の肥大化能を有さない軟骨細胞は、MEM分化因子産生培地で培養しても、MEM増殖培地で培養しても、未分化細胞を誘導骨芽細胞に分化誘導させる能力を有する因子を産生しないと予測される。

(実施例5：ヒト由来の肥大化能を有する軟骨細胞を、HAM分化因子産生培地で培養した場合に産生する細胞機能調節因子の調製および検出)

25 実施例4と同様に入手したヒト由来の肥大化能を有する軟骨細胞に、HAM分化因子産生培地を加えて 4×10^4 細胞/cm² に希釈し、培養し、経時的に各

培地の上清を回収する。研究用ヒト未分化細胞を24穴プレートに播種し、18時間後に上記の培養上清1mlを添加して、培養する。72時間後に実施例1と同様の方法によりアルカリホスファターゼ活性を測定する。

- 5 ヒト由来の肥大化能を有する軟骨細胞は、HAM分化因子産生培地で培養する場合、未分化細胞を誘導骨芽細胞に分化誘導させる因子を誘導することを実施例1と同様の方法および判定基準で確認することができる。

(比較例5A：ヒト由来の肥大化能を有する軟骨細胞を、HAM増殖培地で培養した場合に産生する因子の調製および検出)

- 10 ヒト由来の肥大化能を有する軟骨細胞に、HAM増殖培地を加えて 4×10^4 細胞/cm²に希釈し、培養し、経時的に各培地の上清を回収する。研究用ヒト未分化細胞を24穴プレートに播種し、18時間後に上記の培養上清1mlを添加して、培養する。72時間後に実施例1と同様の方法によりアルカリホスファターゼ活性を測定する。

- 15 ヒト由来の肥大化能を有する軟骨細胞は、HAM増殖培地で培養する場合には、未分化細胞を誘導骨芽細胞へ分化誘導させる因子を生成しないことを実施例1と同様の方法および判定基準で確認することができる。

- 20 (比較例5B：ヒト由来の肥大化能を有さない軟骨細胞を、HAM分化因子産生培地およびHAM増殖培地で培養した場合に産生する因子の調製および検出)

- 比較例4Bと同様に入手したヒト由来の肥大化能を有さない軟骨細胞に、HAM分化因子産生培地およびHAM増殖培地をそれぞれ加えて 4×10^4 細胞/cm²に希釈し、培養し、経時的に各培地の上清を回収する。研究用ヒト未分化細胞を24穴プレートに播種し、18時間後に上記の培養上清1mlをそれぞれ添加して、培養する。72時間後に実施例1と同様の方法によりアルカリホスファターゼ活性を測定する。
- 25

ヒト由来の肥大化能を有さない軟骨細胞をHAM分化因子産生培地、HAM増殖培地を用いた細胞培養物の培養上清を添加した場合、得られた細胞培養物の培養上清が、未分化細胞の誘導骨芽細胞マーカーを発現させるか否かを実施例1と同様の方法および判定基準で確認することができる。

5

(実施例4～5および比較例4A～5Bのまとめ)

上記実施例より、ヒト由来肥大化能を有する軟骨細胞が、分化因子産生培地に含まれる基礎培地の種類にかかわらず、未分化細胞を誘導骨芽細胞に分化誘導させる因子を産生するか否かを検討することができる。実施例1、3および比較例10 1A～1E、3A～3Cより、ラット由来の肥大化能を有する軟骨細胞は、いずれの増殖培地でも、未分化細胞を誘導骨芽細胞に分化誘導させる因子を産生しないことが実証されている。さらに、ラット由来の肥大化能を有さない軟骨細胞は、いずれの培地で培養しても未分化細胞を誘導骨芽細胞に分化誘導させる因子を産生しないことが実証されている。このことより、未分化細胞を誘導骨芽細胞に分化誘導させる因子は、肥大化能を有する軟骨細胞を分化因子産生培地中で培養することによってのみ産生されることが示唆されている。従って、ヒト由来の肥大化能を有する軟骨細胞においても、培地中に含まれる基礎培地が、通常、細胞培養に用いられ得る培地であれば、誘導骨芽細胞分化誘導因子の産生には影響を及ぼさず、本方法において使用可能であると推測される。

20

(実施例6：肥大化能を有する軟骨細胞の産生する因子が、マウスC3H10T1/2細胞以外の未分化細胞を誘導骨芽細胞に分化誘導する活性を有するか否かの検討)

実施例1と同様の方法を使用して、MEM分化因子産生培地またはMEM増殖培地を用いて肥大化能を有する軟骨細胞を培養したときの各培養上清を得た。未分化細胞として、BALB/3T3細胞、3T3-Swiss albino細胞

25

胞およびNIH3T3細胞を用いた。これらの細胞をそれぞれ24穴プレートに播種し、18時間後に上記の培養上清1mlをそれぞれ添加して、37℃にて5% CO₂インキュベーター中で培養した。72時間後に、実施例1と同様の方法によりアルカリホスファターゼ活性を測定した。

- 5 MEM分化因子産生培地を用いて肥大化能を有する軟骨細胞を培養した培養上清を添加した場合、アルカリホスファターゼ活性は、MEM分化因子産生培地のみを添加した場合を1とすると、BALB/3T3細胞では約5.9倍（表4左および図6Aを参照のこと）であり、3T3-Swiss albino細胞では約13.8倍（表4中および図6Aを参照のこと）であり、NIH3T3細胞
10 では約5.4倍であった（表4右および図6Aを参照のこと）。

- MEM増殖培地を用いて肥大化能を有する軟骨細胞を培養した培養上清を添加した場合、アルカリホスファターゼ活性は、MEM増殖培地のみを添加した場合を1とすると、BALB/3T3細胞では約1.3倍（表4左および図6Aを参照のこと）であり、3T3-Swiss albino細胞では約1.1倍（表
15 4中および図6Aを参照のこと）であり、NIH3T3細胞では約0.9倍であった（表4右および図6Aを参照のこと）。

（表4 BALB/3T3細胞、3T3-Swiss albino細胞およびNIH-3T3細胞に対する骨芽細胞分化誘導能）

	BALB/3T3		3T3-Swiss albino		NIH-3T3	
	相対値	絶対値	相対値	絶対値	相対値	絶対値
GC分化上清	5.9	0.107	13.8	0.174	5.4	0.097
分化培地のみ	1	0.018	1	0.013	1	0.018
GC増殖上清	1.3	0.021	1.1	0.013	0.9	0.016
増殖培地のみ	1	0.016	1	0.013	1	0.018

GC（4週齢）：1回実験を行った。3試行した。

- 25 GC分化上清：成長軟骨細胞をMEM分化因子産生培地で培養した培養上清

GC増殖上清：成長軟骨細胞をMEM増殖培地で培養した培養上清

分化培地のみ：MEM分化培地そのもの

増殖培地のみ：MEM増殖培地そのもの

MEM分化因子産生培地を用いて肥大化能を有する軟骨細胞を培養した場合、この培養上清には、3T3-Swiss albino細胞、BALB/3T3細胞およびNIH3T3細胞においてアルカリホスファターゼ活性を上昇させ、これらの未分化細胞を誘導骨芽細胞に分化誘導する因子が存在することが確認された。一方、MEM増殖培地を用いて肥大化能を有する軟骨細胞を培養した場合、これらの培養上清にはこの因子は存在しないことが確認された。

（比較例6：肥大化能を有さない静止軟骨細胞の培養上清に存在する成分が、マウスC3H10T1/2細胞以外の未分化細胞を誘導骨芽細胞に分化誘導する活性を有するか否かの検討）

比較例1Bと同様の方法を使用して、MEM分化因子産生培地またはMEM増殖培地を用いて肥大化能を有さない静止軟骨細胞を培養したときの各培養上清を得た。未分化細胞として、BALB/3T3細胞、3T3-Swiss albino細胞およびNIH3T3細胞を用いた。これらの細胞をそれぞれ24穴プレートに播種し、18時間後に上記の培養上清1mlをそれぞれ添加して、37℃にて5% CO₂インキュベーター中で培養した。72時間後に、実施例1と同様の方法によりアルカリホスファターゼ活性を測定した。

MEM分化因子産生培地を用いて肥大化能を有さない静止軟骨細胞を培養した培養上清を添加した場合、MEM分化因子産生培地のみを添加した場合を1とすると、アルカリホスファターゼ活性は、BALB/3T3細胞では約1.0倍（表5左および図6Aを参照のこと）であり、3T3-Swiss albino細胞では約1.1倍（表5中および図6Aを参照のこと）であり、NIH3T3細胞では約1.0倍であった（表5右および図6Aを参照のこと）。

MEM増殖培地を用いて肥大化能を有さない静止軟骨細胞を培養した培養上清

を添加した場合、MEM増殖培地のみを添加した場合を1とすると、アルカリホスファターゼ活性は、BALB/3T3細胞では約1.3倍（表5左および図6Aを参照のこと）であり、3T3-Swiss albino細胞では約0.9倍（表5中および図6Aを参照のこと）であり、NIH3T3細胞では約1.0倍であった（表5右および図6Aを参照のこと）。

（表5 BALB/3T3細胞、3T3-Swiss albino細胞およびNIH-3T3細胞に対する骨芽細胞分化誘導能）

	BALB/3T3		3T3-Swiss albino		NIH-3T3	
	相対値	絶対値	相対値	絶対値	相対値	絶対値
RC 分化上清	1.0	0.018	1.1	0.014	1.0	0.018
分化培地のみ	1	0.018	1	0.013	1	0.018
RC 増殖上清	1.3	0.020	0.9	0.012	1.0	0.019
増殖培地のみ	1	0.016	1	0.013	1	0.018

RC（8週齢）：1回実験を行った。3試行した。

RC分化上清：静止軟骨細胞をMEM分化因子産生培地で培養した培養上清

RC増殖上清：静止軟骨細胞をMEM増殖培地で培養した培養上清

分化培地のみ：MEM分化培地そのもの

増殖培地のみ：MEM増殖培地そのもの

MEM分化因子産生培地を用いて肥大化能を有さない静止軟骨細胞を培養した場合、アルカリホスファターゼ活性は、BALB/3T3細胞、3T3-Swiss albino細胞およびNIH3T3細胞において、MEM分化因子産生培地のみを添加した場合とほとんど変わらず、この培養上清には、これらの未分化細胞を誘導骨芽細胞に分化誘導する因子が存在しないことが確認された。MEM増殖培地を用いて肥大化能を有さない静止軟骨細胞を培養した場合もまた、これらの培養上清にはこの因子は存在しないことが確認された。

(実施例 7：肋軟骨由来の肥大化能を有する軟骨細胞を種々の従来型骨芽細胞分化誘導成分を含む培地で培養した場合に産生する細胞機能調節因子の調製および検出)

実施例 1 と同様の方法により得られた肋軟骨由来の肥大化能を有する軟骨細胞を、MEM増殖培地 (MEM培地および 15% FBS、100 U/ml ペニシリン、0.1 mg/ml ストレプトマイシン、および 0.25 μ g/ml アンホテリシン B) を加えて 4×10^4 細胞/cm² に希釈し、さらに、従来型骨芽細胞分化誘導成分として、デキサメサゾン、 β -グリセロホスフェート、アスコルビン酸またはこれらの組み合わせを添加して培養し、経時的に培地の上清を回収した。

添加した成分	骨芽細胞分化誘導成分について、各々の添加した濃度
分化因子産生培地	Dex 10 nM、 β GP 10 mM、Asc 50 μ g/ml
Dex	Dex 10 nM
β GP	β GP 10 mM
Asc	Asc 50 μ g/ml
Dex+ β GP	Dex 10 nM、 β GP 10 mM
Dex+Asc	Dex 10 nM、Asc 50 μ g/ml
β GP+Asc	β GP 10 mM、Asc 50 μ g/ml
増殖培地	骨芽細胞分化誘導成分なし

Dex：デキサメサゾン、 β GP： β -グリセロホスフェート、Asc：アスコルビン酸

それぞれの培養上清 1 ml をマウス C3H10T1/2 細胞 (1.25×10^4 細胞/cm²) に添加して、37℃にて 5% CO₂ インキュベーター中で培養した場合のアルカリホスファターゼ活性を測定した。アルカリホスファターゼ活性の測定は、実施例 1 と同様の方法を使用した。その結果、以下の表および図 6 B に示されるように、MEM 分化因子産生培地 (Dex + β GP + Asc) を添加した培地では、アルカリホスファターゼ活性は、0.041 であり、MEM 増殖培地に β GP + Asc を添加した培地では、アルカリホスファターゼ活性は 0.044 であった。増殖培地に従来型骨芽細胞分化誘導成分の各々を単独で添加し

た培地では、アルカリホスファターゼ活性は、Dex 単独では 0.016 であり、 β GP 単独では 0.015 であり、Asc では 0.016 であった。増殖培地に Dex + β GP を添加した培地では、0.022 であり、Dex + Asc を添加した培地では 0.017 であった。対照として増殖培地のみで肥大化能を有する軟骨細胞を培養した培地の上清を、C3H10T1/2 細胞に添加した場合、アルカリホスファターゼは 0.014 であった。MEM 分化因子産生培地のみ、MEM 増殖培地のみを C3H10T1/2 細胞に添加した場合、アルカリホスファターゼ活性は、それぞれ、0.016 および 0.014 であった。

(誘導骨芽細胞分化誘導能を有する因子の産生に対する従来型骨芽細胞分化誘導成分の効果)

	平均	SD
Dex+ β GP+Asc	0.041	0.008
Dex	0.016	0.004
β GP	0.015	0.004
Asc	0.016	0.001
Dex+ β GP	0.022	0.004
Dex+Asc	0.017	0.002
β GP+Asc	0.044	0.016
増殖培地	0.014	0.002
分化培地のみ	0.016	0.002
増殖培地のみ	0.014	0.001

Dex：デキサメサゾン

β GP： β -グリセロホスフェート

Asc：アスコルビン酸

分化培地のみ：MEM 分化因子産生培地そのもの（軟骨細胞を培養していないもの）

増殖培地のみ：MEM 増殖培地そのもの（軟骨細胞を培養していないもの）

肥大化能を有する軟骨細胞を培養するMEM増殖培地に、従来型骨芽細胞分化誘導成分の各々を単独で添加した場合、未分化細胞を誘導骨芽細胞に分化誘導させる因子は産生されなかった。 β -グリセロホスフェートおよびアスコルビン酸を添加した場合、未分化細胞を誘導骨芽細胞に分化誘導させる因子は産生された。

5 デキサメサゾン、 β -グリセロホスフェートおよびアスコルビン酸のすべてを添加した場合（MEM分化因子産生培地と同じ場合）にも、未分化細胞を誘導骨芽細胞に分化誘導させる因子の産生が促進されることが確認された。

（実施例8：肥大化能を有する軟骨細胞をMEM分化因子産生培地中で培養することにより得られる培養上清に含まれる因子の検討）

10

実施例1と同様の方法により、肥大化能を有する軟骨細胞をMEM分化因子産生培地で培養し、4日から3週間経時的に集めた上清を遠心フィルターに入れ、 $4000 \times g$ 、 4°C にて30分間遠心し、高分子分画と低分子分画を分離する条件下の遠心式限外濾過により、上清を分子量50,000以上の画分と分子量50,000未満の画分に分離させた。次いで、マウスC3H10T1/2細胞（BME培地中）を24穴プレート（ 1.25×10^4 細胞/ cm^2 ）およびヒドロキシアパタイト（ 1×10^6 細胞/ ml ）に播種し、18時間後に、各培地上清の画分（1ml）をそれぞれ添加して 37°C にて5% CO_2 インキュベーター中で培養した。72時間後に実施例1と同様の方法によりアルカリホスファターゼ活性を測定する。

15

20

分子量50,000以上の画分を添加した場合、24穴プレートに播種したときもヒドロキシアパタイトに播種したときも両方とも、マウスC3H10T1/2細胞は赤く染まった（図7Aおよび7Bを参照のこと）。この培養上清の分子量50,000以上の画分には、アルカリホスファターゼ活性を上昇させる活性を有する因子が存在することが分かった。分子量50,000未満の画分を添加した場合、24穴プレートに播種したときもヒドロキシアパタイトに播種したと

25

きもどちらでもC3H10T1/2細胞は染色されず、アルカリホスファターゼ活性は認められなかった（図7Cおよび7Dを参照のこと）。

以上の結果より、マウスC3H10T1/2細胞を誘導骨芽細胞に分化誘導させる能力を有する因子は、肥大化能を有する軟骨細胞をMEM分化因子産生培地
5 中で培養した培養上清の、分子量50,000以上の画分に存在することが分かった。

（実施例9：マウス肋骨・肋軟骨部由来の肥大化能を有する軟骨細胞をMEM
10 分化因子産生培地で培養した場合に産生する細胞機能調節因子の調製および検出）

（マウス肋骨・肋軟骨部からの肥大化能を有する軟骨細胞の調製）

8週齢雄性マウス（Balb/cA）を本実施例において実験した。マウスは、クロロホルムを使用して屠殺した。マウスの胸部をバリカンで剃毛し、ヒビテン液（10倍希釈）に全身を浸し消毒した。胸部を切開し、無菌的に肋骨・肋軟骨部を採取した。この肋骨・肋軟骨部の境界部分より半透明の成長軟骨部を採取した。この成長軟骨部を細切し、0.25%トリプシン-EDTA/D-PBS
15 (Dulbecco's Phosphate Buffered Saline) 中で、37℃で1時間攪拌した。次いで、遠心分離（170×gで3分間）により洗浄し、その後0.2%コラゲナーゼ（Collagenase：インビトロジェン社製）/D-PBSとともに37℃で、
20 2.5時間攪拌した。遠心分離（170×gで3分間）により洗浄した後、攪拌用フラスコ中で0.2%ディスパーゼ（Dispase：インビトロジェン社製）/
（HAM+10% FBS）とともに、37℃にて、1晩攪拌した。翌日、濾過し、遠心分離（170×gで3分間）により洗浄した。細胞をトリパンブルーにより染色し、顕微鏡を用いて細胞数をカウントした。

25 評価は、呈色しなかった細胞を生細胞とし、青色に呈色した細胞を死細胞とした。

(肥大化能を有する軟骨細胞の確認)

実施例 9 によって得られた細胞は、分離の際に使用した酵素（トリプシン、コ
ラゲナーゼ、ディスパーゼ）によって障害を受けているので、培養によって障害
を回復させた。肥大化能を有する軟骨細胞を、軟骨細胞マーカーの局在または発
5 現、および顕微鏡下で形態学的な肥大化を確認することによって同定する。

(肥大化能を有する軟骨細胞特異的マーカーの局在または発現)

上記の操作により得られた細胞の溶解物を SDS（ドデシル硫酸ナトリウム）
で処理する。SDS 処理した溶液を SDS ポリアクリルアミド電気泳動に供する。
10 その後、転写用膜にブロッティング（ウェスタンブロッティング）し、軟骨細胞マ
ーカーに対する一次抗体を反応させて、ペルオキシダーゼ、アルカリホスファター
ゼ、グルコシダーゼなどの酵素またはフルオレセインイソチオシアネート（F
ITC）、フィコエリトリン（PE）、テキサスレッド、7-アミノ-4-メチ
ルクマリリン-3-酢酸（AMCA）、ローダミンなどの蛍光を標識した二次抗体
15 で検出する。

上記の操作により得られた細胞培養物を、10%中性ホルマリン緩衝液で固定
し、軟骨細胞マーカーに対する一次抗体を反応させて、ペルオキシダーゼ、アル
カリホスファターゼ、グルコシダーゼなどの酵素または FITC、PE、テキサ
スレッド、AMCA、ローダミンなどの蛍光を標識した二次抗体で検出する。

20 アルカリホスファターゼについては染色法で検出することもできる。上記の操
作によって得られた細胞培養物を、60%アセトン/クエン酸バッファーで固定
し、蒸留水で洗浄後、ファーストバイオレット B と ナフトール AS-MX とのを
混合液に浸漬し、室温暗所で 30 分反応させることにより、呈色させる。

25 (軟骨細胞の肥大化能に関する組織学的検索)

5×10^5 個の細胞を含む HAM' s F12 培養液を遠心することにより細

胞のペレットを作製し、この細胞ペレットを一定期間培養し、顕微鏡下に確認した培養前の細胞の大きさと培養後の細胞の大きさを比較する。有意な成長が確認されたときに、細胞を肥大化能を有すると判定する。

- 5 実施例 9 によって得られた細胞が、軟骨細胞マーカーの発現しているか否か、形態学的に肥大化しているか否かを検討することにより、これらの細胞が、肥大化能を有する軟骨細胞であるか否かを確認することができる。

(マウス肋骨・肋軟骨部から採取した肥大化能を有する軟骨細胞によって産生された因子の検出)

- 10 実施例 9 により得られた肥大化能を有する軟骨細胞を、MEM分化因子産生培地（最小必須培地（MEM培地）、15% FBS（ウシ胎仔血清）、デキサメサゾン10 nM、 β -グリセロホスフェート10 mM、アスコルビン酸50 μ g/ml、100 U/ml ペニシリン、0.1 mg/ml ストレプトマイシン、および0.25 μ g/ml アンホテリシンBを加えて 4×10^4 細胞/cm²に希
- 15 釈した。この細胞液を、ディッシュ（ベクトン・ディッキンソン社製）に均一に播種し、37℃にて、5% CO₂インキュベーター中で培養し、経時的に（4日目、7日目、11日目、14日目、18日目、21日目に）培地の上清を回収した。

- 20 (回収した培養上清が、未分化細胞を誘導骨芽細胞に分化誘導する活性を有するか否かの検討)

- マウスC3H10T1/2細胞（大日本住友製薬社製、CCL-226）を、
1. 2.5×10^4 細胞/cm²で24穴プレート（ベクトン・ディッキンソン社製、 2.5×10^4 /穴）に均一に播種した。播種から18時間後に、上記の培養上清1 mlを添加して、37℃にて5% CO₂インキュベーター中で培養し
- 25 た。72時間後に、実施例1と同様の方法によりアルカリホスファターゼ活性を

測定した。本実施例では、マウスC3H10T1/2細胞に本因子含む培地を添加した場合、本因子を含まない培地を添加して培養した場合と比較して、C3H10T1/2細胞の細胞全体のアルカリホスファターゼ（ALP）活性の値を、少なくとも約1.5倍より高く上昇させる能力を有するときに、アルカリホスファターゼ活性を上昇させる活性を有すると判断した。

MEM分化因子産生培地のみを添加した場合のアルカリホスファターゼ活性を1とすると、アルカリホスファターゼ活性は、約3.1倍にまで上昇した（表6上段および図8を参照のこと）。

（誘導骨芽細胞の確認）

上に示したように、誘導骨芽細胞分化誘導能を有する因子によって、誘導骨芽細胞マーカーの一つである、C3H10T1/2細胞のアルカリホスファターゼ（ALP）活性が上昇することが示された。さらにC3H10T1/2細胞のアルカリホスファターゼ染色においても、この誘導骨芽細胞分化誘導能を有する因子をC3H10T1/2細胞に添加して72時間培養すると、C3H10T1/2細胞は著しい赤色を示す。このことにより、染色法によってもアルカリホスファターゼが発現していることが示される。この結果、C3H10T1/2細胞が誘導骨芽細胞に分化したことが確認された。

（比較例9A：マウス肋骨・肋軟骨部由来の肥大化能を有する軟骨細胞をMEM増殖培地で培養した場合に産生する因子の調製および検出）

実施例9と同様の方法により、マウス肋骨・肋軟骨部から肥大化能を有する軟骨細胞を採取した。肥大化能を有する軟骨細胞を、MEM増殖培地（最小必須培地（MEM培地）および15% FBS、100U/mlペニシリン、0.1mg/mlストレプトマイシン、および0.25μg/mlアンホテリシンB）を加えて 4×10^4 細胞/cm²に希釈し、培養し、経時的に（4日目、7日目、

1 1日目、14日目、18日目、21日目に) 培地の上清を回収した。

マウスC3H10T1/2細胞(大日本住友製薬社製、CCL-226)を、
1. 2.5×10^4 細胞/cm²で24穴プレート(ベクトン・ディッキンソン社
製、 2.5×10^4 /穴)に均一に播種した。播種から18時間後に、上記の培
5 養上清1mlを添加して、37℃にて5% CO₂インキュベーター中で培養し
た。72時間後に、実施例1と同様の方法によりアルカリホスファターゼ活性を
測定した。MEM増殖培地のみを添加した場合のアルカリホスファターゼ活性を
1とすると、アルカリホスファターゼ活性は約1.6倍であった(表6下段およ
び図8を参照のこと)。

10 MEM増殖培地を用いた細胞培養物の上清を添加した場合、アルカリホスファ
ターゼ活性は、MEM増殖培地のみを添加した場合とほとんど変わらなかった
(図8を参照のこと)。

(誘導骨芽細胞の確認)

15 実施例9と同様の方法を用いて、上記の操作により得られた細胞培養物の上清
は、C3H10T1/2細胞の誘導骨芽細胞マーカーを発現させなかったことを
確認した。

(比較例9B: マウス肋軟骨由来の静止軟骨細胞をMEM分化因子産生培地で
20 培養した場合に産生する因子の調製および検出)

(肋軟骨からの静止軟骨細胞の調製)

8週齢雄性マウス(Balb/cA)をクロロホルムを使用して屠殺した。マ
ウスの胸部をバリカンで剃毛し、ヒビテン液(10倍希釈)に全身を浸し消毒し
た。胸部を切開し、無菌的に肋軟骨部を採取した。この肋軟骨部分より不透明の
25 静止軟骨部を採取した。この静止軟骨部を細切し、0.25%トリプシン-ED
TA/D-PBS (Dulbecco's Phosphate Buffered Saline) 中で、37℃で1

時間攪拌した。次いで、遠心分離（ $170 \times g$ で3分間）により洗浄し、その後
0.2%コラゲナーゼ（Collagenase：インビトロジェン社製）／D-PBSと
ともに 37°C で、2.5時間攪拌した。遠心分離（ $170 \times g$ で3分間）により
洗浄した後、攪拌用フラスコ中で0.2%ディスパーゼ（Dispase：インビトロ
5 ジェン社製）／（HAM+10% FBS）とともに、 37°C にて、1晩攪拌し
た。0.2%ディスパーゼでの一晩処理を除く場合もある。翌日、濾過し、遠心
分離（ $170 \times g$ で3分間）により洗浄した。細胞をトリパンブルーにより染色
し、顕微鏡を用いて細胞数をカウントした。

評価は、呈色しなかった細胞を生細胞とし、青色に呈色した細胞を死細胞とし
10 た。

（肋軟骨由来の肥大化能を有さない軟骨細胞の確認）

実施例9と同様の方法を使用して軟骨細胞マーカーの局在または発現を検出す
ることができる。また、細胞を形態学的に検索して、得られた細胞が肥大化能を
15 有する軟骨細胞であるか否かを確認することができる。

（肋軟骨から採取した静止軟骨細胞をMEM分化因子産生培地で培養した場合
に産生する因子の検出）

肋軟骨から採取した静止軟骨細胞を、MEM分化因子産生培地（最小必須培地
20 （MEM培地）、15% FBS（ウシ胎仔血清）、デキサメサゾン 10 nM 、
 β -グリセロホスフェート 10 mM 、アスコルビン酸 $50 \mu\text{g}/\text{ml}$ 、 $100 \text{ U}/\text{ml}$ ペニシリン、 $0.1 \text{ mg}/\text{ml}$ ストレプトマイシン、および $0.25 \mu\text{g}/\text{ml}$ アンホテリシンB）を加えて 4×10^4 細胞/ cm^2 に希釈し、培養し、
経時的に（4日目、7日目、11日目、14日目、18日目、21日目に）各培
25 地の上清を回収した。

マウスC3H10T1/2細胞（大日本住友製薬社製、CCL-226）を2

4穴プレートに播種し、18時間後に上記の培養上清1mlを添加して、37℃にて5% CO₂インキュベーター中で培養した。72時間後に、実施例1と同様の方法によりアルカリホスファターゼ活性を測定した。MEM分化因子産生培地のみを添加した場合を1とすると、アルカリホスファターゼ活性は約0.8倍であった（表6上段および図8を参照のこと）。

MED分化因子産生培地を用いた細胞培養物の上清を添加した場合、アルカリホスファターゼ活性は、MEM分化因子産生培地のみを添加した場合とほとんど変わらなかった（表6上段および図8を参照のこと）。上記の操作により得られた細胞培養物の上清が、C3H10T1/2細胞の誘導骨芽細胞マーカーを発現させるか否かを実施例1と同様の方法および判定基準で確認することができる。

（比較例9C：マウス肋軟骨から採取した静止軟骨細胞をMEM増殖培地で培養した場合に産生する因子の調製および検出）

比較例9Bと同様の方法により、肋軟骨から静止軟骨細胞を採取した。静止軟骨細胞を、MEM増殖培地（最小必須培地（MEM培地）、15% FBS、100U/mlペニシリン、0.1mg/mlストレプトマイシン、および0.25μg/mlアンホテリシンB）を加えて4×10⁴細胞/cm²に希釈し、培養し、経時的に（4日目、7日目、11日目、14日目、18日目、21日目に）培地の上清を回収した。

マウスC3H10T1/2細胞（大日本住友製薬社製、CCL-226）を24穴プレートに播種し、18時間後に上記の培地1mlを添加して、37℃にて5% CO₂インキュベーター中で培養した。72時間後に、実施例1と同様の方法によりアルカリホスファターゼ活性を測定した。MEM増殖培地のみを添加した場合を1とすると、アルカリホスファターゼ活性が約1.0倍であった（表6下段および図8を参照のこと）。

肋軟骨由来の静止軟骨細胞をMEM増殖培地で培養した培養上清を添加した場

合、アルカリホスファターゼ活性は、MEM増殖培地のみ添加した場合とほとんど変わらなかった（表6下段および図8を参照のこと）。上記の操作により得られた細胞培養物の上清は、C3H10T1/2細胞の誘導骨芽細胞マーカーを発現させないことを確認した。

5

（表6：マウス由来の軟骨細胞を、MEM分化因子産生培地およびMEM増殖培地で培養した上清を添加した実施例9および比較例9A～9Cのアルカリホスファターゼ活性の比較）

MEM分化因子産生培地(平均値)		
	相対値	絶対値
GC上清	3.1	0.038
RC上清	0.8	0.011
分化培地のみ	1	0.012

10

MEM増殖培地(平均値)		
	相対値	絶対値
GC上清	1.6	0.021
RC上清	1.0	0.013
増殖培地のみ	1	0.014

8週齢：1回実験した。2試行した。

GC上清：肥大化能を有する軟骨細胞をそれぞれの培地で培養した培養上清

15 RC上清：静止軟骨細胞をそれぞれの培地で培養した培養上清

分化培地のみ：MEM分化因子産生培地そのもの

増殖培地のみ：MEM増殖培地そのもの

（実施例9および比較例9A～9Cのまとめ）

20

マウス肋骨・肋軟骨部から採取した肥大化能を有する軟骨細胞を、MEM分化因子産生培地を用いて培養した場合、この培養上清には、マウスC3H10T1/2細胞のアルカリホスファターゼ活性を上昇させ、誘導骨芽細胞に分化誘導する因子が存在することが確認された。一方、MEM増殖培地を用いて肥大化能を有する軟骨細胞を培養した場合、この培養上清にはこの因子が存在しないことが確認された。肥大化能を有する軟骨細胞は、MEM分化因子産生培地で培養すると、未分化細胞を誘導骨芽細胞に分化誘導させる因子を産生することが見出され

25

た。

マウス肋軟骨部由来の静止軟骨細胞は、MEM分化因子産生培地で培養しても、MEM増殖培地で培養しても、未分化細胞を誘導骨芽細胞に分化誘導させる能力を有する因子を産生しないことが確認された。

5

(実施例10：ウサギ肋骨・肋軟骨部由来の肥大化能を有する軟骨細胞をMEM分化因子産生培地で培養した場合に産生する細胞機能調節因子の調製および検出)

(ウサギ肋骨・肋軟骨部からの肥大化能を有する軟骨細胞の調製)

10

8週齢雄性ウサギ（日本白色種）を本実施例において実験した。ウサギは、クロロホルムを使用して屠殺した。ウサギの胸部をバリカンで剃毛し、ヒビテン液（10倍希釈）に全身を浸し消毒した。胸部を切開し、無菌的に肋骨・肋軟骨部を採取した。この肋骨・肋軟骨部の境界部分より半透明の成長軟骨部を採取した。この成長軟骨部を細切し、0.25%トリプシン-EDTA/D-PBS（Du

15 l b e c c o ' s P h o s p h a t e B u f f e r e d S a l i n e）中で、37℃で1時間攪拌した。次いで、遠心分離（170×gで3分間）により洗浄し、その後0.2%コラゲナーゼ（C o l l a g e n a s e：インビトロジェン社製）/D-PBSとともに37℃で、2.5時間攪拌した。遠心分離（170×gで3分間）により洗浄した後、攪拌用フラスコ中で0.2%ディスパー

20 ゼ（D i s p a s e：インビトロジェン社製）/（HAM+10% FBS）とともに、37℃にて、1晩攪拌した。翌日、濾過し、遠心分離（170×gで3分間）により洗浄した。細胞をトリパンブルーにより染色し、顕微鏡を用いて細胞数をカウントした。

20

評価は、呈色しなかった細胞を生細胞とし、青色に呈色した細胞を死細胞とした。

25

(肥大化能を有する軟骨細胞の確認)

実施例 10 によって得られた細胞は、分離の際に使用した酵素（トリプシン、コラゲナーゼ、ディスパーゼ）によって障害を受けているので、培養によって障害を回復させた。肥大化能を有する軟骨細胞を、軟骨細胞マーカーの局在または
5 発現、および顕微鏡下で形態学的な肥大化を確認することによって同定する。

(肥大化能を有する軟骨細胞特異的マーカーの局在または発現)

上記の操作により得られた細胞の溶解物を SDS（ドデシル硫酸ナトリウム）で処理する。SDS 処理した溶液を SDS ポリアクリルアミド電気泳動に供する。
10 その後、転写用膜にブロッティング（ウェスタンブロッティング）し、軟骨細胞マーカーに対する一次抗体を反応させて、ペルオキシダーゼ、アルカリホスファターゼ、グルコシダーゼなどの酵素またはフルオレセインイソチオシアネート（FITC）、フィコエリトリン（PE）、テキサスレッド、7-アミノ-4-メチルクマリリン-3-酢酸（AMCA）、ローダミンなどの蛍光を標識した二次抗体
15 で検出する。

上記の操作により得られた細胞培養物を、10%中性ホルマリン緩衝液で固定し、軟骨細胞マーカーに対する一次抗体を反応させて、ペルオキシダーゼ、アルカリホスファターゼ、グルコシダーゼなどの酵素または FITC、PE、テキサスレッド、AMCA、ローダミンなどの蛍光を標識した二次抗体で検出する。

20 アルカリホスファターゼについては染色法で検出することもできる。上記の操作によって得られた細胞培養物を、60%アセトン/クエン酸バッファーで固定し、蒸留水で洗浄後、ファーストバイオレット B と ナフトール AS-MX とのを混合液に浸漬し、室温暗所で 30 分反応させることにより、呈色させる。

25 (軟骨細胞の肥大化能に関する組織学的検索)

5 × 10⁵ 個の細胞を含む HAM' s F12 培養液を遠心することにより細

胞のペレットを作製し、この細胞ペレットを一定期間培養し、顕微鏡下に確認した培養前の細胞の大きさと培養後の細胞の大きさを比較する。有意な成長が確認されたときに、細胞を肥大化能を有すると判定する。

5 (結果)

実施例 10 によって得られた細胞が、軟骨細胞マーカーを発現しているか否か、形態学的には肥大化しているか否かを確認することにより、これらの細胞が、肥大化能を有する軟骨細胞であるか否かを確認することができる。

10 (ウサギ肋骨・肋軟骨部から採取した肥大化能を有する軟骨細胞によって產生された因子の検出)

実施例 10 により得られた肥大化能を有する軟骨細胞を、MEM分化因子產生培地（最小必須培地（MEM培地）、15% FBS（ウシ胎仔血清）、デキサメサゾン10 nM、 β -グリセロホスフェート10 mM、アスコルビン酸50 μ g/ml、100 U/ml ペニシリン、0.1 mg/ml ストレプトマイシン、
15 および0.25 μ g/ml アンホテリシンBを加えて 4×10^4 細胞/cm²に希釈した。この細胞液を、ディッシュ（ベクトン・ディッキンソン社製）に均一に播種し、37℃にて、5% CO₂インキュベーター中で培養し、経時的に（4日目、7日目、11日目、14日目、18日目、21日目に）培地の上清を
20 回収した。

（回収した培養上清が、未分化細胞を誘導骨芽細胞を分化誘導する活性を有するか否かの検討）

マウスC3H10T1/2細胞（大日本住友製薬社製、CCL-226）を、
25 1. 2.5×10^4 細胞/cm²で24穴プレート（ベクトン・ディッキンソン社製、2.5 $\times 10^4$ /穴）に均一に播種した。播種から18時間後に、上記の培

養上清 1 ml を添加して、37℃にて5% CO₂インキュベーター中で培養した。72時間後に、実施例1と同様の方法によりアルカリホスファターゼ活性を測定した。本実施例では、マウスC3H10T1/2細胞に本因子含む培地を添加した場合、本因子を含まない培地を添加して培養した場合と比較して、C3H10T1/2細胞の細胞全体のアルカリホスファターゼ（ALP）活性の値を、
5 少なくとも約1.5倍より高く上昇させる能力を有するときに、アルカリホスファターゼ活性を上昇させる活性を有すると判断した。

MEM分化因子産生培地のみを添加した場合を1とすると、培養上清を添加すると、アルカリホスファターゼ活性が上昇する。

10

（誘導骨芽細胞の確認）

上に示したように、誘導骨芽細胞分化誘導能を有する因子によって、誘導骨芽細胞マーカーの一つである、C3H10T1/2細胞のアルカリホスファターゼ（ALP）活性が上昇することが示された。さらにC3H10T1/2細胞のアルカリホスファターゼ染色においても、この誘導骨芽細胞分化誘導能を有する因子をC3H10T1/2細胞に添加して72時間培養すると、C3H10T1/2細胞は著しい赤色を示す。このことにより、染色法によってもアルカリホスファターゼが発現していることが示される。この結果、C3H10T1/2細胞が誘導骨芽細胞に分化したことが確認された。

15

20

（比較例10A：ウサギ肋骨・肋軟骨部由来の肥大化能を有する軟骨細胞をMEM増殖培地で培養した場合に産生する因子の調製および検出）

実施例10と同様の方法により、ウサギ肋骨・肋軟骨部から肥大化能を有する軟骨細胞を採取した。肥大化能を有する軟骨細胞を、MEM増殖培地（最小必須培地（MEM培地）および15% FBS、100U/ml ペニシリン、0.1 mg/ml ストレプトマイシン、および0.25 μg/ml アンホテリシンB）。

25

を加えて 4×10^4 細胞 / cm^2 に希釈し、培養し、経時的に（4日目、7日目、11日目、14日目、18日目、21日目に）培地の上清を回収した。

マウス C3H10T1/2 細胞（大日本住友製薬社製、CCL-226）を、
1. 2.5×10^4 細胞 / cm^2 で 24 穴プレート（ベクトン・ディッキンソン社
5 製、 2.5×10^4 / 穴）に均一に播種した。播種から 18 時間後に、上記の培養上清 1 ml を添加して、 37°C にて 5% CO_2 インキュベーター中で培養した。72 時間後に、実施例 1 と同様の方法によりアルカリホスファターゼ活性を測定した。

MEM 増殖培地を用いた細胞培養物の上清を添加した場合、アルカリホスファ
10 ターゼ活性は、MEM 増殖培地のみを添加した場合とほとんど変わらなかった。

（誘導骨芽細胞の確認）

実施例 10 と同様の方法および判定基準を用いて、上記の操作により得られた
細胞培養物の上清が、C3H10T1/2 細胞の誘導骨芽細胞マーカーを発現さ
15 せるか否かを確認することができる。

（比較例 10B：ウサギ肋軟骨由来の静止軟骨細胞を MEM 分化因子産生培地で培養した場合に産生する因子の調製および検出）

（肋軟骨からの静止軟骨細胞の調製）

20 8 週齢雄性ウサギ（日本白色種）をクロロホルムを使用して屠殺した。ウサギの胸部をバリカンで剃毛し、ヒビテン液（10 倍希釈）に全身を浸し消毒した。胸部を切開し、無菌的に肋軟骨部を採取した。この肋軟骨部分より不透明の静止軟骨部を採取した。この静止軟骨部を細切し、0.25% トリプシン-EDTA / D-PBS (Dulbecco's Phosphate Buffered Saline) 中で、 37°C で 1 時間
25 攪拌した。次いで、遠心分離（ $170 \times g$ で 3 分間）により洗浄し、その後 0.2% コラゲナーゼ (Collagenase：インビトロジェン社製) / D-PBS ととも

に 37℃で、2.5 時間攪拌した。遠心分離（170×g で 3 分間）により洗浄した後、攪拌用フラスコ中で 0.2% ディスパーゼ（Dispase：インビトロジェン社製）／（HAM+10% FBS）とともに、37℃にて、1 晩攪拌した。0.2% ディスパーゼでの一晩処理を除く場合もある。翌日、濾過し、遠心分離（170×g で 3 分間）により洗浄した。細胞をトリパンブルーにより染色し、顕微鏡を用いて細胞数をカウントした。

評価は、呈色しなかった細胞を生細胞とし、青色に呈色した細胞を死細胞とした。

10 （肋軟骨由来の肥大化能を有さない軟骨細胞の確認）

実施例 10 と同様の方法および判定基準を使用して軟骨細胞マーカーの局在または発現を検出し、形態学的にも検索して、得られた細胞が肥大化能を有さない軟骨細胞であるか否かを確認することができる。

15 （肋軟骨から採取した静止軟骨細胞を MEM 分化因子産生培地で培養した場合に産生する因子の検出）

肋軟骨から採取した静止軟骨細胞を、MEM 分化因子産生培地（最小必須培地（MEM 培地）、15% FBS（ウシ胎仔血清）、デキサメサゾン 10 nM、 β -グリセロホスフェート 10 mM、アスコルビン酸 50 μ g/ml、100 U/ml ペニシリン、0.1 mg/ml ストレプトマイシン、および 0.25 μ g/ml アンホテリシン B）を加えて 4×10^4 細胞/cm² に希釈し、培養し、経時的に（4 日目、7 日目、11 日目、14 日目、18 日目、21 日目に）各培地の上清を回収した。

マウス C3H10T1/2 細胞（大日本住友製薬社製、CCL-226）を 24 穴プレートに播種し、18 時間後に上記の培養上清 1 ml を添加して、37℃にて 5% CO₂ インキュベーター中で培養した。72 時間後に、実施例 1 と同

様の方法によりアルカリホスファターゼ活性を測定した。

MEM分化因子産生培地を用いた細胞培養物の上清を添加した場合、アルカリホスファターゼ活性は、MEM分化因子産生培地のみを添加した場合とほとんど変わらなかった。上記の操作により得られた細胞培養物の上清が、C3H10T1/2細胞の誘導骨芽細胞マーカーを発現させるか否かを実施例1と同様の方法および判定基準で確認することができる。

(比較例10C：肋軟骨から採取した静止軟骨細胞をMEM増殖培地で培養した場合に産生する因子の調製および検出)

比較例10Bと同様の方法により、肋軟骨から静止軟骨細胞を採取した。静止軟骨細胞を、MEM増殖培地（最小必須培地（MEM培地）、15% FBS、100U/mlペニシリン、0.1mg/mlストレプトマイシン、および0.25μg/mlアンホテリシンB）を加えて 4×10^4 細胞/cm²に希釈し、培養し、経時的に（4日目、7日目、11日目、14日目、18日目、21日目に）培地の上清を回収した。

マウスC3H10T1/2細胞（大日本住友製薬社製、CCL-226）を24穴プレートに播種し、18時間後に上記の培地1mlを添加して、37℃にて5% CO₂インキュベーター中で培養した。72時間後に、実施例1と同様の方法によりアルカリホスファターゼ活性を測定した。

肋軟骨由来の静止軟骨細胞をMEM増殖培地で培養した培養上清を添加した場合、アルカリホスファターゼ活性は、MEM増殖培地のみ添加した場合とほとんど変わらなかった。上記の操作により得られた細胞培養物の上清が、C3H10T1/2細胞の誘導骨芽細胞マーカーを発現させるか否かを実施例1と同様の方法および判定基準で確認することができる。

(実施例 10 および比較例 10A～10C のまとめ)

MEM 分化因子産生培地を用いて、ウサギ肋骨・肋軟骨部から採取した肥大化能を有する軟骨細胞を培養した場合、この培養上清には、マウス C3H10T1 / 2 細胞のアルカリホスファターゼ活性を上昇させ、誘導骨芽細胞に分化誘導する因子が存在することが確認された。一方、MEM 増殖培地を用いて肥大化能を有する軟骨細胞を培養した場合、この培養上清にはこの因子が存在しないことが確認された。肥大化能を有する軟骨細胞は、MEM 分化因子産生培地で培養すると、未分化細胞を誘導骨芽細胞に分化誘導させる因子を産生することが見出された。

ウサギ肋軟骨部由来の肥大化能を有さない軟骨細胞は、MEM 分化因子産生培地で培養しても、MEM 増殖培地で培養しても、未分化細胞を誘導骨芽細胞に分化誘導させる能力を有する因子を産生しないことが確認された。

(実施例 11：未分化細胞を培養する培地（未分化細胞培養培地）が、未分化細胞の誘導骨芽細胞への分化誘導に与える影響の検討)

実施例 1、比較例 1B および 1D と同様の方法をそれぞれ使用して、肥大化能を有する軟骨細胞、もしくは肥大化能を有さない静止軟骨細胞および関節軟骨細胞を採取した。これらの細胞を、MEM 分化因子産生培地および MEM 増殖培地にそれぞれ 4×10^4 細胞 / cm^2 で播種し、 37°C にて 5% CO_2 インキュベーター中で培養し、経時的に（4 日目、7 日目、11 日目、14 日目、18 日目、21 日目に）各培養上清を得た。未分化細胞として、マウス C3H10T1 / 2 細胞を用いた。HAM 培地または MEM 培地の入った 24 穴プレートに、これらの細胞を 1.25×10^4 細胞 / cm^2 で播種し、18 時間後に上記の培養上清 1 ml をそれぞれ添加して、 37°C にて 5% CO_2 インキュベーター中で培養した。72 時間後に、実施例 1 と同様の方法によりアルカリホスファターゼ活性を測定した。

C 3 H 1 0 T 1 / 2 細胞をMEM培地で培養した場合、MEM分化因子産生培地を用いて肥大化能を有する軟骨細胞を培養した培養上清を添加したもののアルカリホスファターゼ活性は、MEM分化因子産生培地のみを添加したものと比較して約 1 0 . 8 倍高いアルカリホスファターゼ活性の上昇が認められた。MEM増殖培地を用いて肥大化能を有する軟骨細胞を培養した培養上清を添加した場合、アルカリホスファターゼ活性の上昇は認められなかった。肥大化能を有さない静止軟骨細胞および関節軟骨由来の軟骨細胞を用いた場合は、MEM分化因子産生培地を用いて培養した培養上清を添加してもMEM増殖培地を用いて培養した培養上清を添加しても、いずれもアルカリホスファターゼ活性の上昇は認められなかった。C 3 H 1 0 T 1 / 2 細胞の培養に用いる基礎培地は、C 3 H 1 0 T 1 / 2 細胞の誘導骨芽細胞への分化誘導に影響を与えないことが分かった（表 7 および図 9 を参照のこと）。

(表 7: 未分化細胞の培養に用いる基礎培地が、未分化細胞の骨芽細胞への分化誘導に与える影響)

HAM培地(平均)		
	相対値	絶対値
GC分化上清	6.7	0.058
GC増殖上清	1.1	0.010
RC分化上清	1.2	0.011
RC増殖上清	1.1	0.010
AC分化上清	1.2	0.010
AC増殖上清	1.2	0.011
分化培地のみ	1	0.009
増殖培地のみ	1	0.009

MEM培地(平均)		
	相対値	絶対値
GC分化上清	10.8	0.085
GC増殖上清	1.3	0.015
RC分化上清	1.5	0.012
RC増殖上清	0.7	0.008
AC分化上清	1.3	0.010
AC増殖上清	0.6	0.007
分化培地のみ	1	0.008
増殖培地のみ	1	0.011

G C (4 週 齢) : 1 回 実 験 し た 。 3 試 行 し た 。

R C (8 週 齢) : 1 回 実 験 し た 。 3 試 行 し た 。

A C（8週齢）：1回実験した。3試行した。

G C分化上清：肥大化能を有する軟骨細胞をMEM分化因子産生培地で培養した

培養上清
G C増殖上清：肥大化能を有する軟骨細胞をMEM増殖培地で培養した
培養上清

5 R C分化上清：静止軟骨細胞をMEM分化因子産生培地で培養した培養上清

R C増殖上清：静止軟骨細胞をMEM増殖培地で培養した培養上清

A C分化上清：関節軟骨細胞をMEM分化因子産生培地で培養した培養上清

A C増殖上清：関節軟骨細胞をMEM増殖培地で培養した培養上清

分化培地のみ：MEM分化因子産生培地そのもの

10 増殖培地のみ：MEM増殖培地そのもの

C 3 H 1 0 T 1 / 2細胞をHAM培地で培養した場合、MEM分化因子産生培地を用いて肥大化能を有する軟骨細胞を培養した培養上清を添加したもののアルカリホスファターゼ活性は、MEM分化因子産生培地のみを添加したものと比較して約6.7倍高いアルカリホスファターゼ活性の上昇が認められた。MEM増殖培地を用いて肥大化能を有する軟骨細胞を培養した培養上清を添加した場合、アルカリホスファターゼ活性の上昇は認められなかった。肥大化能を有さない静止軟骨細胞および関節軟骨由来の軟骨細胞を用いた場合は、MEM分化因子産生培地を用いて培養した培養上清を添加してもMEM増殖培地を用いて培養した培養上清を添加しても、いずれもアルカリホスファターゼ活性の上昇は認められなかった（表7および図9を参照のこと）。

（実施例12：肥大化能を有する軟骨細胞によって産生された、未分化細胞を誘導骨芽細胞に分化誘導させる因子の熱による変性）

実施例1と同様の方法を使用して、肥大化能を有する軟骨細胞を採取した。MEM分化因子産生培地（最小必須培地（MEM培地）、15% FBS（ウシ胎仔血清）、デキサメサゾン10 nM、 β -グリセロホスフェート10 mM、アス

コルビン酸 $50 \mu\text{g}/\text{ml}$ 、 $100 \text{U}/\text{ml}$ ペニシリン、 $0.1 \text{mg}/\text{ml}$ ストレプトマイシン、および $0.25 \mu\text{g}/\text{ml}$ アンホテリシン B を加えて 4×10^4 細胞 $/\text{cm}^2$ に希釈し、培養し、経時的に（4日目、7日目、11日目、14日目、18日目、21日目に）培地の上清を回収した。この培養上清を、沸騰水中で3分間、加熱処理した。

マウス C3H10T1/2 細胞 (1.25×10^4 細胞 $/\text{cm}^2$) を BME 培地で培養し、18時間後に、加熱処理をしていない培養上清、加熱処理した培養上清、MEM 分化因子産生培地のみをそれぞれ 1ml を添加した。72時間後に、実施例 1 と同様の方法を使用してアルカリホスファターゼ活性を測定した。

MEM 分化因子産生培地のみを添加して培養したときのアルカリホスファターゼ活性を 1 とすると、加熱処理をしていない肥大化能を有する軟骨細胞を MEM 分化因子産生培地で培養した培養上清を添加した場合、アルカリホスファターゼ活性は、約 12.8 倍であったが、該培養上清を加熱処理した場合には、アルカリホスファターゼ活性は、約 1.6 倍に減少した（表 8 および図 10 を参照のこと）。この結果より、肥大化能を有する軟骨細胞を MEM 分化因子産生培地で培養した培養上清に存在する、未分化細胞を誘導骨芽細胞に分化誘導させる能力を有する因子は、加熱処理により熱変性する（失活する）ことが確認された。

（表 8：未分化細胞を骨芽細胞に分化誘導させる因子の熱による変性）

	ALP 活性 (平均)	
	相対値	絶対値
熱処理	1.6	0.014
非処理	12.8	0.111
分化培地のみ	1	0.009

4 週齢：1 回実験した。3 試行した。

熱処理：肥大化能を有する軟骨細胞を MEM 分化因子産生培地で培養した培養上清を加熱処理したもの

非処理：肥大化能を有する軟骨細胞を MEM 分化因子産生培地で培養した培養上

清

分化培地のみ：MEM分化因子産生培地そのもの

（実施例 13：誘導骨芽細胞分化誘導能を有する因子を産生する能力を有する、
5 肥大化能を有する軟骨細胞と生体適合性足場とを用いる複合材料を皮下に移植した
場合の効果）

実施例 1 と同様の方法により、肋骨・肋軟骨由来の肥大化能を有する軟骨細胞
を調製した。調製した肥大化能を有する軟骨細胞に、MEM分化因子産生培地を
加えて 1×10^6 細胞/ml に希釈した。この細胞液を、コラーゲングル、アル
10 ギン酸およびマトリゲル™（ベクトン・ディッキンソン社製）のそれぞれに均
一に播種し、37℃にて、5% CO₂ インキュベーター中で1週間培養し、複
合材料を作製した。培養は、MEM分化因子産生培地を用いた。

これらの複合材料を同系動物の背部皮下に移植した。移植の4週間後、これら
の同系動物を屠殺して移植部位を摘出し、10%中性緩衝ホルマリンで固定し、
15 レントゲン撮影およびマイクロCT撮影を行い、パラフィン包埋した。常法に従
って薄切標本作製し、ヘマトキシリン-エオジン（HE）染色、トルイジン青
（TB）染色、アルシアン青（AB）染色、サフラニンO（SO）染色し、移植
部位の状態を確認した。

各実験は以下のように行った。

20 レントゲン撮影：マイクロCT撮影機器（東陽テクニカ社、高分解能X線マイ
クロCTスキャナSKYSCAN1172）を用い、100KVで垂直方向より
レントゲンを撮影した。

マイクロCT撮影：同マイクロCT機器を用い、100KVで0.4度ずつ回
転させて各レントゲンを撮影し、添付ソフトNReconにより再構成し、三次
25 元ボリュームレンダリングソフトVGStudio Maxにより三次元画像を
得た。

HE染色：薄切、脱パラした切片を、ヘマトキシリン液に5－10分浸漬、水洗、色出し後、エオジン液で3－5分浸漬。

TB染色：薄切、脱パラした切片を0.05%トルイジン青液に15－30分浸漬。

5 AB染色：薄切、脱パラした切片を3%酢酸液に3－5分浸漬し、次いでアルシアン青液に20－30分浸漬、水洗後、ケルンエヒトロート（ヌクレアファーストレッド）液に10－15分浸漬。

10 SO染色：薄切、脱パラした切片を鉄ヘマチキシリン液に5－15分浸漬、水洗、分別（塩酸アルコール）、色出し、1%酢酸液、ファーストグリーン液1－5分、1%酢酸液、サフラニンO液3－5分浸漬。

MEM分化産生培地で培養することにより誘導骨芽細胞分化誘導能因子を産生する能力を有するようになった、肥大化能を有する軟骨細胞を含む複合材料の全てにおいて骨形成が観察された（図13～24）。

15 コントロールとして、移植に用いた複合材料の一部を10%中性緩衝ホルマリ
ンで固定し、パラフィン包埋した。薄切切片を作製し、染色した。

本実施例と同様の方法を使用して、実施例2～3（ラット）、4～5（ヒト）、7（ラット）、9（マウス）、10（ウサギ）により調製された肥大化能を有する軟骨細胞を用いて複合材料を製造し、同系動物もしくは免疫不全動物の皮下に移植した場合を効果を検討することができる。さらに、生体適合性を有する足場
20 として、例えば、ヒドロキシアパタイト、P u r a M a t r i xTM（ベクトン・ディッキンソン社製、カタログ番号354250、BD P u r a M a t r i x ペプチドハイドロゲル）、コラーゲン（スポンジ）、ゼラチン（スポンジ）、アガロースを用いて複合材料を製造し、同系動物もしくは免疫不全動物の皮下に移植した場合の効果を検討することができる。

(比較例 1 3 A：肥大化能を有さない軟骨細胞と生体適合性足場とを用いる複合材料を皮下に移植した場合の効果)

比較例 1 B (ラット) と同様の方法により調製された肥大化能を有さない軟骨細胞を用いた。この肥大化能を有さない軟骨細胞を、MEM分化因子産生培地またはMEM増殖培地のいずれかに希釈し、実施例 1 3 と同様の方法により複合材料を作製した。生体適合性を有する足場として、コラーゲンゲル、マトリゲル^T
5 M (ベクトン・ディッキンソン社製) およびアルギン酸を用いた。これらの複合材料を同系動物の背部皮下に移植した。移植の 4 週間後、これらの同系動物を屠殺して移植部位を摘出し、10%中性緩衝ホルマリンで固定し、レントゲン撮影
10 とマイクロCT撮影を行い、パラフィン包埋した。薄切標本を作製し、ヘマトキシリン-エオジン (HE) 染色、トルイジン青 (TB) 染色、アルシアン青 (AB) 染色、サフラニン O (SO) 染色し、移植部位の状態を確認した。肥大化能を有さない軟骨細胞を用いた場合、いずれの生体適合性を有する足場を用いる複合材料においても骨形成は観察されなかった。MEM分化因子産生培地を用いた
15 結果を図 2 5 ~ 3 3 に示す。

本比較例と同様の方法を使用して、比較例 1 D (ラット)、3 B (ラット)、4 B (ヒト)、5 B (ヒト)、9 B (マウス) および 1 0 B (ウサギ) により調製された肥大化能を有さない軟骨細胞を用いて複合材料を製造し、同系動物もしくは免疫不全動物の皮下に移植した場合の効果を検討することもできる。さらに、
20 生体適合性を有する足場として、例えば、ヒドロキシアパタイト、P u r a M a t r i x TM (ベクトン・ディッキンソン社製、カタログ番号 3 5 4 2 5 0、B D P u r a M a t r i x ペプチドハイドロゲル)、コラーゲン (スポンジ)、ゼラチン (スポンジ)、アガロースを用いて複合材料を製造し、皮下に移植した場合の効果を検討することもできる。

(比較例 1 3 B : 足場を単独で皮下に移植した場合の効果)

足場を単独で移植すること以外、実施例 1 3 と同様の方法を用いた。足場であるヒドロキシアパタイト、コラーゲングル、アルギン酸、またはマトリゲル™ (ベクトン・ディッキンソン社製) のそれぞれを単独で同系動物の背部皮下に移植した。その結果、骨形成は観察されなかった (図 3 4)。

本比較例と同様の方法を使用して、例えば、P u r a M a t r i x™ (ベクトン・ディッキンソン社製、カタログ番号 3 5 4 2 5 0、BD P u r a M a t r i x ペプチドハイドロゲル)、コラーゲン (スポンジ)、ゼラチン (スポンジ) を単独で同系動物もしくは免疫不全動物の皮下に移植し、各足場についての効果を検討する。

(実施例 1 4 : 誘導骨芽細胞分化誘導能を有する因子を産生する能力を有する、肥大化能を有する軟骨細胞のペレットを皮下に移植した場合の効果)

(誘導骨芽細胞分化誘導能を有する因子を産生する能力を有する、肥大化能を有する軟骨細胞ペレットの調製)

実施例 1 と同様の方法により、肋骨・肋軟骨由来の肥大化能を有する軟骨細胞を調製した。この細胞 (5×10^5 個) に、MEM 分化因子産生培地を加えて 5×10^5 個 / 0.5 ml に希釈した。この細胞液を、遠心分離 (1000 rpm ($170 \times g$) $\times 5$ 分間) することにより、誘導骨芽細胞分化誘導能を有する因子を産生する能力を有する、肥大化能を有する軟骨細胞ペレットを調製し、 37°C にて 1 週間培養した (図 3 5 A)。

このペレットを 37°C にて 1 週間培養した後、同系動物の背部皮下に移植した。培養は、MEM 分化因子産生培地を用いた。移植の 4 週間後、これらの同系動物を屠殺して移植部位を摘出し、10% 中性緩衝ホルマリンで固定し、レントゲン撮影とマイクロ CT 撮影を行い、パラフィン包埋した。常法に従って薄切標本作製した。実施例 1 3 と同様の方法を用いて、ヘマトキシリン-エオジン (H

E) 染色、トルイジン青 (TB) 染色、アルシアン青 (AB) 染色、サフラニン O (SO) 染色し、移植部位の状態を確認した。その結果、誘導骨芽細胞分化誘導能を有する因子を産生する能力を有する、肥大化能を有する軟骨細胞ペレットを移植した場合、移植部位において骨形成が観察された (図 3 5 C ~ D、図 3 6 および 3 7)。

本実施例と同様の方法を使用して、実施例 2 ~ 3 (ラット)、4 ~ 5 (ヒト)、7 (ラット)、9 (マウス)、10 (ウサギ) により調製された肥大化能を有する軟骨細胞を用いて細胞ペレットを調製し、同系動物もしくは免疫不全動物の皮下に移植した場合の効果を検討することができる。

(比較例 1 4 A : 肥大化能を有さない軟骨細胞のペレットを皮下に移植した場合の効果)

比較例 1 B (ラット) と同様の方法により調製された肥大化能を有さない軟骨細胞を用いた。この細胞 (5×10^5 個) に、MEM 分化因子産生培地を加えて 5×10^5 個 / 0.5 ml に希釈した。遠心分離 (1000 rpm (170 × g) × 5 分間) することにより、肥大化能を有さない軟骨細胞ペレットを作製し、37℃にて1週間培養した (図 3 5 B)。次いで、このペレットを同系ラットの背部皮下に移植した。実施例 1 4 と同様の方法を用いて、移植部位における、肥大化能を有さない軟骨細胞と生態適合性足場とを用いる複合材料を移植した場合の影響を観察した。その結果、移植部位に骨形成は認められなかった (図 3 5 E ~ F および図 3 8)。

本比較例と同様の方法を使用して、比較例 1 D (ラット)、3 B (ラット)、4 B (ヒト)、5 B (ヒト)、9 B (マウス) および 10 B (ウサギ) により調製された肥大化能を有さない軟骨細胞を用いて細胞ペレットを調製する。次いで、同系動物もしくは免疫不全動物の皮下に移植する。移植後、実施例 1 4 と同様の方法を用いて、移植部位における、肥大化能を有さない軟骨細胞の細胞ペレット

を移植した場合の影響を観察することができる。

(実施例 15. 肥大化能を有する軟骨細胞の産生する誘導骨芽細胞分化誘導能を有する因子と、BMP、TGF β との関係)

- 5 実施例 1 と同様の方法を用いて、ラット肋骨・肋軟骨部から肥大化能を有する軟骨細胞を採取した。この肥大化能を有する軟骨細胞を、MEM分化因子産生培地（最小必須培地（MEM培地）および 15% FBS（ウシ胎仔血清）、デキサメサゾン 10 nM、 β -グリセロホスフェート 10 mM、アスコルビン酸 50 μ g/ml、100 U/ml ペニシリン、0.1 mg/ml ストレプトマイシン、
10 および 0.25 μ g/ml アンホテリシン B）を加えて 4×10^4 細胞/cm² に希釈し、培養し、経時的に各培地の上清を回収した。その後、以下のアッセイを行い、アルカリホスファターゼの活性を測定した。

(TGF β アッセイ)

- TGF β アッセイは、Nagano, T. et al.: Effect of heat treatment on bio
15 activities of enamel matrix derivatives in human periodontal ligament (H PDL) cells. J. Periodont. Res., 39: 249-256, 2004. に記載の方法を用いて行った。HPDL細胞を 5×10^4 /穴で 96 穴プレートに播種し、24 時間培養した。培養液を 10 nM $1\alpha, 25$ -ジヒドロキシビタミン D₃ と検査試料を含む培地に交換した。96 時間培養後、PBS で洗浄し、アルカリホスファターゼ活性を測定した。具体的には、10 mM p-ニトロフェニルリン酸を基質
20 とし、5 mM MgCl₂ を含む 100 mM 2-アミノ-2-メチル-1, 3-プロパンジオール塩酸緩衝液 (pH 10.0) 中で、37℃にて、10 分間反応させた。NaOH を添加した後、405 nm の吸光度を測定した。

- 肥大化能を有する軟骨細胞を MEM 分化因子産生培地で培養した培養上清を添
25 加した場合、吸光度は、約 0.1515、約 0.2545、約 0.1242（表 9 および図 11 A を参照のこと。）であった。

(表9 TGFβ 活性)

	405nm(OD)	SD
1	0.1515	0.01818
2	0.2545	0.00303
3	0.1242	0.03030

5

(BMPアッセイ)

BMPアッセイは、Iwata, T. et al.: Noggin Blocks Osteoinductive Activity of Porcine Enamel Extracts. J. Dent. Res., 81: 387-391, 2002.に記載
 10の方法を用いて実施した。ST2細胞を 5×10^4 /穴で96穴プレートに播種し、24時間培養した。培養液を200nM all-トランスレチノイン酸と検査試料を含む培地に交換した。72時間培養後、PBSで洗浄した。次いで、アルカリホスファターゼ活性を測定した。具体的には、10mM p-ニトロフェニルリン酸を基質とし、5mM MgCl₂を含む100mM 2-アミノ-
 15 2-メチル-1, 3プロパンジオール塩酸緩衝液(pH10.0)中で、37℃にて、8分間反応させた。NaOHを添加した後、405nmの吸光度を測定した。

肥大化能を有する軟骨細胞をMEM分化因子産生培地で培養した培養上清を添加した場合、吸光度は、約0.05、約0.075、約0.075(表10および図11Bを参照のこと。)であった。
 20

(表10 BMP 活性)

	405nm(OD)	SD
1	0.0500	0.0188
2	0.0750	0.0125
3	0.0750	0.0063

25

誘導骨芽細胞分化誘導因子を含むMEM分化因子産生培地上清には、TGF β の活性が認められた。つまり、この分化因子産生培地にはTGF β が存在することが証明された（図11Aを参照のこと。）。また、BMPの活性もわずかに観察された（図11Bを参照のこと。）。BMPの系はTGF β の存在で抑制がかかる。それにもかかわらず、TGF β が存在する分化因子産生培地上清においてアルカリホスファターゼ活性が上昇した。以上の結果より、このアルカリホスファターゼ活性の上昇は、BMPではない誘導骨芽細胞分化誘導因子により誘導されたと考えられる。

（実施例16．骨芽細胞分化誘導因子と生体適合性を有する足場とを用いる複合材料が、未分化細胞を骨芽細胞に誘導する能力の検討）

本実施例では、実施例1と同様の方法により、肥大化能を有する軟骨細胞をMEM分化因子産生培地で培養し、4日から3週間、経時的に集めた上清を遠心フィルターに入れ、4000 $\times$ g、4 $^{\circ}$ Cにて30分間遠心分離し、高分子分画と低分子分画を分離する条件下の遠心式限外濾過により、上清を分子量50,000以上の画分と分子量50,000以下の画分に分離すると同時に、分子量50,000以上の画分を10倍濃縮した。この濃縮した培地上清を、分化因子産生培地で5倍に希釈した。この遠心分離には、50K膜（ミリポア社製、アミコンウルトラ15、50,000NMWL、カタログ番号UFC905024）を用いた。

超多孔体ヒドロキシアパタイト（アパセラムAXフィラー：Lot. 03231710、3mm角）と十分に該アパタイトが浸漬する量の希釈液（例えば、該アパタイト顆粒10粒に対して希釈液1ml）を、注射筒に入れて引くことにより、脱気した。この際、約0.3mlの希釈液がヒドロキシアパタイトに付着された。

次いで、18時間前に24ウェルプレートに播種したマウスC3H10T1／

2細胞（ 1.25×10^4 細胞/cm²）に、上記のようにして作製した骨芽細胞誘導因子を付着させた超多孔体ヒドロキシアパタイトヒドロキシアパタイトをウェル当たり10粒添加した。マウスC3H10T1/2細胞を培養する培地として、BME培地を用いた。72時間後にアパタイトを取り出し、実施例1と同様の方法によりアルカリホスファターゼ活性を測定した。

（比較例11）

比較例として、実施例16と同様の方法で、アパセラムAXを分化因子産生培地に浸漬したもの、アパセラムAX単独、分化因子産生培地単独（1ml）を調製した。次いで、実施例11と同様に、18時間前に、播種したマウスC3H10T1/2細胞（BME培地中、 1.25×10^4 細胞/cm²）に、分化因子産生培地にアパセラムAXを浸漬したもの（10粒/well）、アパセラムAX単独、分化因子産生培地単独（1ml）を添加し、72時間後にこれらを取り出した。次いで、実施例1と同様の方法によりアルカリホスファターゼ活性を測定した。さらに、実施例16と同様の方法によりRNAを抽出した。

その結果、分化因子産生培地を1とした場合、アルカリホスファターゼ活性は、骨芽細胞分化誘導因子を含む培養上清にアパセラムAXを浸漬したものでは、5.8であり、アパセラムAXを分化因子産生培地に浸漬したものでは、1.4であり、アパセラムAX単独では、1.4であった（表11および図12）。

（表11）

	1	2	3	平均値	SD	相対値
因子+アパタイト	0.107	0.086	0.105	0.099	0.012	5.8
分化培地+アパタイト	0.024	0.025	0.024	0.024	0.001	1.4
アパタイト単独	0.023	0.024	0.024	0.024	0.001	1.4
分化培地単独	0.011	0.019	0.021	0.017	0.005	1

因子+アパタイト：骨芽細胞分化誘導因子を含む培養上清にアパセラムAXを浸漬したもの

分化培地+アパタイト：アパセラムAXを分化因子産生培地に浸漬したもの

アパタイト単独：アパセラムAX単独

5 分化培地のみ：MEM分化因子産生培地そのもの

以上の結果より、骨芽細胞分化誘導因子と生体適合性を有する足場とを用いる複合材料は、未分化細胞を骨芽細胞に誘導し、骨芽細胞を産生することが確認された。

10 (実施例17. 骨芽細胞分化誘導因子と生体適合性を有する足場とを用いる複合材料を骨欠損部位および皮下に移植した場合の効果)

(複合材料の作製)

実施例1と同様の方法を用いて、4週齢雄性ラット(Wistar系)および8週齢雄性ラット(Wistar系)から肥大化能を有する細胞を得た。この肥大化能を有する軟骨細胞を、分化因子産生培地で培養し、その培養上清を得た。
15 この培養上清を50K膜(ミリポア社製、アミコンウルトラ15、50,000NMWL、カタログ番号UFC905024)を用いて、4000×g、4℃にて30分間遠心分離し、分子量50,000以下の成分を除去すると共に分子量50,000以上の成分を10倍濃縮した。

20 この濃縮液を凍結させ、遠心乾燥させ、電動式粉碎装置(クライオプレスCPR-100W、マイクロテックニチオン社)で粉碎した。この粉碎乾燥物30mgを採取し、足場に複合化した。

足場として、コラーゲンキット(コラーゲングル培養キット、新田ゼラチン社)を用いてコラーゲングルを作製した。具体的には、コラーゲングルは、酸性コラーゲン溶液0.8ml、再構成用緩衝液(260mM NaHCO₃、20
25 0mM HEPES、50mM NaOH)0.1ml、粉碎乾燥物30mgを

混合し、温度を37度にすることにより作製した。複合材料の大きさは1～1.5 cm³であった。この複合材料を、埋入する欠損の大きさにあわせて切削した。

(骨の欠損部位の作製方法)

- 5 移植する同系動物もしくは免疫不全動物を麻酔し、無菌的に大腿骨または脛骨の皮膚を切開し、軟部組織をそらせて、大腿骨または脛骨の骨欠損作製部位を露出させた。あるいは、頭蓋骨の皮膚を切開し、頭蓋骨の骨欠損作製部位を露出させる。歯科用穿孔器にトレフィンバーまたはディスクを装着し、穿孔骨欠損または離断骨欠損を作製した。

10

(骨欠損部位への移植)

本実施例では、移植の4週間後に大腿骨を摘出し、マイクロCT測定および組織標本作製によって、骨形成を評価する。

- 15 上記方法を用いて、ラット(Wistar系、12週齢、オス)の大腿骨に、直径3 mm×深さ1～2 mmの骨欠損を作製し、上記の複合材料を埋入した。その結果を図40Aに示す。

(皮下ポケットの作製方法)

- 20 移植する同系動物もしくは免疫不全動物を麻酔し、無菌的に皮膚を切開する。開創部に丸先はさみを挿入し、皮膚を皮下組織と剥離することにより、ポケットを作製する。

(皮下への移植)

- 25 上記方法を用いて、ラット(Wistar系、10週齢、オス)の背部皮下に、直径1～2 cmの皮下ポケットを作製し、上記の複合材料を埋入する。その後、骨形成能を評価する。

(マイクロCT)

常法に従い、摘出した試料を10%中性ホルマリン緩衝液で固定する。固定試料をマイクロCTにかけて得たCT画像を新生骨量測定ソフトで解析する。

(組織標本)

5 常法に従い、固定試料をパラフィン包埋し、薄切切片を作製する。作製した薄切切片を染色することで、骨形成を判定する。

さらに、以下の表12に列挙した足場を用い、上記方法により複合材料を作製し、ラットの骨欠損部位および皮下に移植する。移植した部位について骨形成能を評価する。

(表12)

足場	組成
多孔質ヒドロキシアパタイト	HOYA 社製アパセラム気孔率50%
超多孔質ヒドロキシアパタイト	HOYA 社製アパセラム気孔率85%
超多孔質ヒドロキシアパタイト	BD 社製3Dスキャホールド
アパタイトコラーゲン混合体	HOYA 社製アパセラム顆粒+新田ゼラチン 社製コラーゲングル
アパタイトコラーゲン複合体	HOYA 社製アパコラ
コラーゲングル	新田ゼラチン社製
コラーゲンスポンジ	新田ゼラチン社製
ゼラチンスポンジ	山之内製薬社製止血用ゼラチンスポンジ
フィブリンゲル	ニプロ社製ベリブラストP
合成ペプチド	3Dマトリックス社製ブラマックス
細胞外基質混合物	BD 社製マトリゲル
アルジネート	ケルコ社製ケルトンLVCR
アガロース	和光純薬社製アガロース
ポリグリコール酸	コアフロント社製
ポリ乳酸	コアフロント社製
ポリグリコール酸/ポリ乳酸共重合体	コアフロント社製

足場として表 1 2 に列挙した足場を用いた複合材料を用いて皮下および骨欠損部位に移植しマイクロ C T および組織標本を用いて、骨形成を判定することができる。

5 (比較例 A：足場を単独で皮下および骨欠損部位に移植した場合の効果)

実施例 1 7 と同様の方法を用いて、表 1 2 に列挙した足場を、それぞれ単独で同系動物もしくは免疫不全動物の皮下および骨欠損部位に移植し皮下に移植した場合、骨形成は観察されないかどうかを判定することができる。骨欠損部位に移植した場合、足場単独でも骨形成は生じるが、その量についても、実施例 1 7 の方法を用いて、肥大化能を有する軟骨細胞の産生する骨芽細胞分化誘導因子と足場との複合材料を移植したときに比べることができる。

(実施例 1 8．肥大化能を有する軟骨細胞の産生する誘導骨芽細胞分化誘導因子による骨芽細胞の誘導)

15 (肥大化能を有する軟骨細胞の産生する骨芽細胞分化誘導因子の調製)

本実施例では、実施例 1 と同様の方法により、肥大化能を有する軟骨細胞を M E M 分化因子産生培地で培養し、4 日から 3 週間、経時的に集めた上清を遠心フィルターに入れ、 $4000 \times g$ 、 4°C にて 30 分間遠心分離し、高分子分画と低分子分画を分離する条件下の遠心式限外濾過により、上清を分子量 50,000 以上の画分と分子量 50,000 以下の画分に分離すると同時に、分子量 50,000 以上の画分を 10 倍濃縮した。この濃縮した培地上清を、分化因子産生培地で 5 倍に希釈した。この遠心分離には、50 K 膜（ミリポア社製、アミコンウルトラ 15、50,000 NMWL、カタログ番号 U F C 9 0 5 0 2 4）を用いた。

25 (骨髄由来未分化間葉系幹細胞の調製)

4週齢Wistar系雄性ラットをクロロホルムを使用して屠殺した。ラット
の大腿部をバリカンで剃毛し、ヒビテン液（10倍希釈）に全身を浸し消毒した。
大腿部を切開し、大腿骨を無菌的に摘出した後、両端を切除して骨幹部を採取し
た。注射針をつけた注射筒にMEM増殖培地（最小必須培地（MEM培地）およ
び15% FBS、100U/mlペニシリン、0.1mg/mlストレプトマイ
5 シン、および0.25μg/mlアンホテリシンB）を10～15ml入れて、
骨髓をフラッシュアウトした。この骨髓液をT-75フラスコ（ベクトンディキ
ンソン社）に播種し、最終培養液量を30mlとした。この骨髓液を37℃で、
1週間培養した。培地として、MEM分化因子産生培地を用いた。培養液は2回
10 /週、半量を交換した。1週間後に底面に接着した細胞を未分化間葉系細胞とし
た。この細胞を、Dulbecco's Phosphate Buffered Saline、インビトロゲン社、カタログ番号14190（D-PBS）
で洗浄後、0.05%トリプシン液（インビトロゲン社）で剥離し、遠心（17
0×g、3分間）により回収洗浄して、使用した。

15
(I. 肥大化能を有する軟骨細胞の産生する骨芽細胞分化誘導因子の直接添
加)

本実施例において調製した骨髓由来未分化間葉系幹細胞（ 1×10^{-5} /ml
/well）をウェルに播種し、MEM増殖培地（最小必須培地（MEM培地）
20 および15% FBS、100U/mlペニシリン、0.1mg/mlストレプ
トマイシン、および0.25μg/mlアンホテリシンB）で一晩（18時間）
培養した。培養後、因子を含むMEM分化因子産生培地（最小必須培地（MEM
培地）および15% FBS（ウシ胎仔血清）、デキサメサゾン10nM、β-
グリセロホスフェート10mM、アスコルビン酸50μg/ml、100U/ml
25 1ペニシリン、0.1mg/mlストレプトマイシン、および0.25μg/ml
1アンホテリシンB）または因子を含まない分化因子産生培地（分化因子産生培

地そのもの)を1mlウェルに添加し、さらに72時間培養した。その後、骨芽細胞のマーカーであるアルカリホスファターゼ活性を測定した。アルカリホスファターゼ活性の測定は実施例1と同様の方法を用いた。その結果を以下の表に示す。

5 (表13)

	1	2	3	平均値	相対値
因子(+)	0.208	0.226	0.299	0.244	2.17
因子(-)	0.120	0.111	0.107	0.113	1

10 因子(+): 因子を含むMEM分化因子産生培地を添加した群

因子(-): 因子を含まない分化因子産生培地(分化因子産生培地そのもの)を添加した群

15 肥大化能を有する軟骨細胞の産生する誘導骨芽細胞分化誘導因子は、初代ラット骨髄由来未分化間葉系幹細胞のアルカリホスファターゼ活性を上昇させることが確認された。

(II. 肥大化能を有する軟骨細胞の産生する骨芽細胞分化誘導因子をヒドロキシアパタイトに含浸させた後に添加)

20 (ヒドロキシアパタイトの調製)

ヒドロキシアパタイトとして、アパセラムAX(HOYA社製、人工骨AB-01、GA-3を用いた。アパセラムAXが浸漬する量の希釈液(例えば、該アパタイト顆粒10粒に対して希釈液1ml)とアパセラムAXとを、注射筒に入れて引くことにより、脱気した。この際、約0.3mlの希釈液がヒドロキシアパタイトに付着した。

25

本実施例において調製した骨髓由来未分化間葉系幹細胞 ($1 \times 10^{-5} / \text{ml}$ /well) をウェルに播種し、MEM増殖培地で一晚 (18時間) 培養した。次に、因子を含むMEM分化因子産生培地または因子を含まない分化因子産生培地 (分化因子産生培地そのもの) を含浸させたアパセラムAXを、本実施例において培養した細胞の入ったウェルに添加し、さらに72時間培養した。その後、骨芽細胞のマーカであるアルカリホスファターゼの活性を測定した。アルカリホスファターゼ活性の測定は実施例1と同様の方法を用いた。その結果を以下の表に示す。

(表14)

	1	2	3	平均値	相対値
因子(+)	0.169	0.153	0.191	0.171	2.15
因子(-)	0.085	0.077	0.077	0.080	1

因子 (+) : 因子を含む分化因子産生培地を含浸させたアパセラムAXを添加した群

因子 (-) : 因子を含まない分化因子産生培地 (分化因子産生培地そのもの) を含浸させたアパセラムAXを添加した群

肥大化能を有する軟骨細胞の産生する誘導骨芽細胞分化誘導因子は、初代ラット骨髓由来未分化間葉系幹細胞のアルカリホスファターゼ活性を上昇させることが確認された。

(実施例19. 骨芽細胞分化誘導因子と生体適合性を有する足場とを用いる複合材料を骨欠損部位に移植した場合の効果)

(複合材料の作製)

実施例1と同様の方法を用いて、4週齢雄性ラット (Wistar系) および8週齢雄性ラット (Wistar系) から肥大化能を有する細胞を得た。この肥

大化能を有する軟骨細胞を、分化因子産生培地で培養し、その培養上清を得た。
この培養上清を50K膜（ミリポア社製、アミコンウルトラ15、50、000
NMWL、カタログ番号UFC905024）を用いて、4000×g、4℃に
て30分間遠心分離し、分子量50,000以下の成分を除去すると共に分子量
50,000以上の成分を10倍濃縮した。

この濃縮液を凍結させ、遠心乾燥させ、電動式粉碎装置（クライオプレスCP
ー100W、マイクロテックニチオン社）で粉碎した。この粉碎乾燥物30mg
を採取し、足場に複合化した。

0.8mlコラーゲン液（セルマトリックス、コラーゲングル培養キット、新
田ゼラチン社、大阪）、0.1ml再構成用緩衝液（260mM NaHCO₃、
200mM HEPES、50mM NaOH）に対して、30mgの凍結乾燥
物を混合し（最終約1ml）、24穴培養プレート内のセルカルチャーインサー
ト（PET膜、0.4μmポアサイズ、Falcon、ベクトンディキンス社、
Auckland, NZ）に3分して入れ、固化させた。次いで、下部にMEM
増殖培地（インビトロジェン社、Franklin, NJ）を満たした後、一晚
37℃で保存した。

翌日、12週齢の雄性ラット（Wistar系）（日本医科学動物資材研究所、
東京）に麻酔をし、無菌的に大腿骨の皮膚を切開し、軟部組織をそらせて、大腿
骨の骨欠損作製部位を露出させた。このラットの大腿骨（遠位の外側上果に近い
骨幹部）に、トレフィンバー（マイクロ精工社、東京）で、直径3.0もしくは
2.5mmの骨欠損を作製した。

（骨欠損部位への移植）

上記のようにして作製した骨欠損部位に、凍結乾燥物とコラーゲングルとの混
合物を埋入した。反対側の大腿骨の外側上果に近い骨幹部には、同じサイズの骨

欠損を作成し、コラーゲンゲルのみを（凍結乾燥物の代りに0.1 ml MEM液を使用して、一晚37℃で保存したものを）埋入した。

（マイクロCT撮影）

5 マイクロCT機器は、東陽テクニカ社製SKYSCAN1172高分解能X線マイクロCTスキャナを使用した。100KVで0.4度ずつ回転させて各レントゲンを撮影し、添付ソフトNReconにより再構成し、三次元ボリュームレンダリングソフトVGStudio Max（日本ビジュアルサイエンス株式会社）により三次元画像を得た（図41～42）。

10

（形態学的観察）

HE染色：薄切、脱パラした切片を、ヘマトキシリン液に5～10分浸漬、水洗、色出し後、エオジン液で3～5分浸漬。

15 （比較例）

反対側の大腿骨の外側上果に近い骨幹部には、同じサイズの骨欠損を作製し、コラーゲンゲルのみを（凍結乾燥物の代りに0.1 ml MEM増殖培地を使用して、一晚37℃で保存したものを）埋入した。

20 実施例19と同様の方法を使用して、マイクロCTの測定および形態学的観察を行った。

（結果）

25 結果を以下の表15に示す。骨欠損の直径3.0 mmおよび2.5 mmのどちらにおいても、コラーゲンのみを移植した群と比べて、因子とコラーゲンゲルとを用いる複合材料を移植した群において新生骨の比率が高かった。

(表 1 5)

		ROI体積 [mm ³]	新生骨体積 [mm ³]	新生骨比 率[%]
試行1	No.1 Col	7.29	2.24	30.73
	No.1 GC	7.27	2.95	40.59
	No.2 Col	7.24	2.10	29.04
	No.2 GC	7.25	2.22	30.65
	No.3 Col	7.29	2.02	27.68
	No.3 GC	7.26	2.52	34.74
試行2	No.1 Col	骨折		
	No.1 GC	7.26	3.26	44.96
	No.2 Col	7.22	2.01	27.90
	No.2 GC	7.26	3.07	42.28
	No.3 Col	7.24	2.05	28.30
	No.3 GC	6.62	3.23	48.87
試行3	No.1 Col	4.99	1.95	39.08
	No.1 GC	4.99	2.06	41.41
	No.2 Col	5.01	2.49	49.66
	No.2 GC	4.99	2.81	56.38
	No.3 Col	4.97	2.00	40.16
	No.3 GC	5.01	2.70	53.96
試行4	No.1 Col	4.99	1.80	36.11
	No.1 GC	4.97	2.08	41.76
	No.2 Col	4.99	1.91	38.29
	No.2 GC	5.02	2.53	50.49
	No.3 Col	5.01	2.45	48.96
	No.3 GC	4.99	2.67	53.53

サンプル：5回の試行を行った。サンプル1～2は、直径3.0の骨欠損を作製した群であり、サンプル3および4は、直径2.5mmの骨欠損を作製した群を示す。

NO. は各試行時のラットの番号を示す。試行1～試行4はn=3。

Col：同一ラットの左右の大腿骨に骨欠損を作製し、いずれか一方にCol（コラーゲンのみを移植）した。

GC：同一ラットの左右の大腿骨に骨欠損を作製し、いずれか一方にGC（因子

とコラーゲンを移植)した。

ROI体積：解析した部分の体積。

(実施例20A. ラット骨髄由来未分化間葉系幹細胞から骨芽細胞への分化誘導に対する因子の効果)

(ラット由来の肥大化能を有する軟骨細胞による因子の検出)

本実施例では、実施例1と同様の方法を使用して、ラット肋骨・肋軟骨由来の肥大化能を有する軟骨細胞をMEM分化因子産生培地で培養した場合に産生する細胞機能調節因子を調製した。

(ラット骨髄由来未分化間葉系幹細胞の採取)

実施例18と同様の方法を使用して、ラット大腿骨の骨髄より細胞を採取し、1週間培養した。2. 5×10^{-4} 個/mlの上記細胞液、1mlを24穴プレートに播種し、MEM増殖培地で培養し、初代ラット骨髄由来間葉系幹細胞を調製した。

(試料の添加およびアルカリホスファターゼ活性の測定)

上記初代ラット骨髄由来間葉系幹細胞のMEM増殖培地での培養開始から18時間後に、下記試料液(各1ml)を初代ラット骨髄由来間葉系幹細胞に添加した。さらに、72時間培養し、実施例1と同様の方法によりアルカリホスファターゼ活性を測定した。

(添加した試料)

(1) 肥大化能を有する軟骨細胞を分化因子産生培地で培養した上清；因子を含む分化因子産生培地

(2) MEM分化因子産生培地のみ；本発明による因子を含まないが、デキサメサゾンを含む培地；Maniatopoorusの骨芽細胞分化培地

(3) MEM増殖培地のみ；因子もデキサメサゾンも含まないMEM増殖培地
その結果を以下の表に示す。

- 5 誘導骨芽細胞分化誘導因子を含む上清を添加すると、初代ラット骨髄由来間葉系幹細胞は、因子もデキサメサゾンも含まないMEM増殖培地を添加したもの
比べて2倍以上もアルカリホスファターゼ活性を上昇させた。他方、デキサメサ
10 ゾンを含むが誘導骨芽細胞分化誘導因子を含まない分化因子産生培地のみを添加
しても初代ラット骨髄細胞由来間葉系幹細胞はアルカリホスファターゼ活性を上
昇させるが、誘導骨芽細胞分化誘導因子を含む上清を添加したものにくらべると
わずかなものであった。図8等の結果から、誘導骨芽細胞分化誘導因子を含む上
清には従来型の低分子量の成分（デキサメサゾンを含む）は含まれていないと考
えられ、誘導骨芽細胞分化誘導因子を含む上清の効果は、誘導骨芽細胞分化誘導
因子自体の効果であると考えられることから、本実施例の結果から、誘導骨芽細
15 胞分化誘導因子は、従来型骨芽細胞分化誘導成分であるデキサメサゾンよりも骨
芽細胞への分化誘導能力が高いと考えられる。

(表16)

上清添加 後72hr(3日目)の ALP(Abs405)

添加した試料		1	2	3	平均値	相対値
上清添加	(1)	0.688	0.665	0.686	0.680	2.1
培地のみ	(2)	0.426	0.420	0.490	0.445	1.4
	(3)	0.324	0.270	0.364	0.321	1

20

(実施例20B：肥大化能を有する軟骨細胞をMEM増殖培地で培養した上清が、ラット初代骨髄由来未分化間葉系幹細胞に与える影響)

本比較例では、比較例 1 A と同様の方法を用いて、ラット由来肥大化能を有する軟骨細胞を、MEM 増殖培地中で培養した培地の上清を回収した。

実施例 1 8 と同様の方法を用いて、初代ラット骨髄由来間葉系幹細胞を調製した。

5 (試料の添加およびアルカリホスファターゼ活性の測定)

上記初代ラット骨髄由来間葉系幹細胞の MEM 増殖培地での培養開始から 1 8 時間後に、下記試料液 (各 1 m l) を初代ラット骨髄由来間葉系幹細胞に添加した。さらに、7 2 時間培養し、実施例 1 と同様の方法によりアルカリホスファターゼ活性を測定した。

10

(添加した試料)

G C / 分化 : 添加した試料液が、肥大化能を有する軟骨細胞を MEM 分化因子産生培地で培養した上清

G C / 増殖 : 添加した試料液が、肥大化能を有する軟骨細胞を MEM 増殖培地で培養した上清

15

増殖 : 添加した試料液が、MEM 増殖培地

結果を以下の表に示す。

肥大化能を有する軟骨細胞を MEM 分化因子産生培地で培養した上清には、初代ラット骨髄由来間葉系幹細胞のアルカリホスファターゼ活性を上昇させる因子が存在するが、肥大化能を有する軟骨細胞を MEM 増殖培地で培養した上清には、初代ラット骨髄由来間葉系幹細胞のアルカリホスファターゼ活性を上昇させる因子は存在しないことが確認された。

20

(表 17)

細胞:rMSC (ラット)

	1	2	3	平均値	相対値
GC/分化	0.688	0.665	0.686	0.680	2.120
GC/増殖	0.192	0.184	0.151	0.176	0.548
増殖のみ	0.324	0.274	0.364	0.321	1.000

5 HAM分化因子産生培地で培養したラット由来肥大化能を有する軟骨細胞が、ラット初代骨髄由来間葉系幹細胞に与える影響についても、本実施例と同様の方法を用いることにより、確認することができる。

(実施例 21A. ヒト未分化間葉系幹細胞から骨芽細胞への分化誘導に対する因子の効果)

(ラット由来の肥大化能を有する軟骨細胞による因子の検出)

10 本実施例では、実施例 1 と同様の方法を使用して、ラット肋骨・肋軟骨由来の肥大化能を有する軟骨細胞をMEM分化因子産生培地で培養した場合に産生する細胞機能調節因子を調製した。

(ヒト間葉系幹細胞の調製)

15 ヒト間葉系幹細胞株 (hMSC: PT-2501) をCambrex社から購入し、1週間培養した。2.5 × 10⁻⁴ 個/ml の上記細胞液、1 ml を24穴プレートに播種し、MSCGM培地 (増殖培地) で培養した。

(試料の添加およびアルカリホスファターゼ活性の測定)

20 上記ヒト間葉系幹細胞のMSCGM培地 (増殖培地) での培養開始から18時間後に、下記試料液 (各 1 ml) をヒト間葉系幹細胞に添加した。さらに、72

時間培養し、実施例 1 と同様の方法によりアルカリホスファターゼ活性を測定した。

(添加した試料)

5 (1) 肥大化能を有する軟骨細胞を分化因子産生培地で培養した上清；因子を含む分化因子産生培地

(2) MEM分化因子産生培地のみ；本発明による因子を含まないが、デキサメサゾンを含む培地；Maniatopoorusの骨芽細胞分化培地

(3) MEM増殖培地のみ；因子もデキサメサゾンも含まないMEM増殖培地

10 その結果を以下の表に示す。

誘導骨芽細胞分化誘導因子を含む上清を添加すると、ヒト葉系幹細胞は、因子もデキサメサゾンも含まないMEM増殖培地を添加したものとは比べて 5 倍以上もアルカリホスファターゼ活性を上昇させた。他方、デキサメサゾンを含むが誘導骨芽細胞分化誘導因子を含まない分化因子産生培地のみを添加してもヒト間葉系

15 幹細胞はアルカリホスファターゼ活性を上昇させるが、誘導骨芽細胞分化誘導因子を含む上清を添加したものにくらべるとわずかなものであった。図 8 等の結果から、誘導骨芽細胞分化誘導因子を含む上清には従来型の低分子量の成分（デキサメサゾンを含む）は含まれていないと考えられ、誘導骨芽細胞分化誘導因子を含む上清の効果は、誘導骨芽細胞分化誘導因子自体の効果であると考えられるこ

20 とから、本実施例の結果から、誘導骨芽細胞分化誘導因子は、従来型骨芽細胞分化誘導成分であるデキサメサゾンよりも骨芽細胞への分化誘導能力が高いと考えられる。

(表 18)

上清添加後72hr(3日目)のALP(Abs405)

添加した試料	1	2	3	平均値	相対値
(1)	0.83	0.73	0.84	0.80	5.2
(2)	0.20	0.35	0.26	0.27	1.8
(3)	0.13	0.14	0.18	0.15	1

(アルカリホスファターゼ染色)

- 5 上記ヒト間葉系幹細胞のMSCGM培地(増殖培地)での培養開始から18時間後に、下記試料液(各1ml)をヒト間葉系幹細胞に添加した。さらに、72時間培養し、実施例1と同様の方法によりアルカリホスファターゼ染色をした。

(添加した試料)

- 10 (1) 肥大化能を有する軟骨細胞を分化因子産生培地で培養した上清; 因子を含む分化因子産生培地
- (2) MEM分化因子産生培地のみ; 本発明による因子を含まないが、デキサメサゾンを含む培地; Maniatoporousの骨芽細胞分化培地
- (3) MEM増殖培地のみ; 因子もデキサメサゾンも含まないMEM増殖培地
- 15 その結果を図39に示す。

- 誘導骨芽細胞分化誘導因子を含む上清を添加すると、ヒト間葉系幹細胞は、因子もデキサメサゾンも含まないMEM増殖培地を添加したものとは比べてアルカリホスファターゼが強く発現した。他方、デキサメサゾンを含むが誘導骨芽細胞分化誘導因子を含まない分化因子産生培地のみを添加してもヒト間葉系幹細胞はアルカリホスファターゼを発現するが、誘導骨芽細胞分化誘導因子を含む上清を添加したものとはくらべるとわずかなものであった。図8等の結果から、誘導骨芽細胞分化誘導因子を含む上清には従来型の低分子量の成分(デキサメサゾンを含
- 20

む)は含まれていないと考えられ、誘導骨芽細胞分化誘導因子を含む上清の効果は、誘導骨芽細胞分化誘導因子自体の効果であると考えられることから、本実施例の結果から、誘導骨芽細胞分化誘導因子は、従来型骨芽細胞分化誘導成分であるデキサメサゾンよりも骨芽細胞への分化誘導能力が高いと考えられる。

5

(実施例 2 1 B：肥大化能を有する軟骨細胞をMEM増殖培地で培養した上清が、ヒト未分化間葉系幹細胞に与える影響)

本比較例では、比較例 1 Aと同様の方法を用いて、ラット由来肥大化能を有する軟骨細胞を、MEM増殖培地中で培養した培地の上清を回収した。

10

ヒト未分化間葉系幹細胞(hMSC:PT-2501)をCambrex社から購入し、実施例 2 1 Aと同様の方法を用いてMSCGM培地(増殖培地)中で培養した。

(試料の添加およびアルカリホスファターゼ活性の測定)

15

上記ヒト間葉系幹細胞のMSCGM培地(増殖培地)での培養開始から18時間後に、下記試料液(各1ml)をヒト間葉系幹細胞に添加した。さらに、72時間培養し、実施例 1と同様の方法によりアルカリホスファターゼ活性を測定した。

20

(添加した試料)

GC/分化：添加した試料液が、肥大化能を有する軟骨細胞をMEM分化因子産生培地で培養した上清

GC/増殖：添加した試料液が、肥大化能を有する軟骨細胞をMEM増殖培地で培養した上清

25

増殖：添加した試料液が、MEM増殖培地

結果を以下に示す。

肥大化能を有する軟骨細胞をMEM分化因子産生培地で培養した上清には、ヒト間葉系幹細胞のアルカリホスファターゼ活性を上昇させる因子が存在するが、肥大化能を有する軟骨細胞をMEM増殖培地で培養した上清には、ヒト間葉系幹細胞のアルカリホスファターゼ活性を上昇させる因子は存在しないことが確認された。

(表 1 9)

細胞:hMSC (ヒト)

	1	2	3	平均値	相対値
GC/分化	1.504	2.315	1.773	1.864	4.618
GC/増殖	0.560	0.395	0.523	0.493	1.220
増殖のみ	0.435	0.322	0.454	0.404	1.000

HAM分化因子産生培地で培養したラット由来肥大化能を有する軟骨細胞が、ヒト間葉系幹細胞に与える影響についても、本実施例と同様の方法を用いることにより、確認することができる。

(実施例 2 2. ラット骨髓由来未分化細胞に対する誘導骨芽細胞分化誘導因子の影響)

(肥大化能を有する軟骨細胞の産生する誘導骨芽細胞分化誘導因子の調製)

実施例 1～3 (ラット)、4～5 (ヒト)、7 (ラット)、9 (マウス)、10 (ウサギ) と同様の方法により誘導骨芽細胞分化誘導因子を調製する。

(ラット骨髓由来未分化細胞の調製)

ラット大腿骨を採取し、軟部組織を取り除いた後、両骨端部を切離する。培地を注射筒に取り、大腿骨の両端から骨髓内に注射針を通して、骨髓を培地で流し出す。培地は、15% FBS を含む MEM を用いる。

得られた細胞混液をピペッティングした後、T-75フラスコに播種し（大腿骨1本をT-75フラスコ1個）、37℃、CO₂インキュベーターで培養する。培地交換は週3回、半量ずつ交換する。培養から7～10日後に、接着した細胞を0.05%トリプシン-EDTAではがす。

- 5 本実施例において調製した誘導骨芽細胞分化誘導因子を、ラット骨髄由来未分化細胞の培養物にそれぞれ添加し、さらに培養する。その後、実施例1と同様の方法を用いて、誘導骨芽細胞分化誘導因子の、ラット骨髄由来未分化細胞を誘導骨芽細胞に誘導する能力について評価する。

- 10 従来法により骨髄由来未分化幹細胞から誘導させた骨芽細胞を用いた。具体的には、Maniopoulosら、Cell Tissue Res, 254: 317-330, 1988に記載される方法に従ってラット大腿骨髄から未分化幹細胞を採取し、この未分化幹細胞を遠心分離（170～200×gで3～5分間）することによりペレットにして、37℃、5% CO₂インキュベーター中で2週間、Maniopoulosによって提案された培地（本明細書において分化因子産生培地ともいう。）で培養したもの
15 (Bp)を用いた。

- 20 実施例1と同様の方法を用いて、リアルタイムPCR反応を行い、リアルタイムPCR機器（ABI社、PRISM 7900HT）にて各細胞マーカーの発現量の測定を行った。PCR反応後、しきい値の設定および到達サイクルの算出を、機器（PRISM 7900HT）内蔵の解析ソフトにより実施した。各細胞マーカーの値を、GAPDHの値で除して発現量の平均値を算出した。その結果、肥大化能を有さない軟骨細胞はII型コラーゲンおよびアグリカンを発現するが、アルカリホスファターゼおよびオステオカルシンはいずれも発現しなかった（比較例1B、表II）。

- 25 他方、従来法により骨髄由来未分化幹細胞から誘導させた骨芽細胞では、アルカリホスファターゼおよびオステオカルシンは発現するが、II型コラーゲンおよびアグリカンはいずれも発現しなかった（表III）。

(表 I I I)

アルカリホスファターゼ

	量 (GAPDHによる補正值) 平均値			
試料	1	2	3	平均
Bp	0.0815	0.0776	0.0839	0.0810

5

II型コラーゲン

	量 (GAPDHによる補正值) 平均値			
試料	1	2	3	平均
Bp	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000

アグリカン

10

	量 (GAPDHによる補正值) 平均値			
試料	1	2	3	平均
Bp	0.0010	0.0009	0.0013	0.0011

オステオカルシン

15

	量 (GAPDHによる補正值) 平均値			
試料	1	2	3	平均
Bp	0.7282	0.7136	1.1064	0.8494

B p : 大腿骨髄から採取した未分化幹細胞のペレットを、骨芽細胞分化培地で培養したもの

20 (比較例 2 2 A. 誘導骨芽細胞分化誘導因子を含まない上清がラット骨髄由来未分化細胞に与える影響)

25 誘導骨芽細胞分化誘導因子を含む上清のかわりに、肥大化能を有する軟骨細胞を増殖培地で培養した上清 (誘導骨芽細胞分化誘導因子を含まない上清) を培地に添加すること以外、実施例 2 2 と同様の方法を用いる。ラット骨髄由来未分化細胞の培養物に添加し、さらに培養する。その後、実施例 1 と同様の方法を用いて、肥大化能を有する軟骨細胞を増殖培地で培養した上清 (誘導骨芽細胞分化誘

導因子を含まない上清) がラット骨髓由来未分化細胞に与える影響について評価する。

(比較例 2 2 B. 誘導骨芽細胞分化誘導因子を含まない上清がラット骨髓由来未分化細胞に与える影響)

比較例 1 B (ラット)、1 D (ラット)、3 B (ラット)、4 B (ヒト)、5 B (ヒト)、9 B (マウス) および 10 B (ウサギ) により調製された肥大化能を有さない軟骨細胞を用いる。これらの細胞を分化因子産生培地で培養した上清 (誘導骨芽細胞分化誘導因子を含まない上清) を、ラット骨髓由来未分化細胞の培養物に添加し、さらに培養する。その後、実施例 1 と同様の方法を用いて、肥大化能を有さない軟骨細胞を分化因子産生培地で培養した上清 (誘導骨芽細胞分化誘導因子を含まない上清) がラット骨髓由来未分化細胞に与える影響について評価する。

(比較例 2 2 C. 分化因子産生培地および増殖培地がラット骨髓由来未分化細胞に与える影響)

誘導骨芽細胞分化誘導因子を含む上清を添加していない、分化因子産生培地のみおよび増殖培地のみを添加した培地を用いて、ラット骨髓由来未分化細胞を培養する。その後、実施例 1 と同様の方法を用いて、分化因子産生培地および増殖培地がラット骨髓由来未分化細胞に与える影響について評価する。

以上のように、本発明の好ましい実施形態を用いて本発明を例示してきたが、本発明は、この実施形態に限定して解釈されるべきものではない。本発明は、特許請求の範囲によってのみその範囲が解釈されるべきであることが理解される。

当業者は、本発明の具体的な好ましい実施形態の記載から、本発明の記載および技術常識に基づいて等価な範囲を実施することができることが理解される。本明

細書において引用した特許、特許出願および文献は、その内容自体が具体的に本明細書に記載されているのと同様にその内容が本明細書に対する参考として援用されるべきであることが理解される。

5 産業上の利用可能性

本発明は、生体内の骨形成を促進または誘発することができる、肥大化能を有する軟骨細胞の産生する誘導骨芽細胞分化誘導因子と足場とを含む複合材料ならびにその製造法およびその利用法が提供することにより、周辺に骨がない部位にまで骨形成を導くことができるようになった。このような複合材料は、従来技術

10

請求の範囲

1. A) 肥大化能を有する軟骨細胞を、デキサメサゾン、 β -グリセロホスフェート、アスコルビン酸および血清成分を含む分化因子産生培地において培養した
5 結果得られる誘導骨芽細胞分化誘導因子、および

B) 生体適合性を有する足場、
を含む、生体内の骨形成を促進または誘発するための複合材料。

2. 前記誘導骨芽細胞分化誘導因子が、(1) 前記肥大化能を有する軟骨細胞を、
10 培養した培地に存在するか、または(2) 該肥大化能を有する軟骨細胞を培養した上清を、分子量50,000の限外濾過に供することにより得られる分子量50,000以上の画分に存在する、請求項1に記載の複合材料。

3. 前記誘導骨芽細胞分化誘導因子が濃縮または凍結乾燥されたものである、請求項1に記載の複合材料。
15

4. 前記誘導骨芽細胞分化誘導因子が、生体適合性を有する足場の表面および該生体適合性を有する足場の内部孔内からなる群より選択される領域に付着または分散している、請求項1に記載の複合材料。
20

5. 前記生体適合性を有する足場が、ゲル状足場および3次元状足場からなる群より選択される、請求項1に記載の複合材料。

6. 前記生体適合性を有する足場が、ヒドロキシアパタイト、コラーゲン、アルギン酸、およびラミニンとコラーゲンIVとエンタクチンとの混合物、ならびに
25

それらの組合せからなる群より選択される物質を含む、請求項 5 に記載の複合材料。

5 7. 前記誘導骨芽細胞分化誘導因子が、凍結乾燥した状態でコラーゲン溶液と混合され、かつ前記分化因子産生培地が、基礎成分として最小必須培地 (MEM) を含む、請求項 1 に記載の複合材料。

10 8. 前記誘導骨芽細胞分化誘導因子が、ヒドロキシアパタイトに付着または分散されており、かつ前記分化因子産生培地が、基礎成分として最小必須培地 (MEM) を含む、請求項 1 に記載の複合材料。

9. 前記骨形成が、骨の欠損を修復または治療するためのものである、請求項 1 に記載の複合材料。

15 10. 前記欠損は、固定のみでは修復できない大きさを有する、請求項 9 に記載の複合材料。

11. 前記骨形成が、周辺に骨がない部位に骨を形成させるためのものである、請求項 1 に記載の複合材料。

20

12. 生体内の骨形成を促進または誘発するための複合材料を製造するための方法であって、以下の工程：

25 A) 肥大化能を有する軟骨細胞を、デキサメサゾン、 β -グリセロホスフェート、アスコルビン酸および血清成分を含む分化因子産生培地において培養した結果得られる誘導骨芽細胞分化誘導因子を提供する工程、および

B) 該誘導骨芽細胞分化誘導因子と、生体適合性を有する足場とを合わせる工程、を包含する、方法。

5 1 3. 前記誘導骨芽細胞分化誘導因子が、(1) 前記肥大化能を有する軟骨細胞を培養した培地に存在するか、または(2) 該肥大化能を有する軟骨細胞を培養した上清を、分子量50,000の限外濾過に供することにより得られる分子量50,000以上の画分に存在する、請求項12に記載の方法。

10 1 4. 前記A) 工程が、前記肥大化能を有する軟骨細胞を、デキサメサゾン、 β -グリセロホスフェート、アスコルビン酸および血清成分を含む分化因子産生培地において培養し、該培養した上清を採取することを含む、請求項12に記載の方法。

15 1 5. 前記A) 工程が、前記肥大化能を有する軟骨細胞を培養した上清を、限外濾過に供し、分子量50,000以上の画分に分離することを含む、請求項12に記載の方法。

20 1 6. 前記A) 工程の後に、前記上清を濃縮または凍結乾燥する工程をさらに包含する、請求項15に記載の方法。

1 7. 前記B) 工程が、前記凍結乾燥した状態の上清とコラーゲン溶液とを合わせる工程を包含する、請求項16に記載の方法。

18. 前記B) 工程が、

前記濃縮した上清とヒドロキシアパタイトとを接触させる工程を包含する、請求項16に記載の方法。

5 19. 前記生体適合性を有する足場が、ゲル状足場および3次元状足場からなる群より選択される、請求項12に記載の方法。

10 20. 前記生体適合性を有する足場が、ヒドロキシアパタイト、コラーゲン、アルギン酸、およびラミニンとコラーゲンIVとエンタクチンとの混合物、ならびにそれらの組合せからなる群より選択される物質を含む、請求項19に記載の方法。

15 21. 生体内の骨形成を促進または誘発するための方法であって、該方法は、誘導骨芽細胞分化誘導因子と生体適合性を有する足場とを含む複合材料を、生体内の骨形成を促進または誘発する必要がある部位に移植する工程を包含する、方法。

22. 前記骨形成が、骨の欠損を修復または治療するためのものである、請求項21に記載の方法。

20 23. 前記欠損は、固定のみでは修復できない大きさを有する、請求項22に記載の方法。

24. 前記骨形成が、周辺に骨がない部位に骨を形成させるためのものである、請求項21に記載の方法。

25

25. A) 肥大化能を有する軟骨細胞、および

B) アルギン酸

を含む、生体内の骨形成を促進または誘発するための複合材料。

26. A) 肥大化能を有する軟骨細胞、および

5 B) ラミニンとコラーゲン I V とエンタクチンとの混合物

を含む、生体内の骨形成を促進または誘発するための複合材料。

図 1A

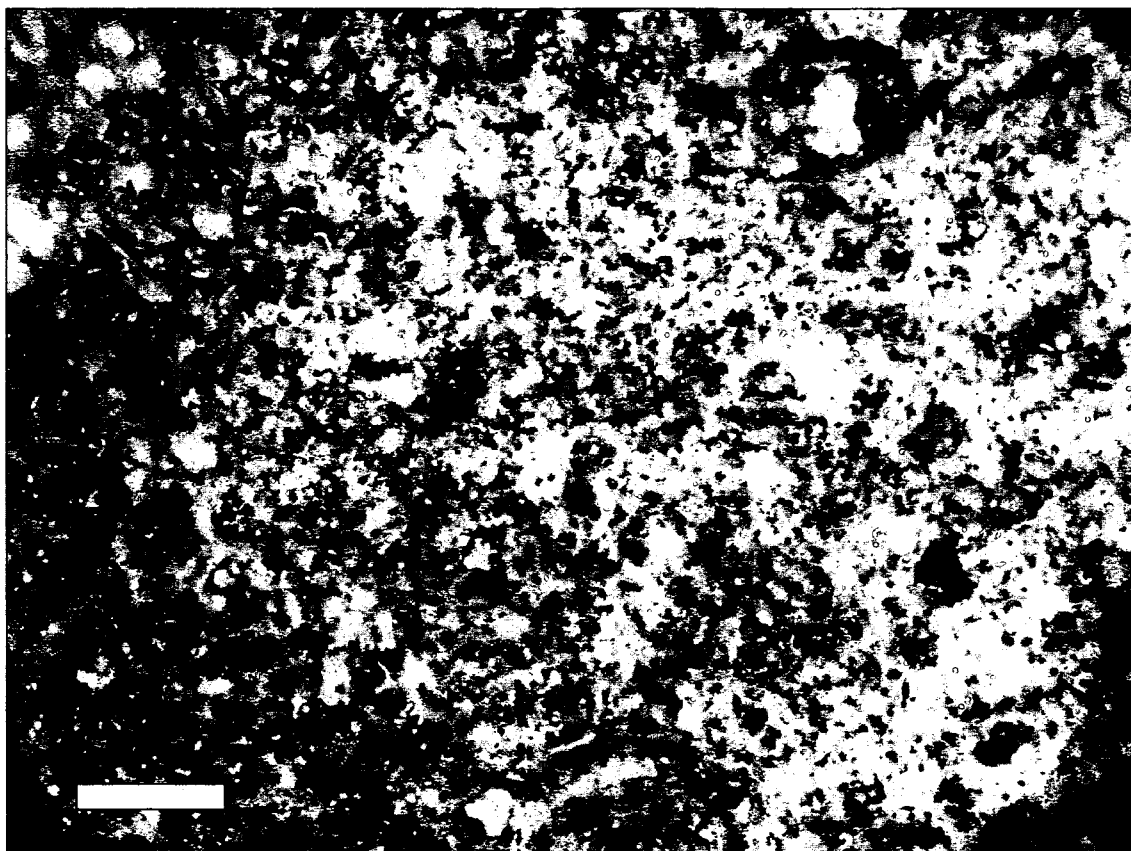


図 1B

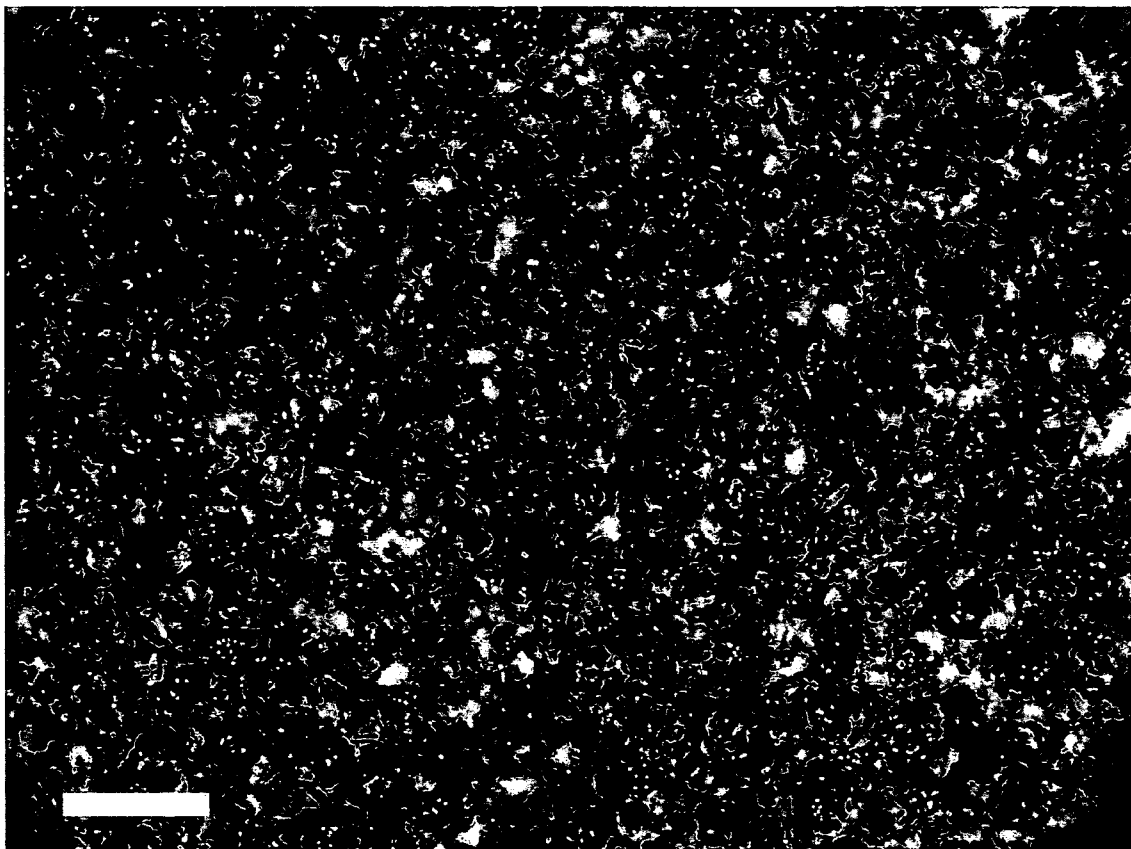


図 1C

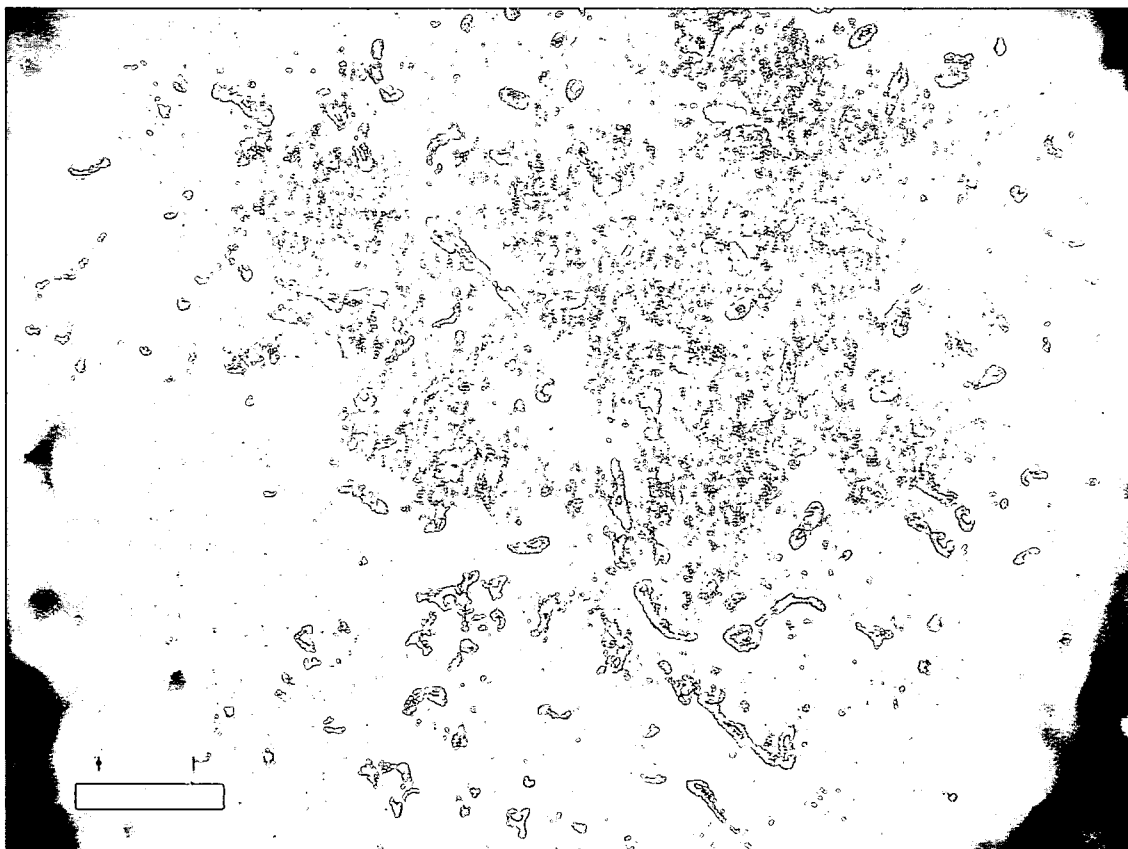


図 1D

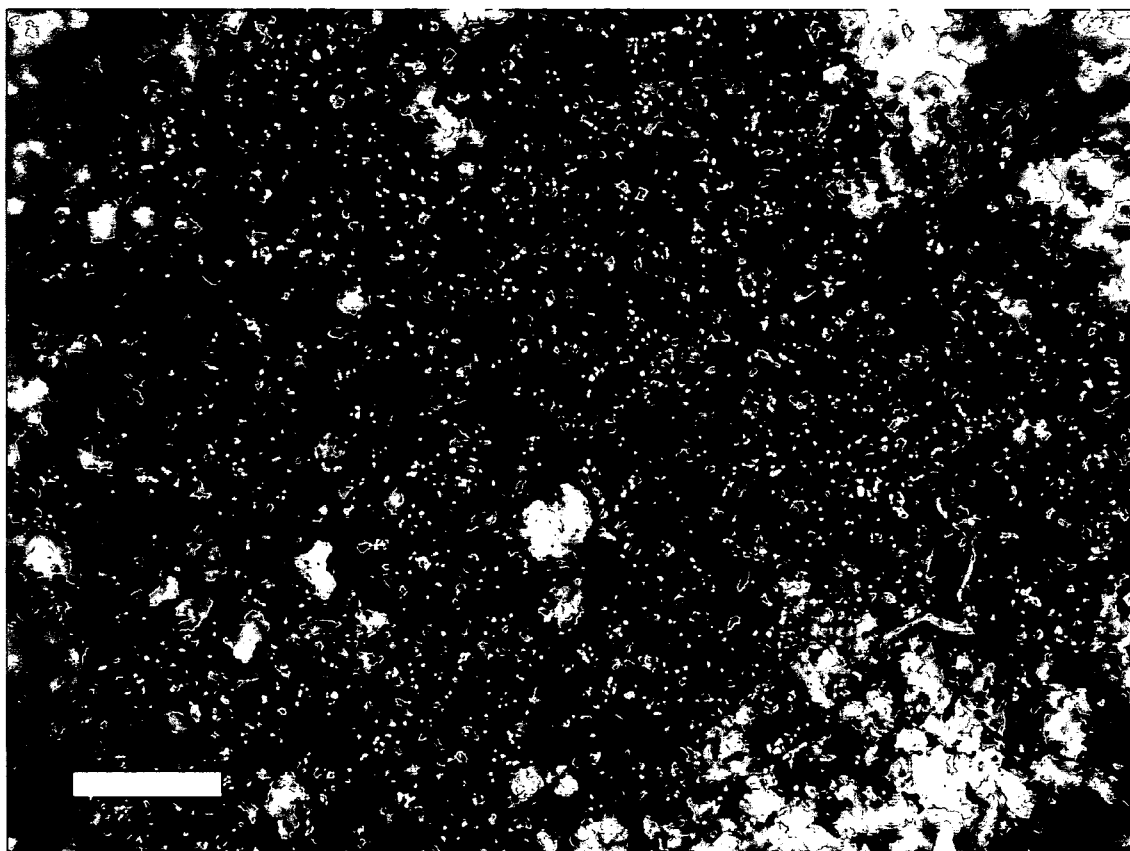


図 1E

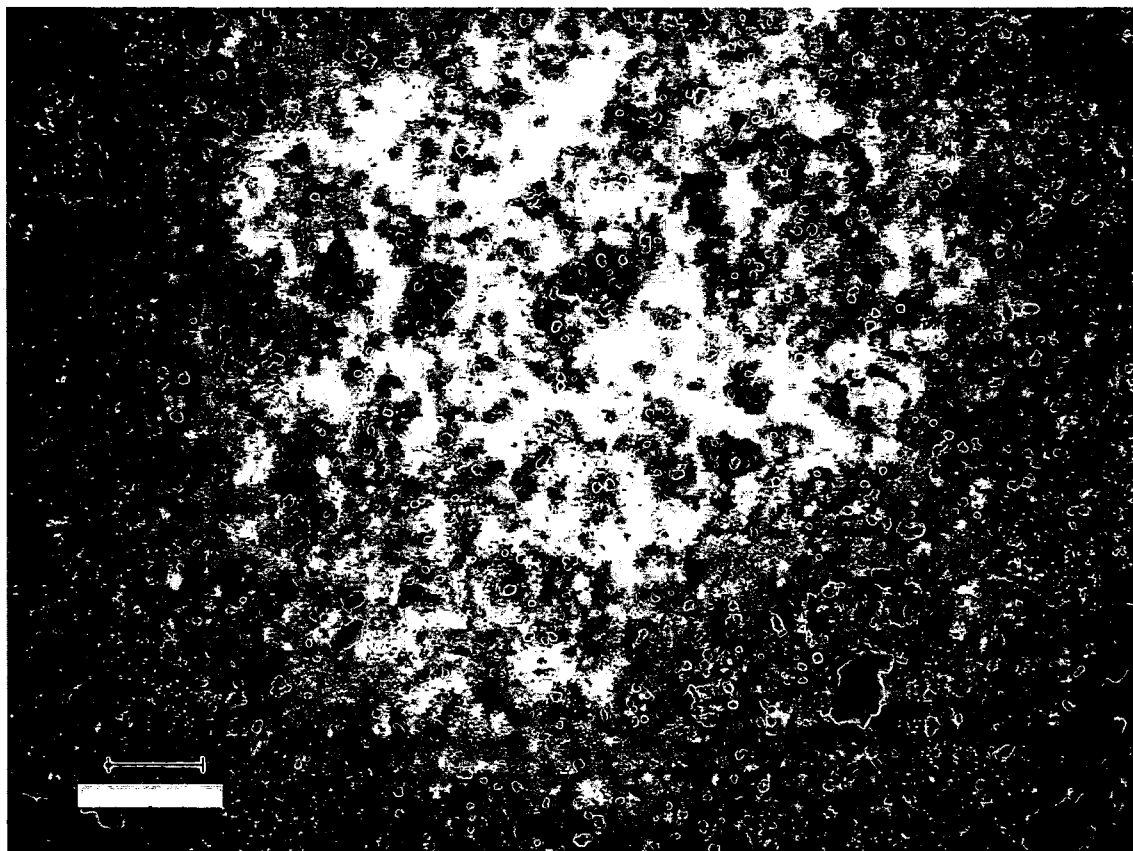


図 1F

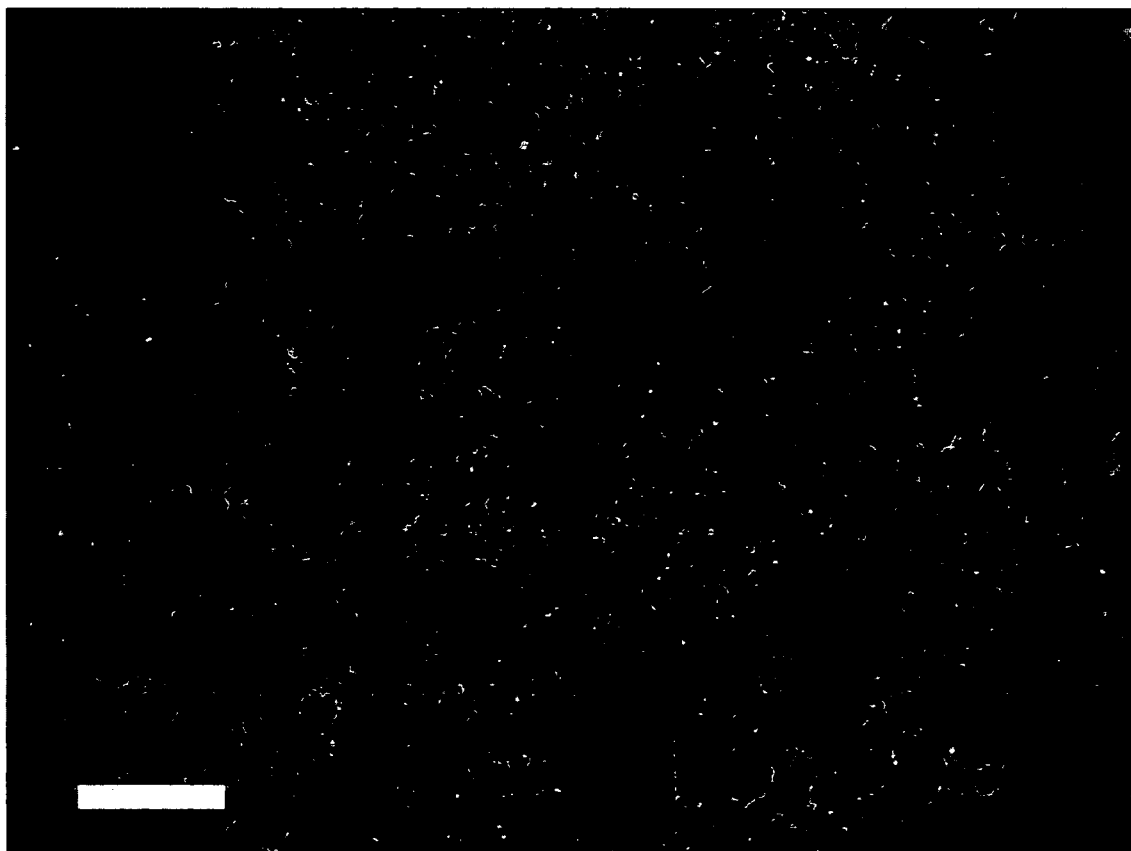


図 2

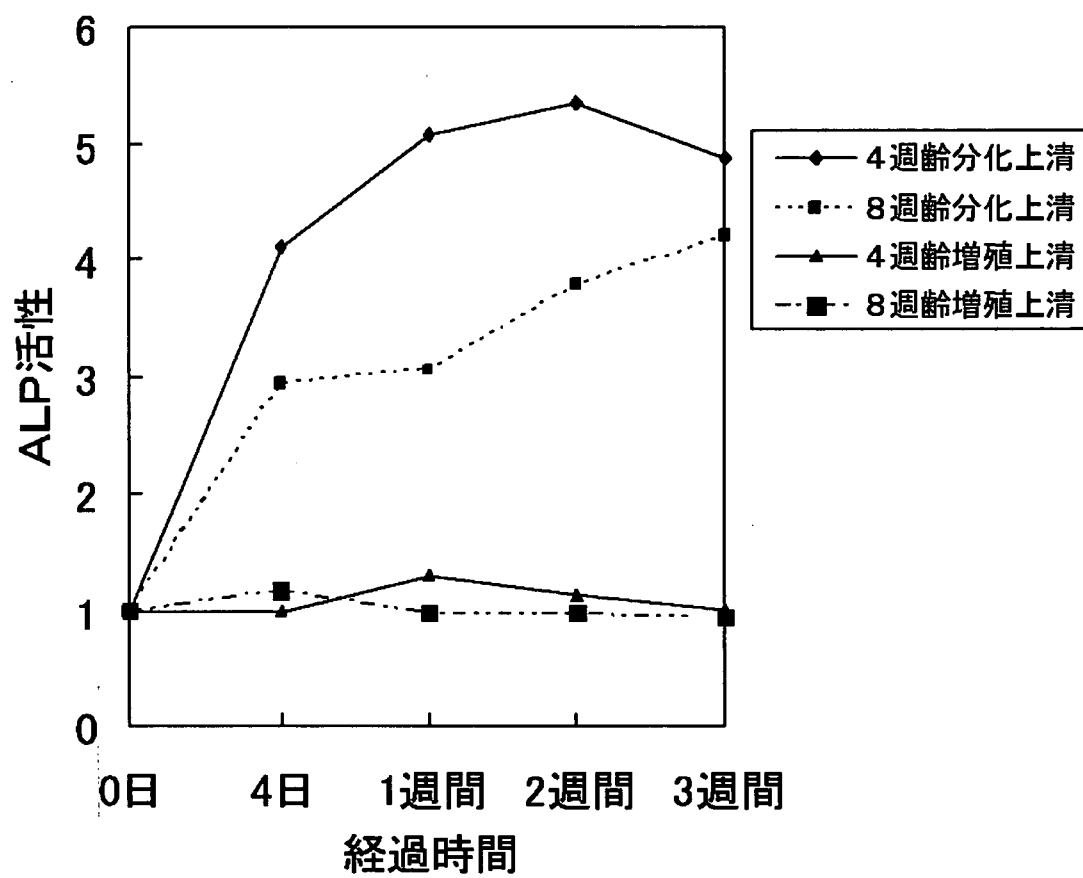


図 3A

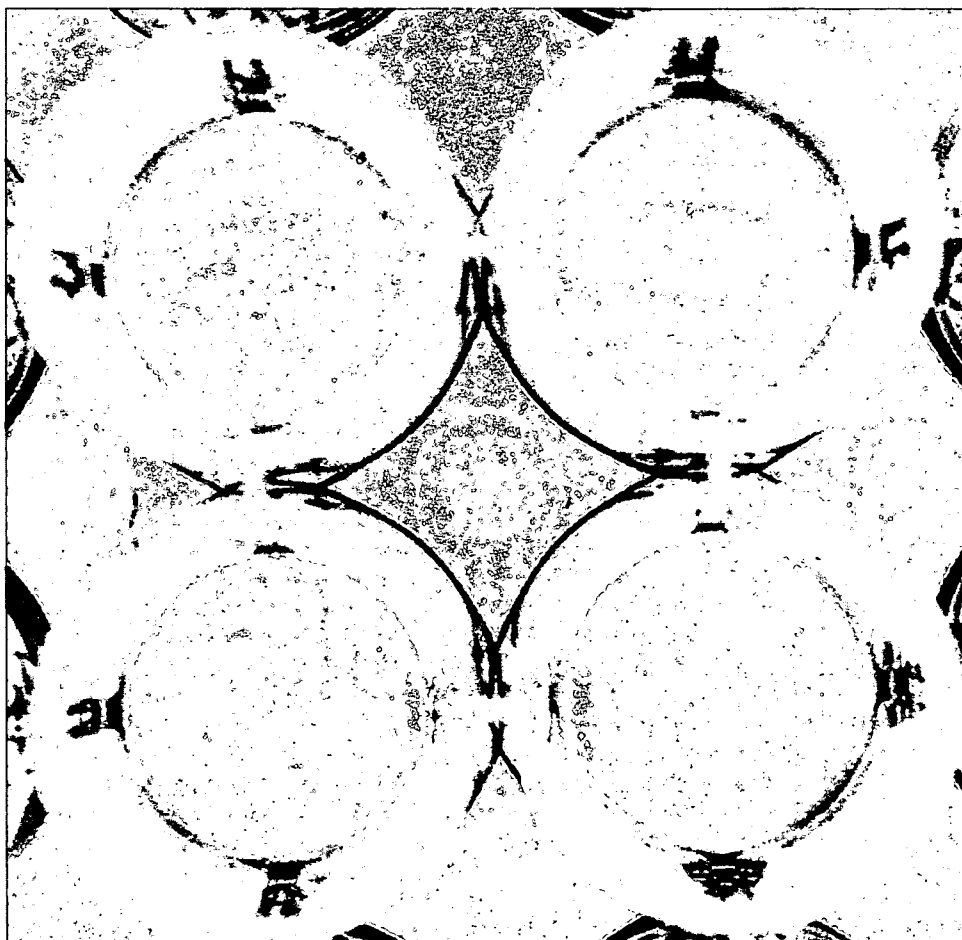


図 3B

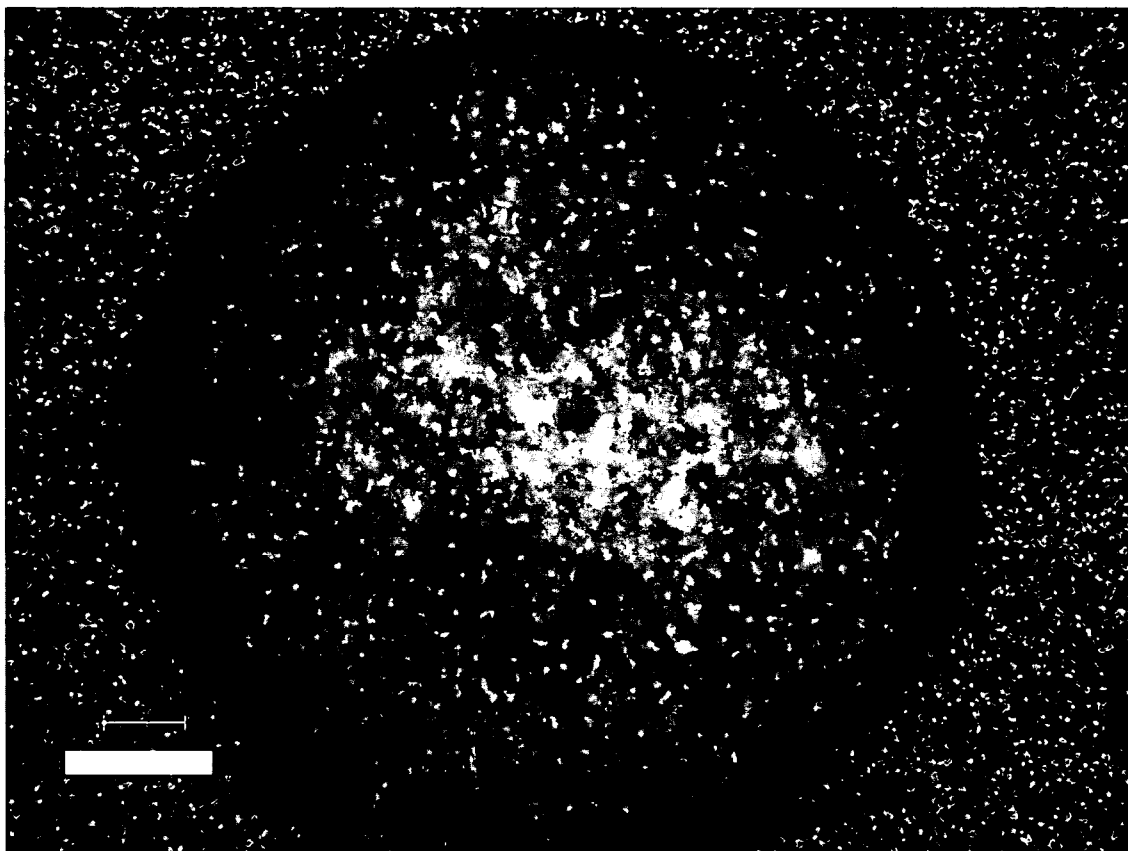


図 3C

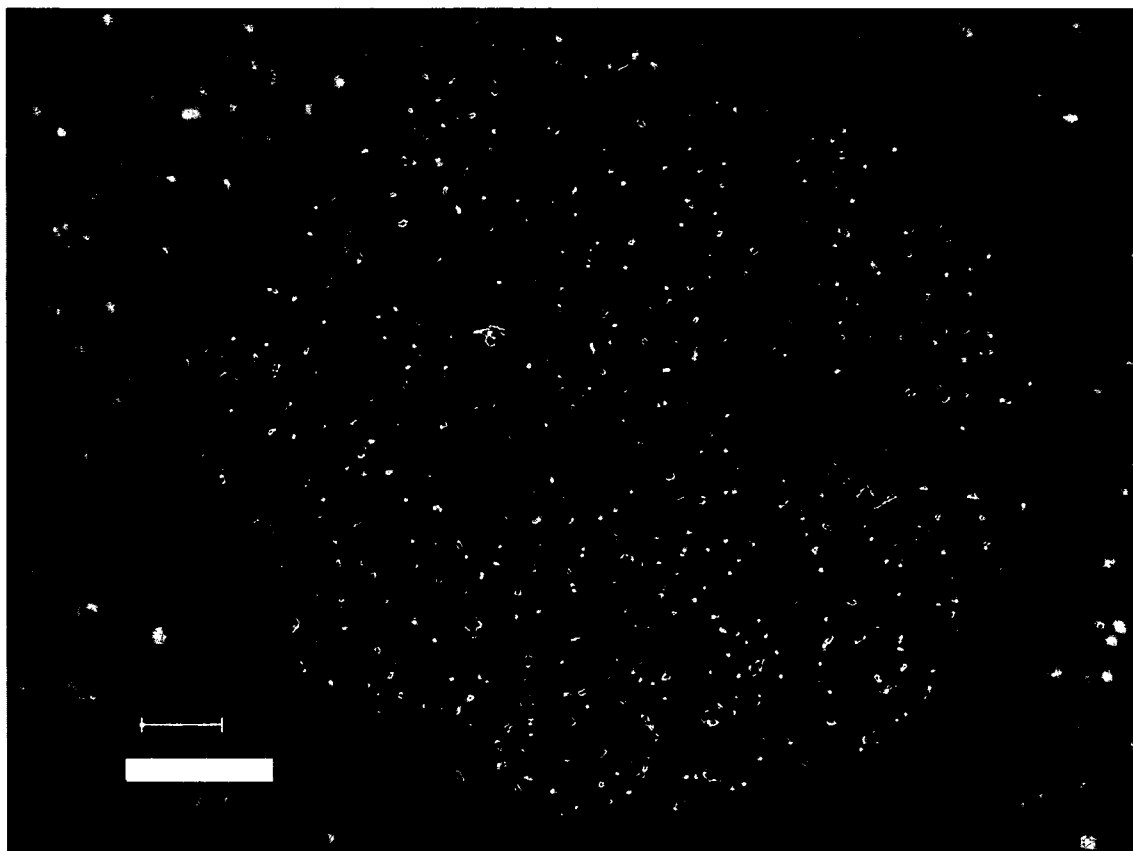


図 3D

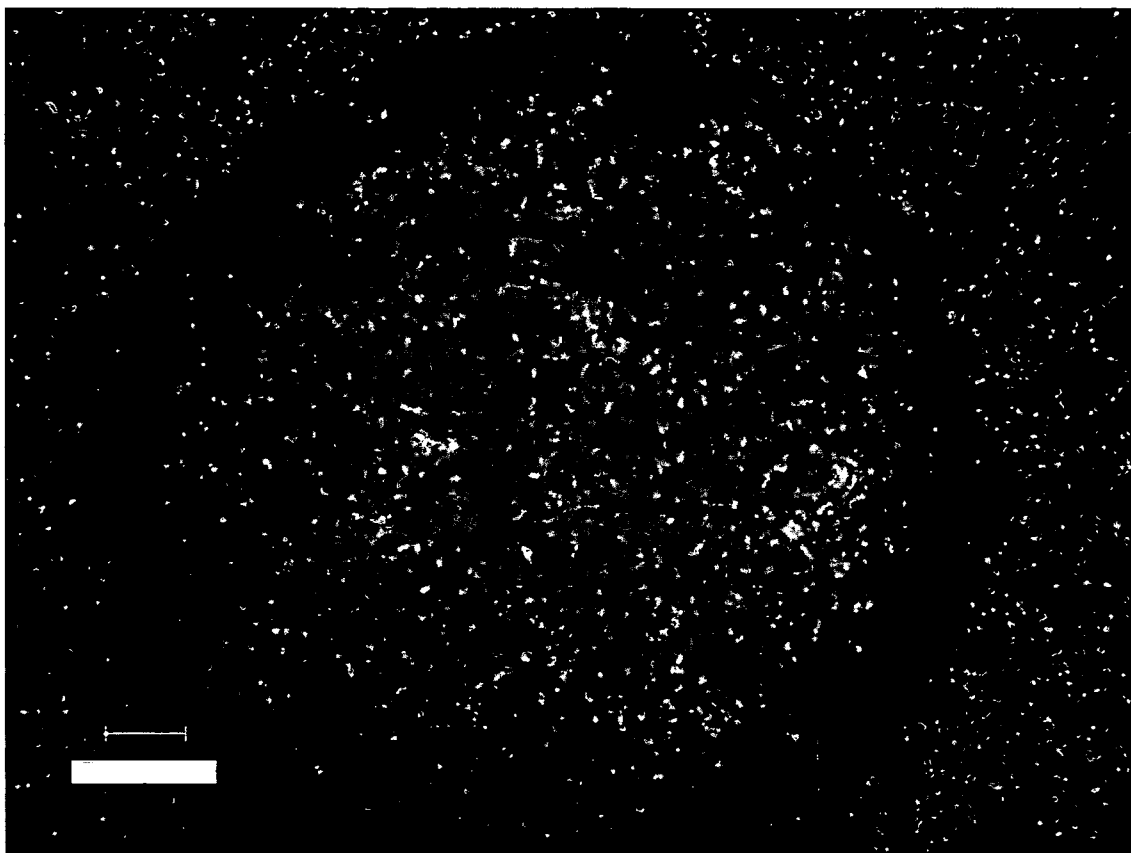


図 3E

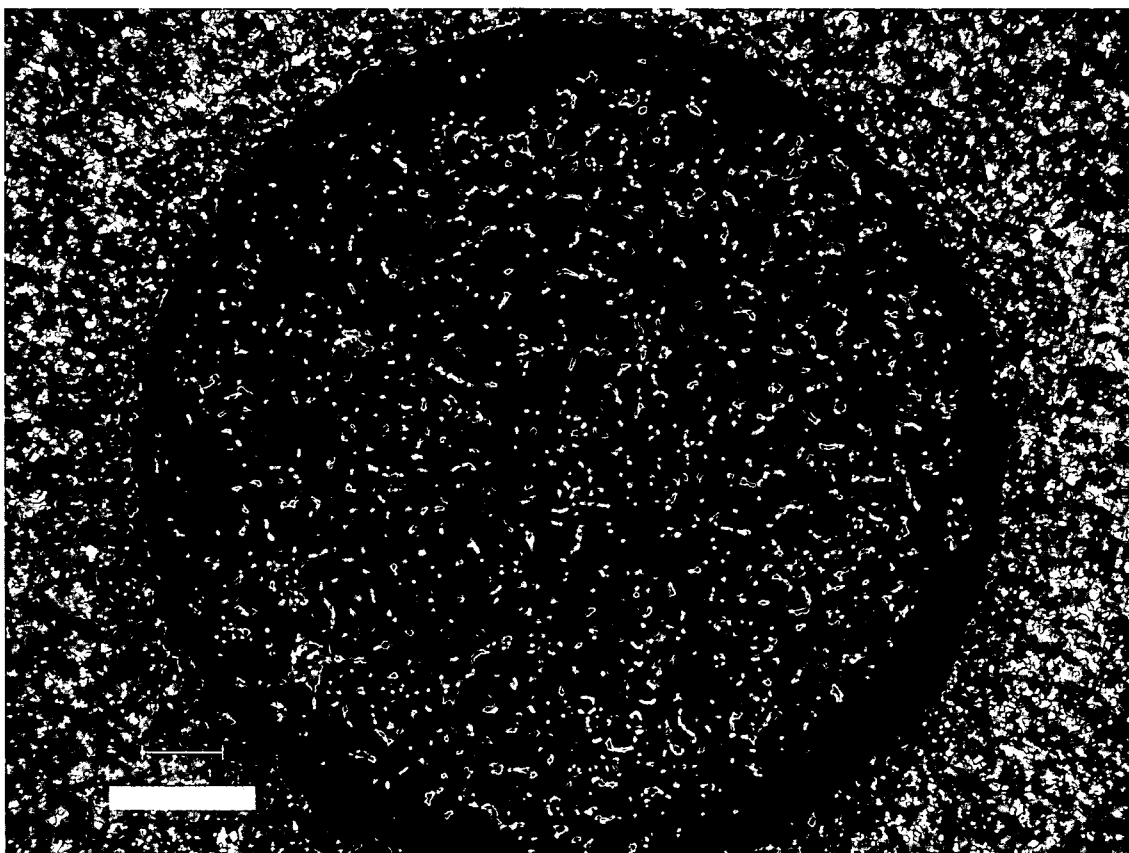


図 4

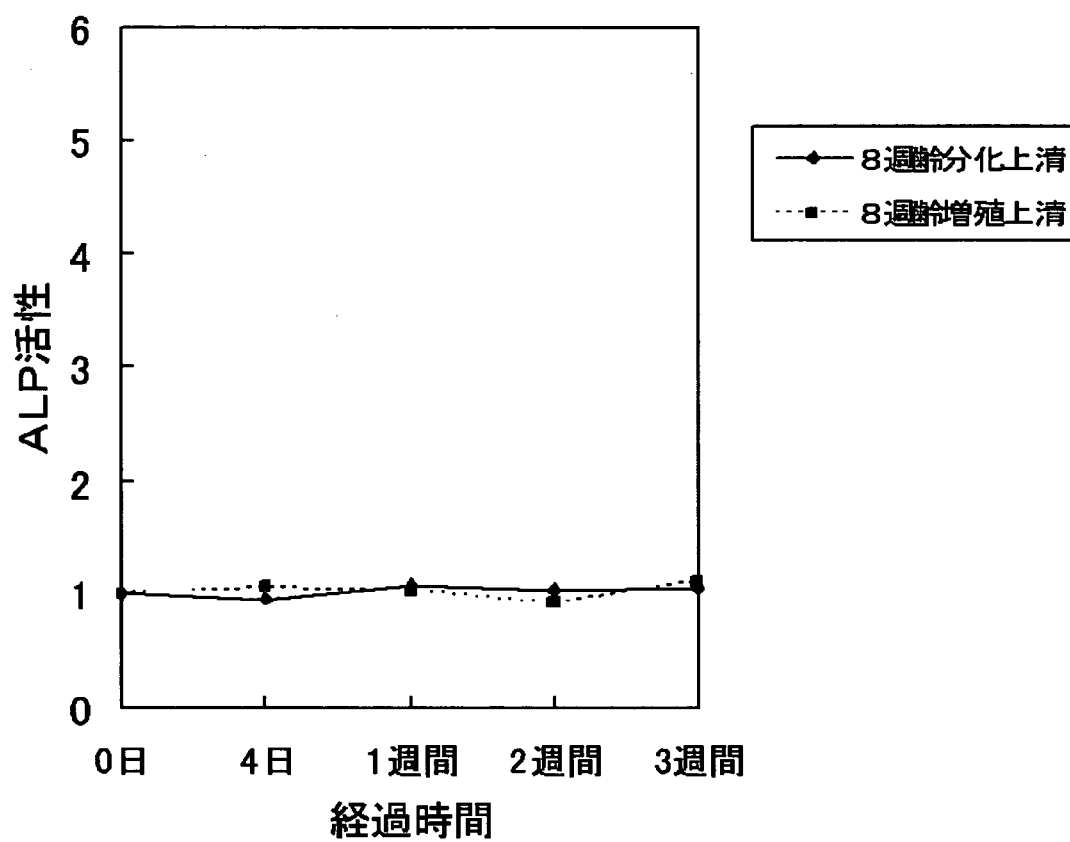


図 5A

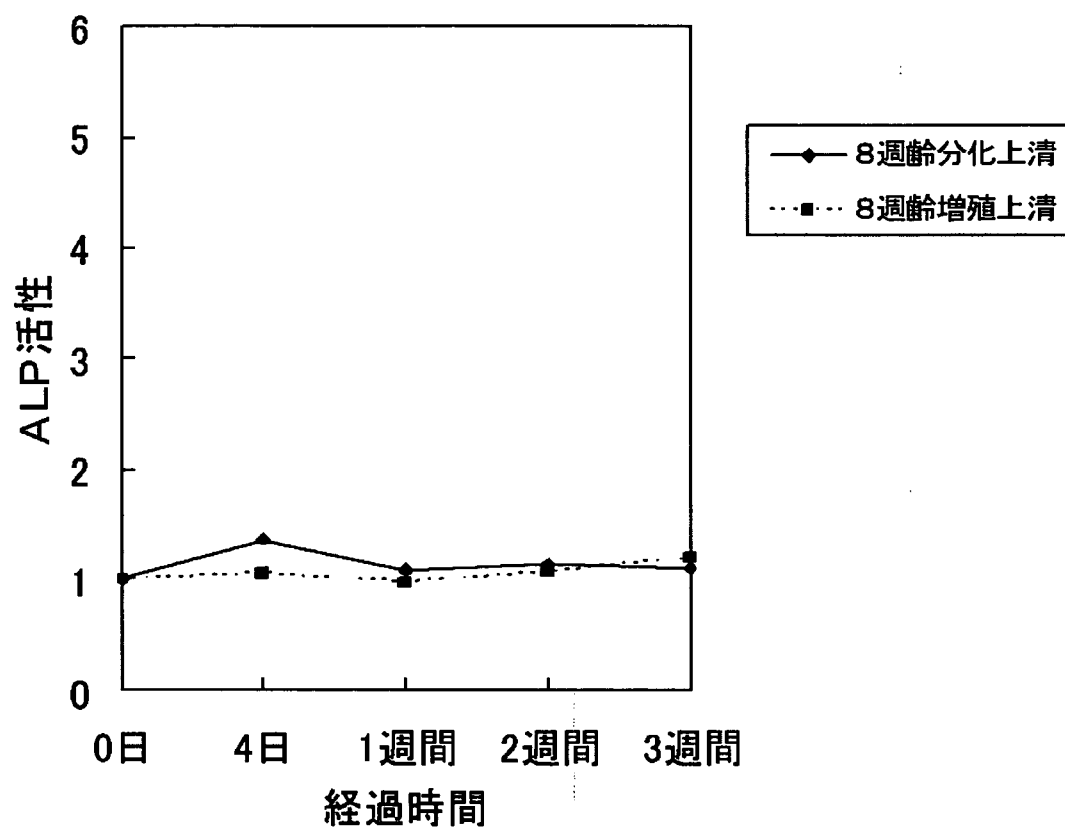


図 5B

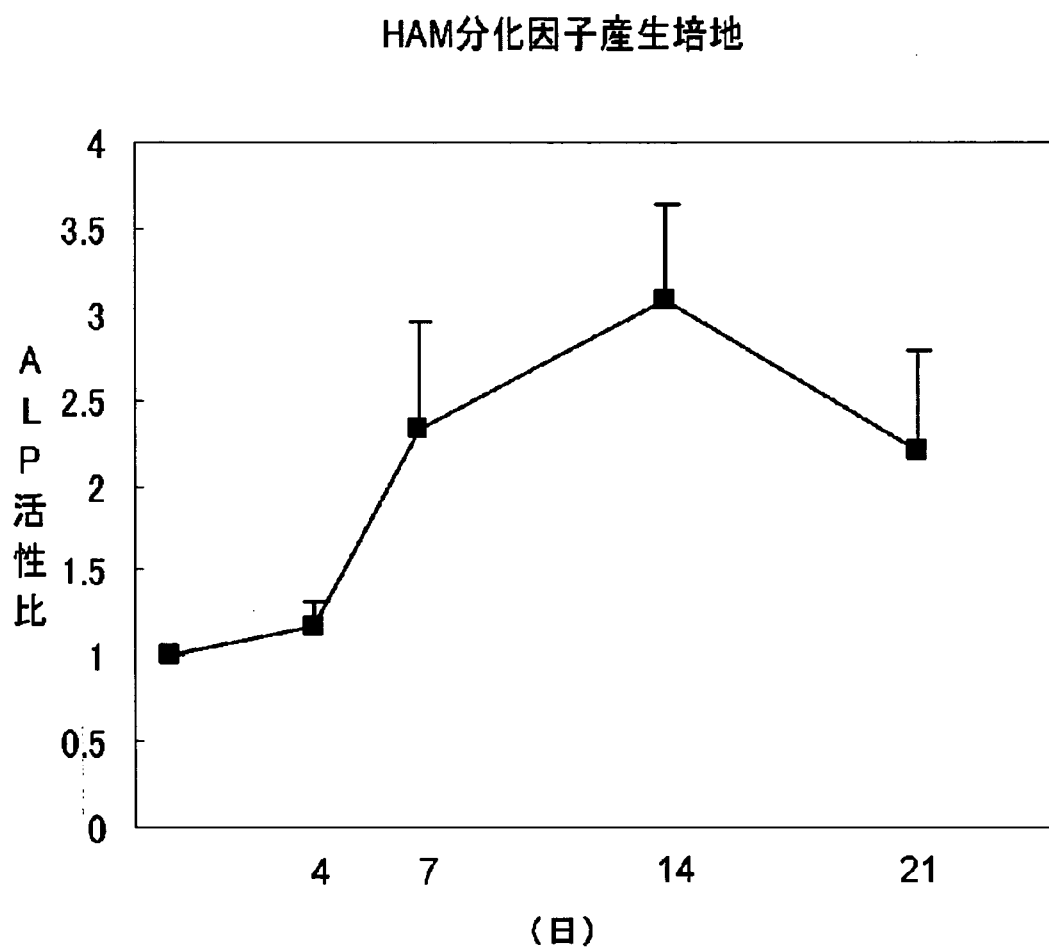


図 5C

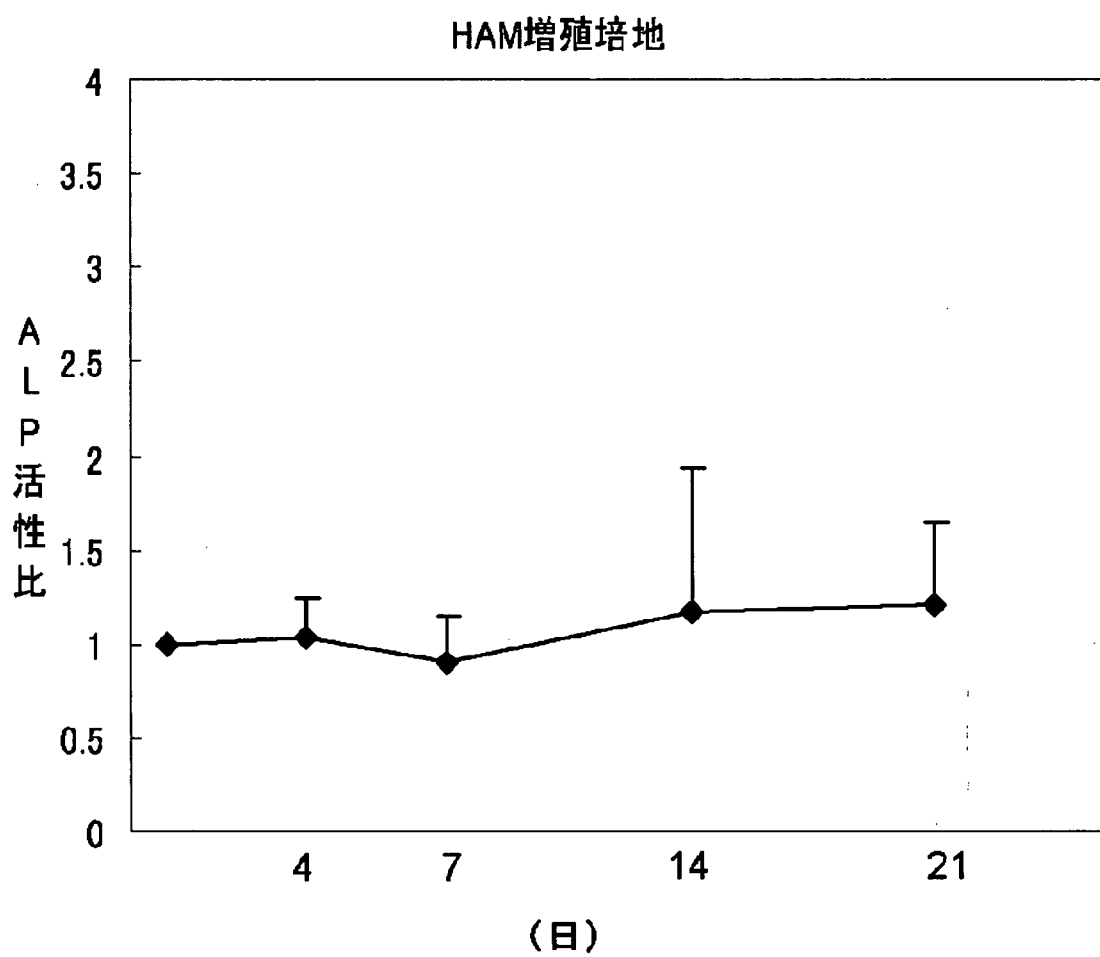
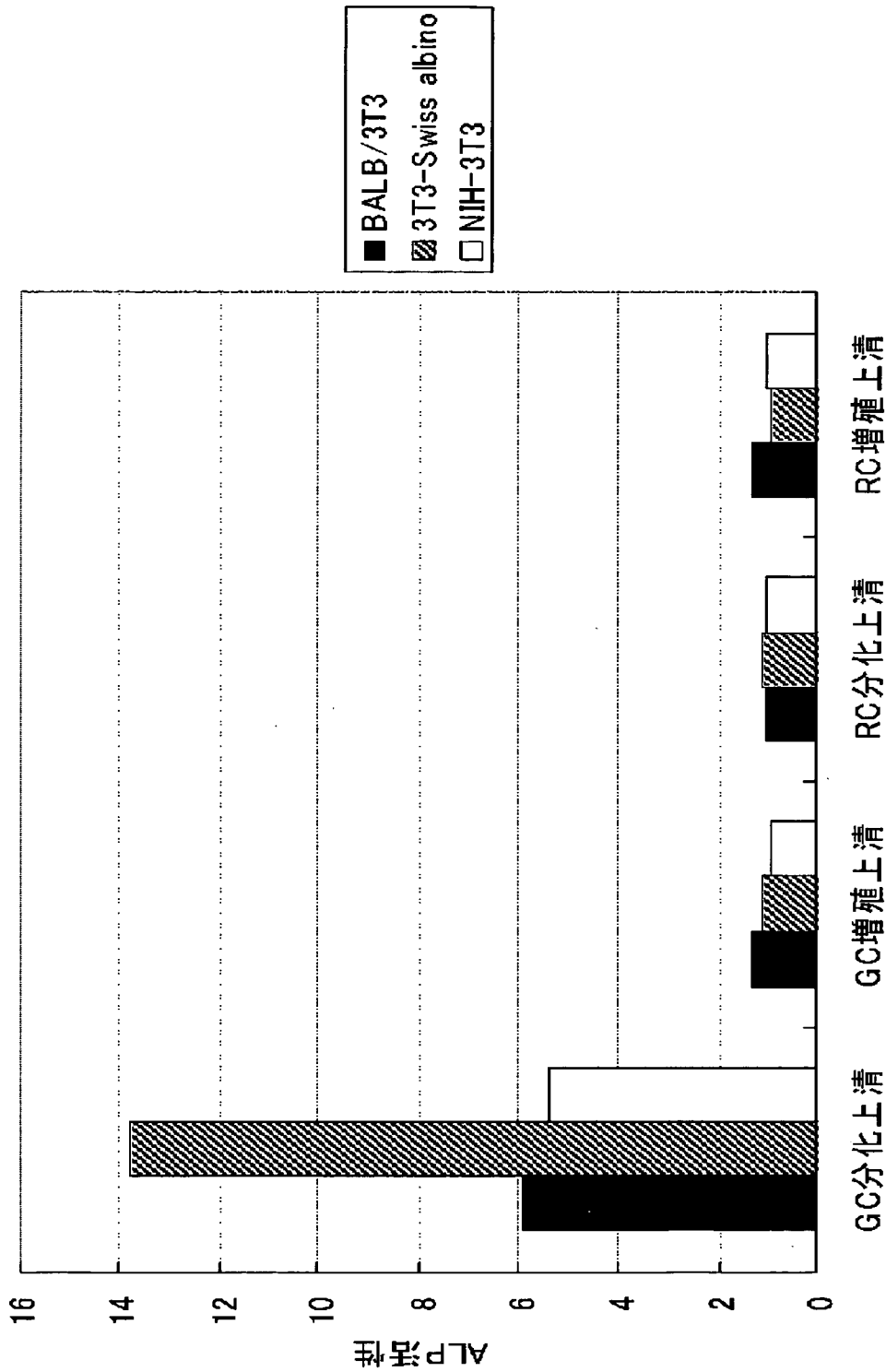


図 6A



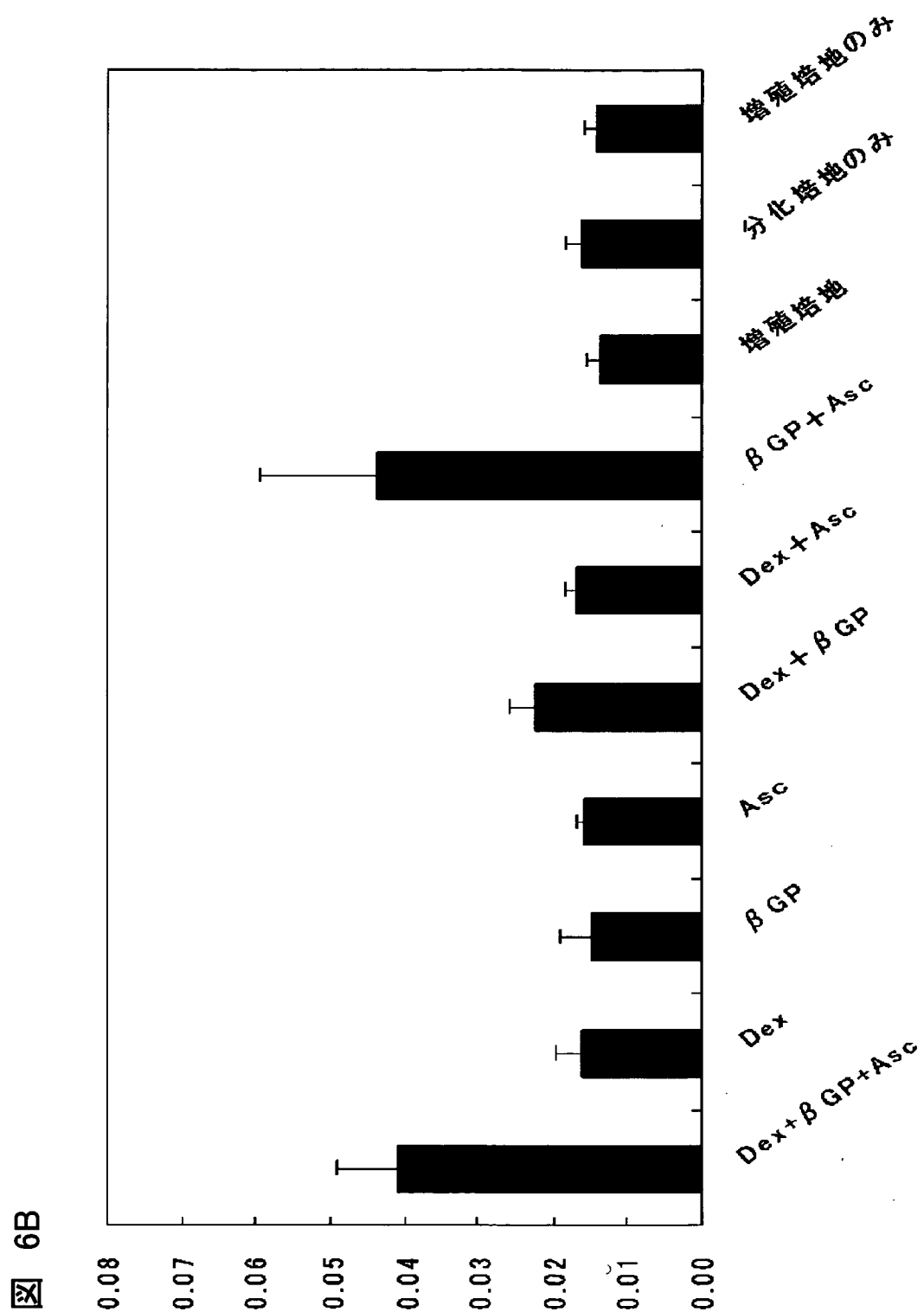


図 7A



図 7B

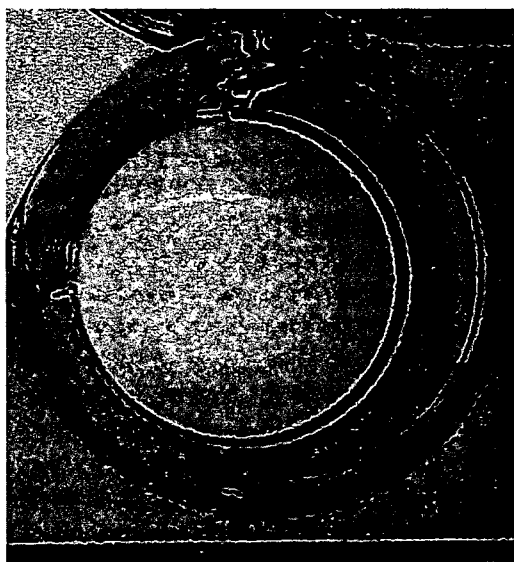


図 7C

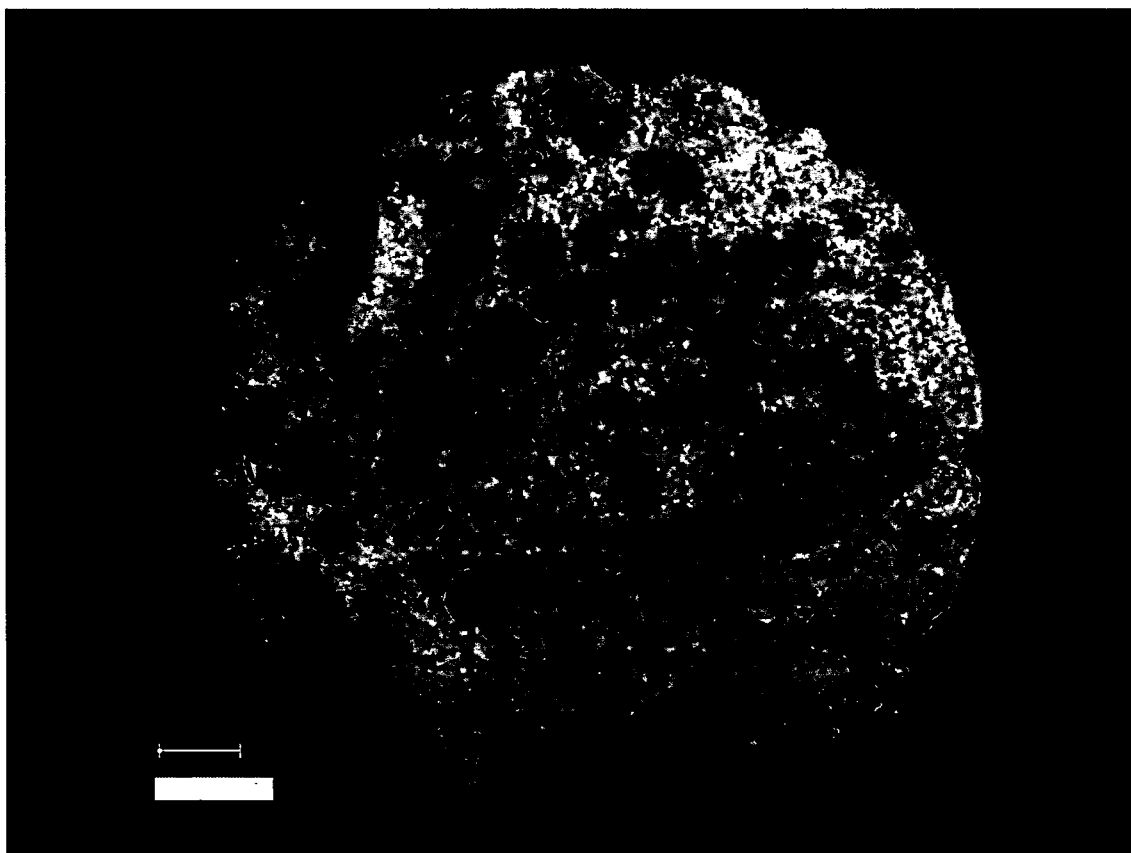


図 7D

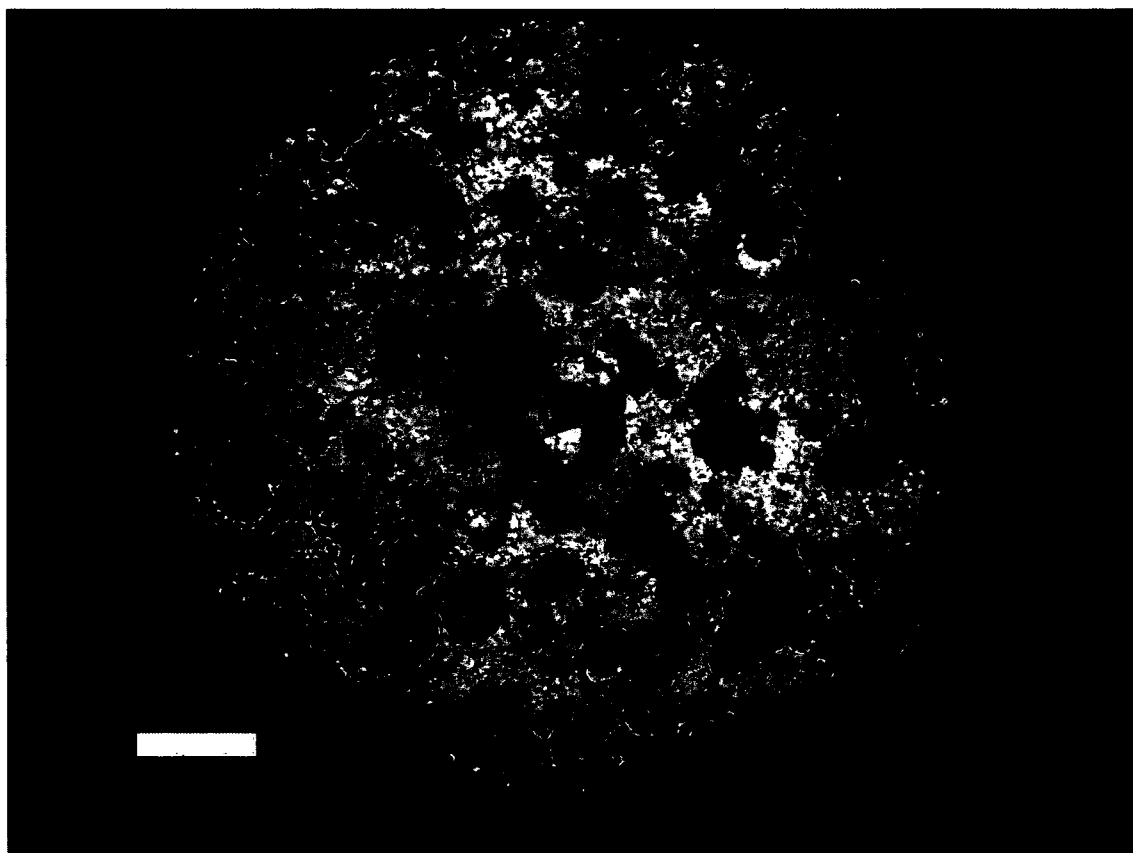


図 8

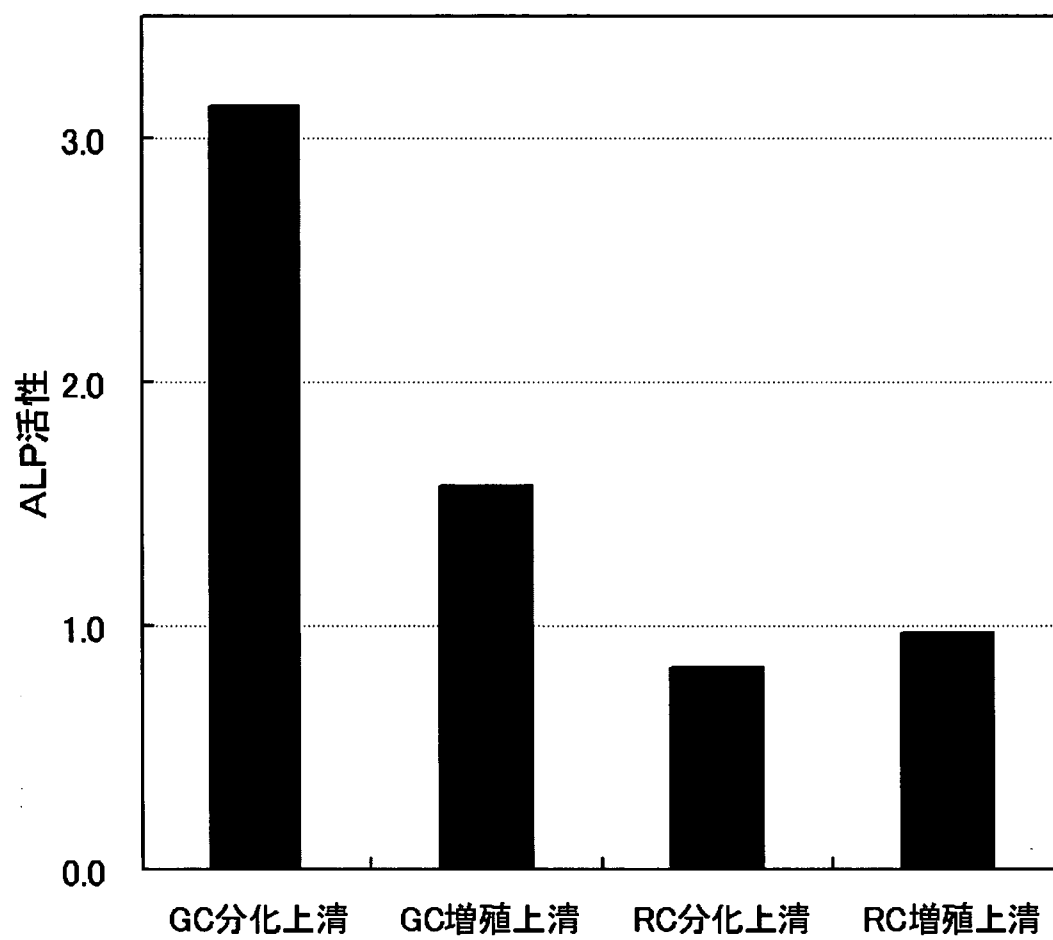


図 9

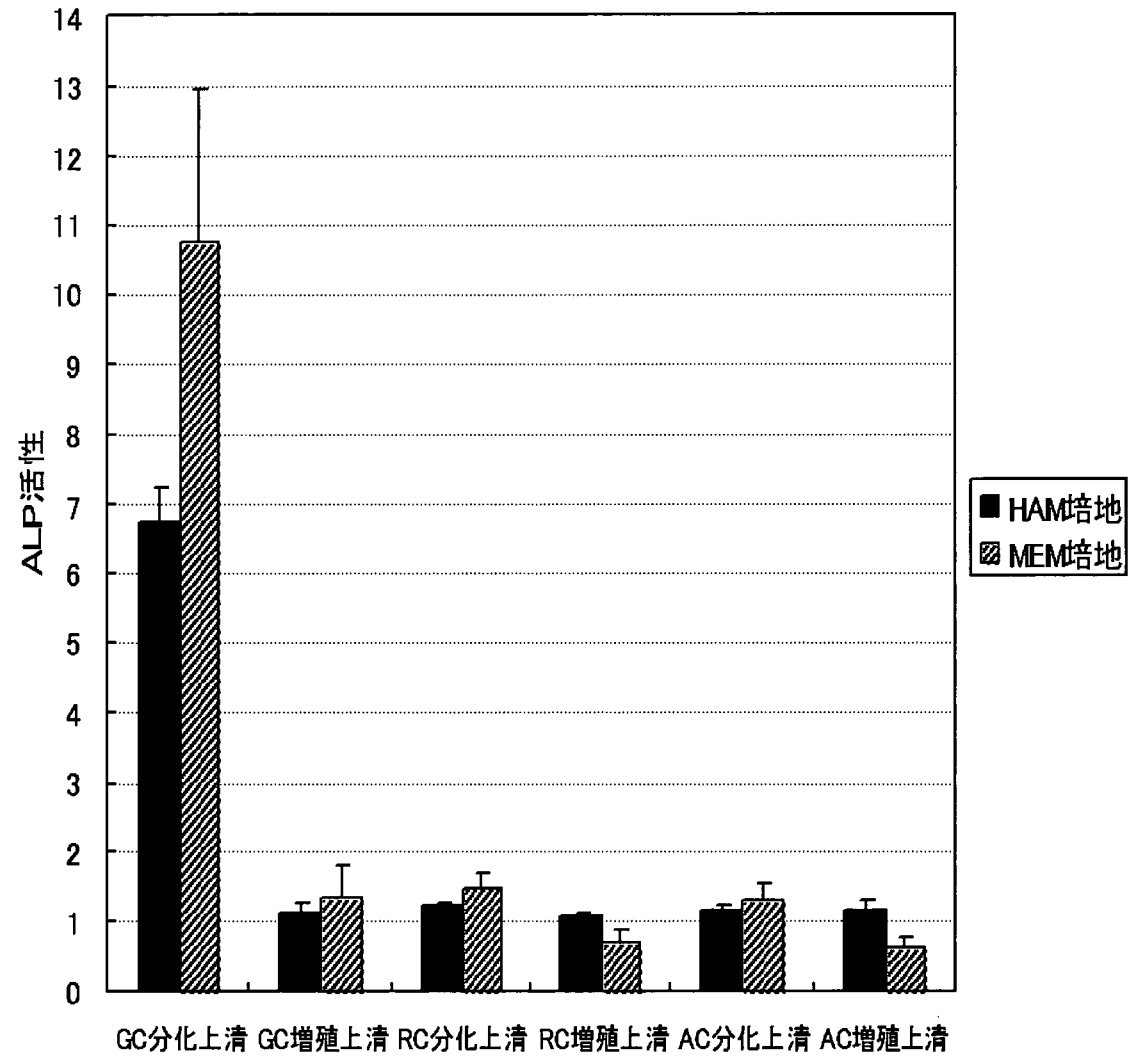


図 10

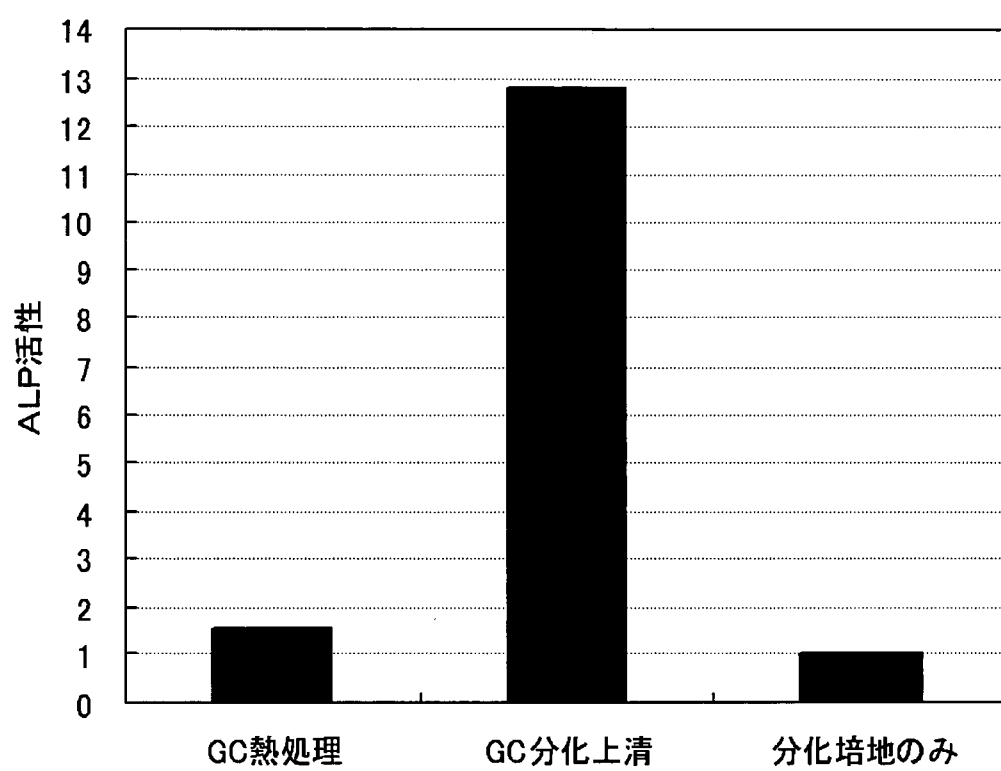


図 11A

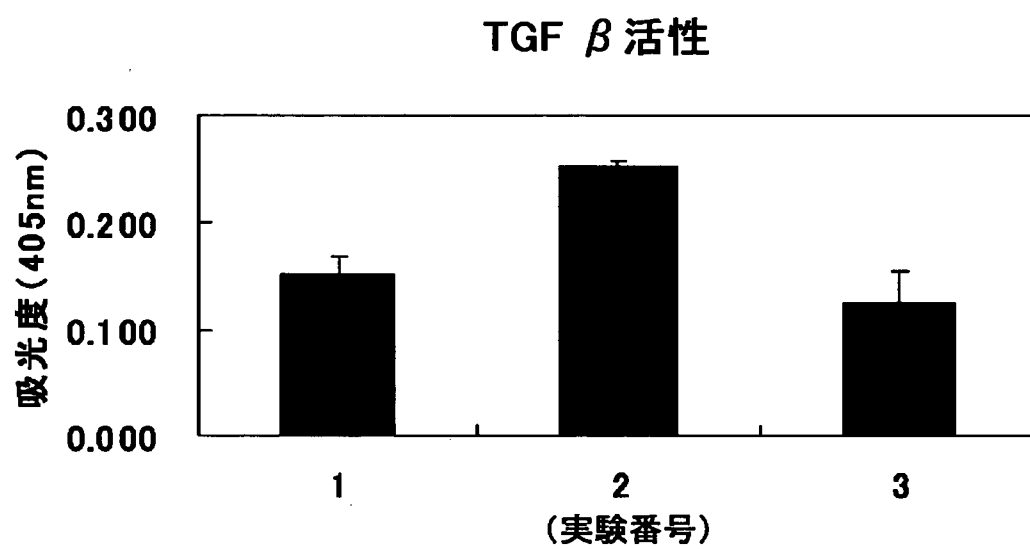


図 11B

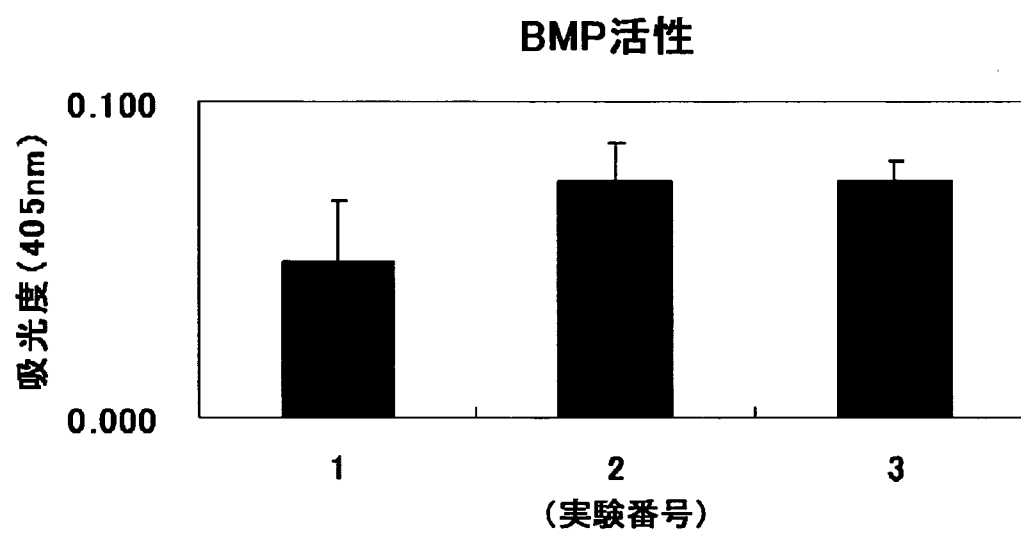


図 12

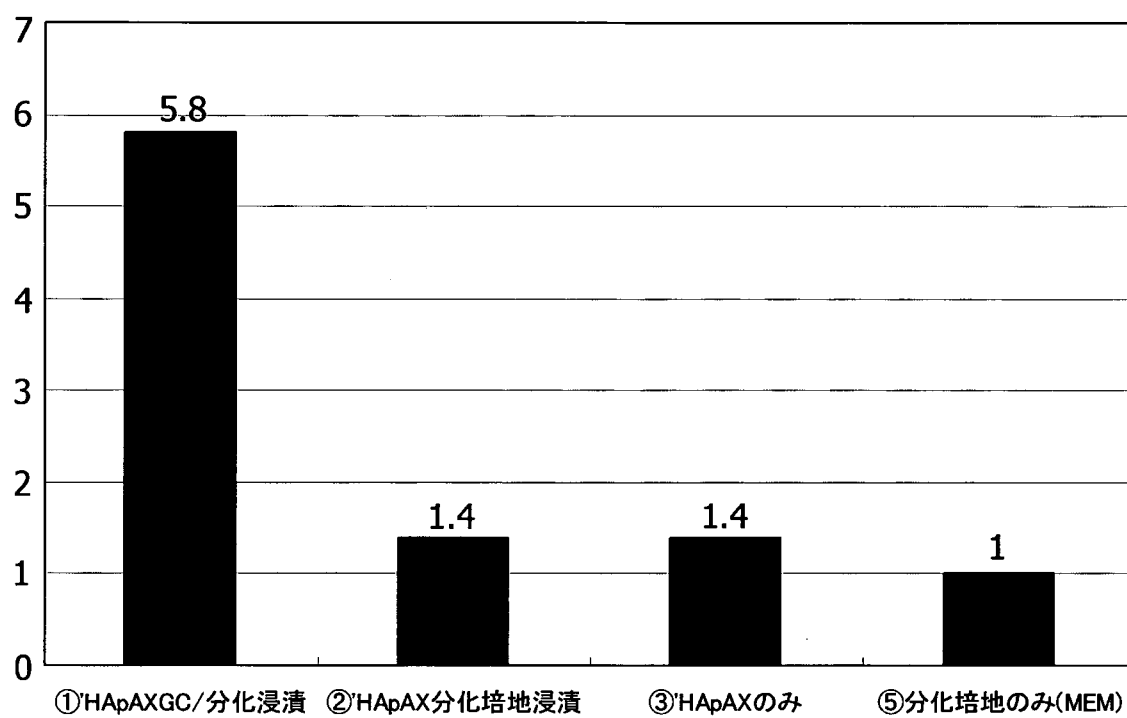


図13

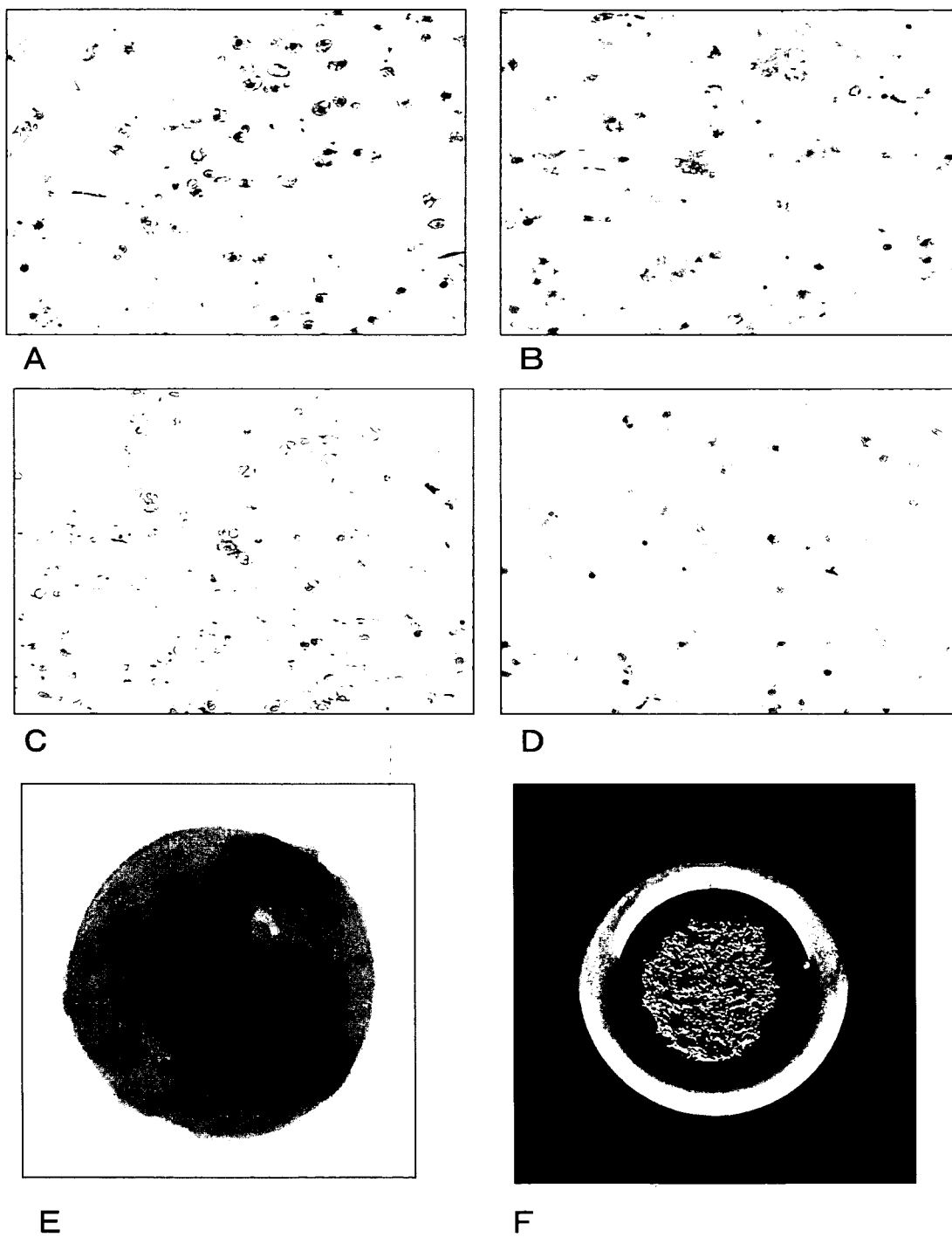


図14

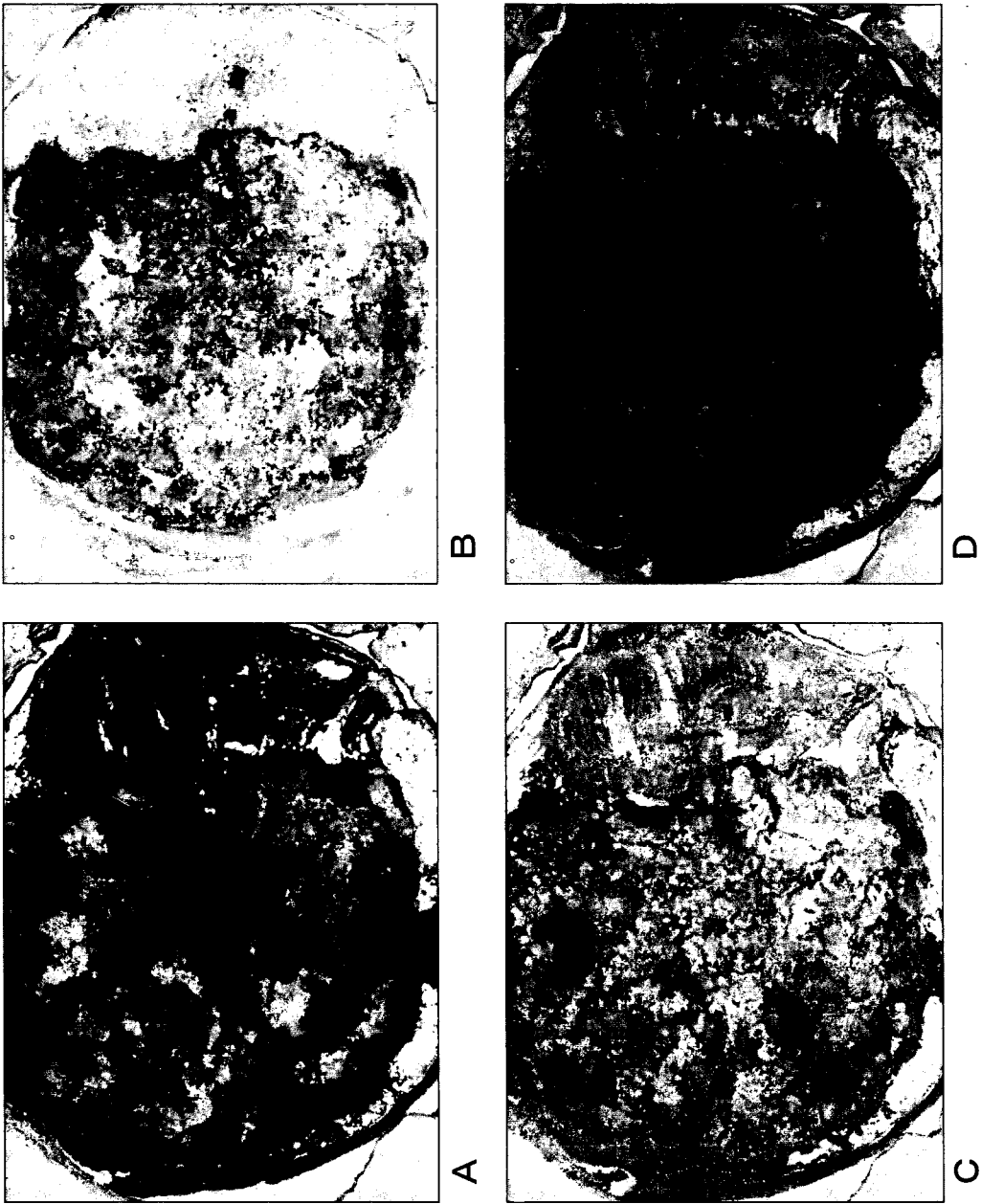


図 15

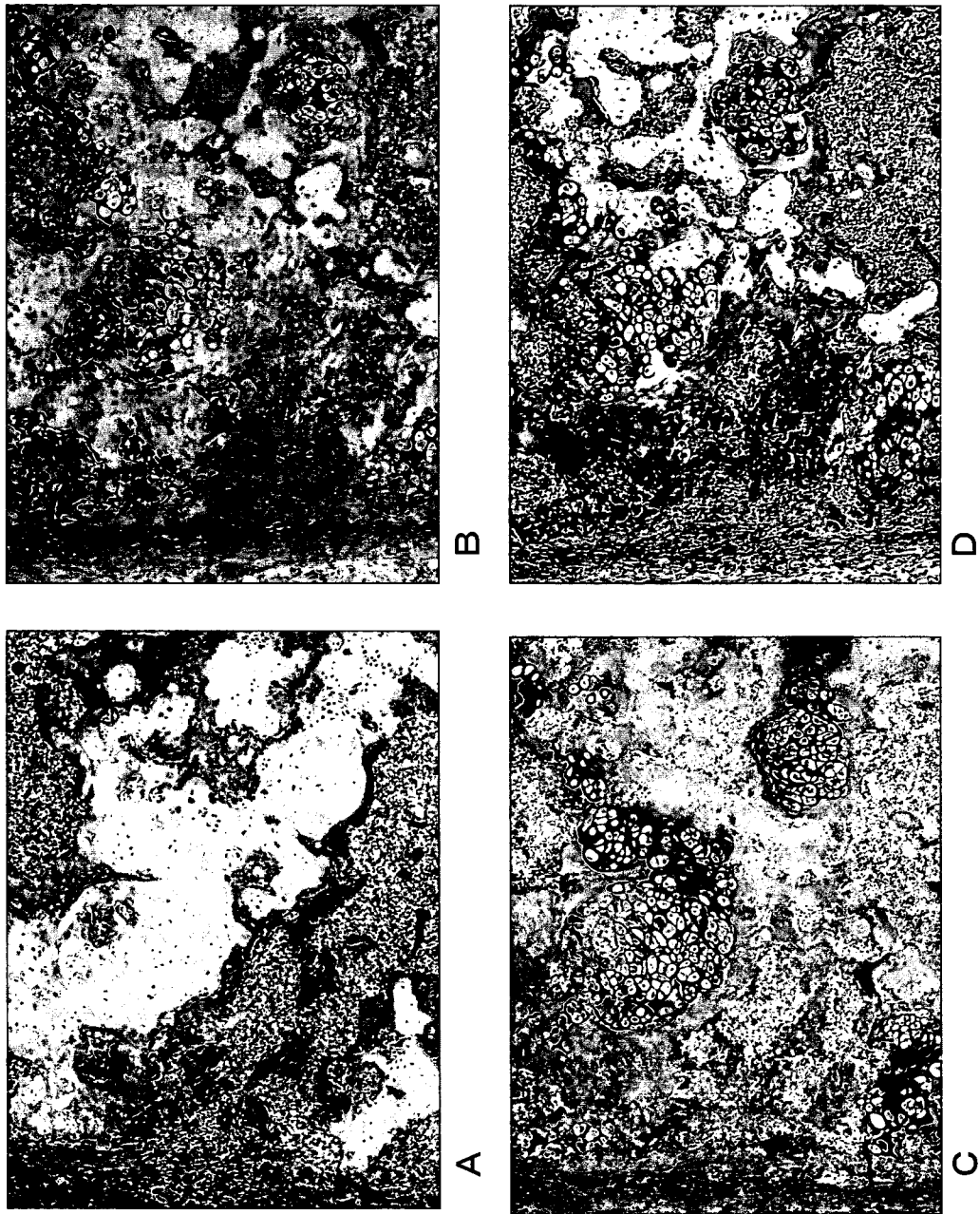
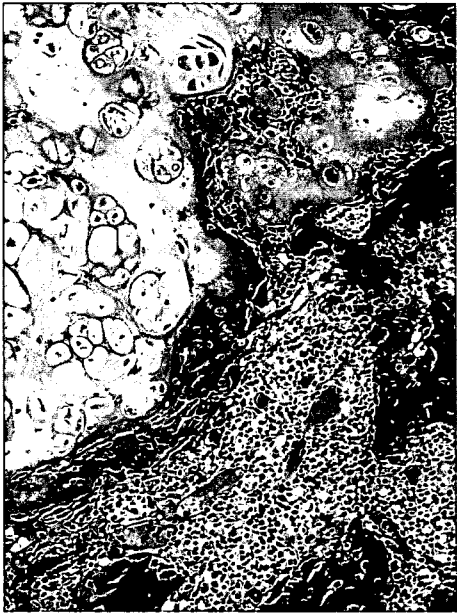


図16



A



B

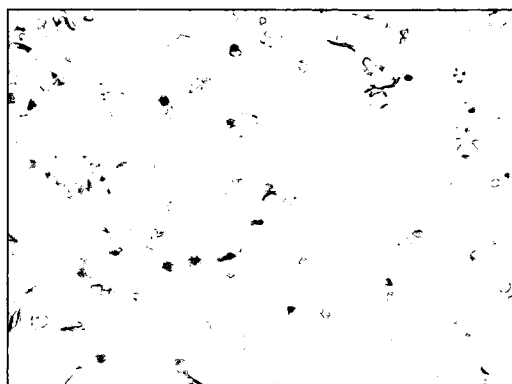


C

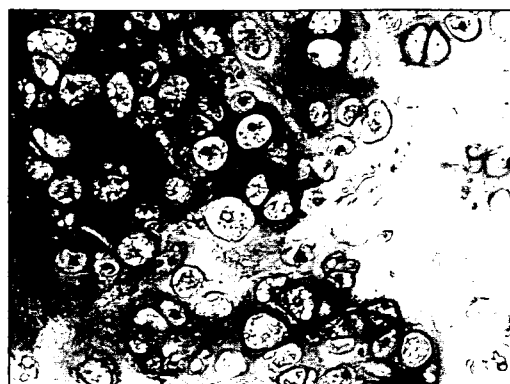


D

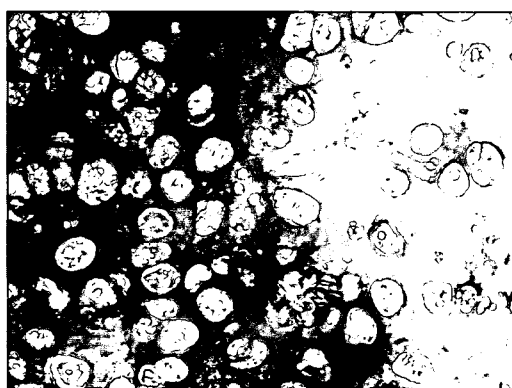
図 17



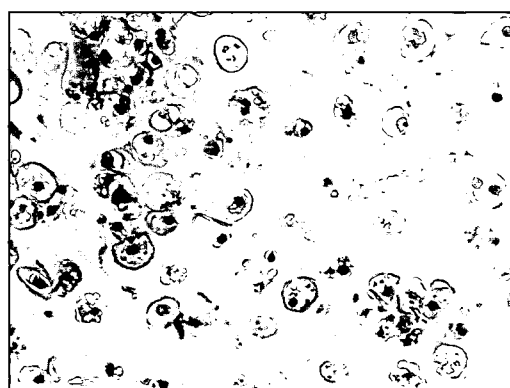
A



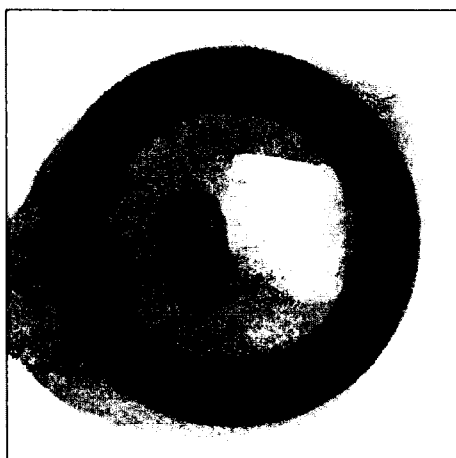
B



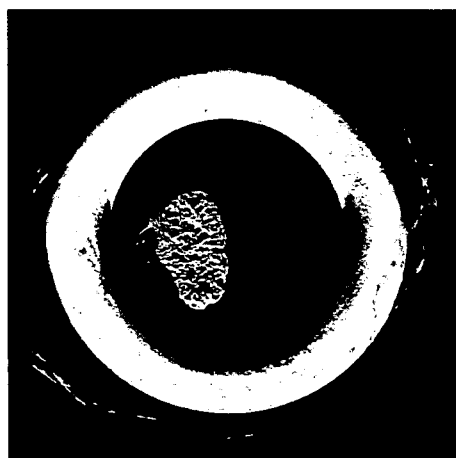
C



D

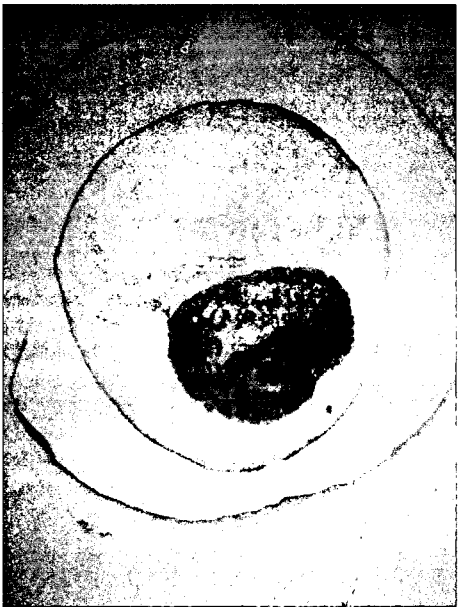


E

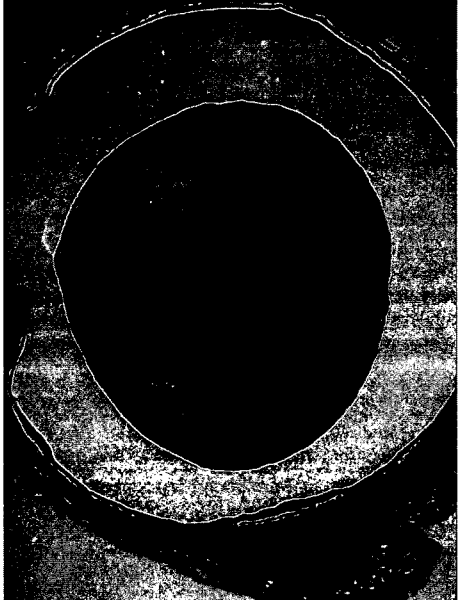


F

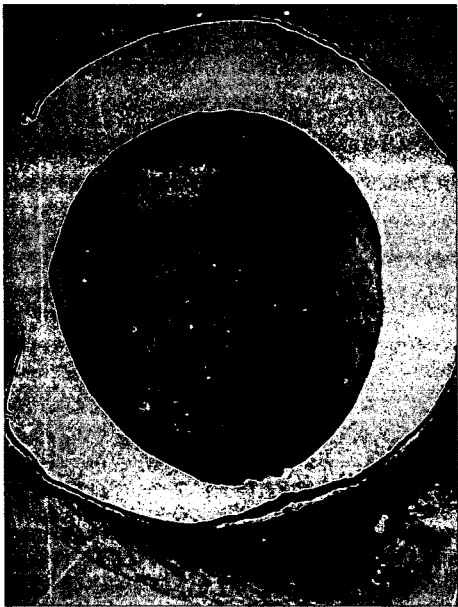
図18



B



D



A



C

図19

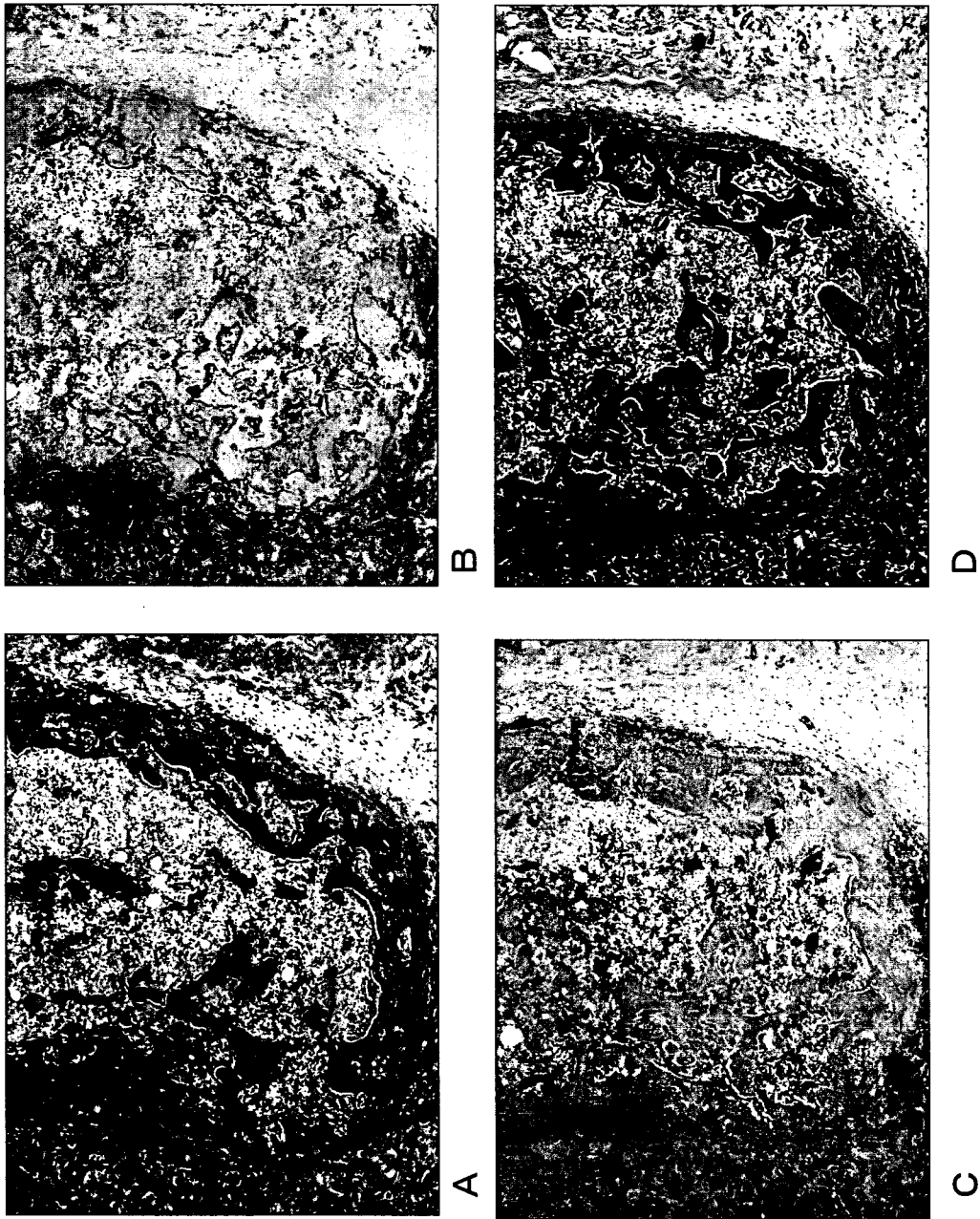


図20

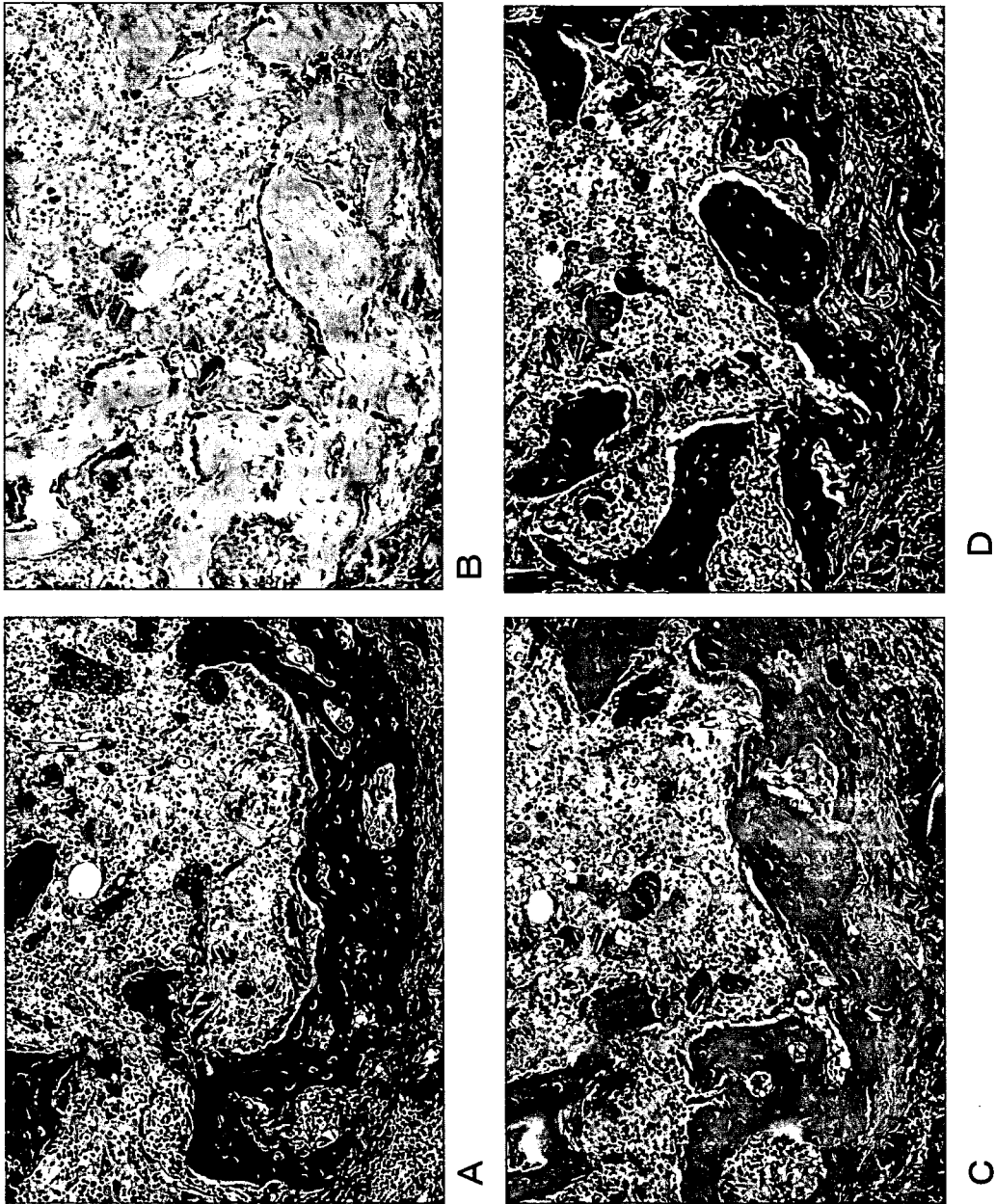
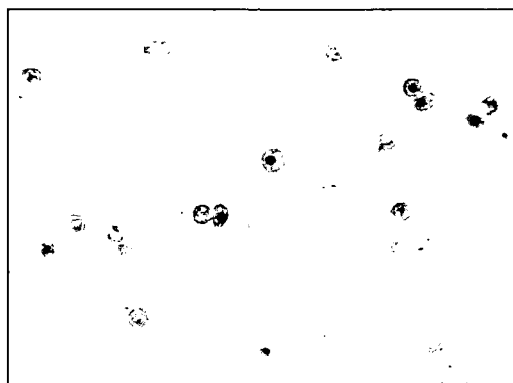


図21



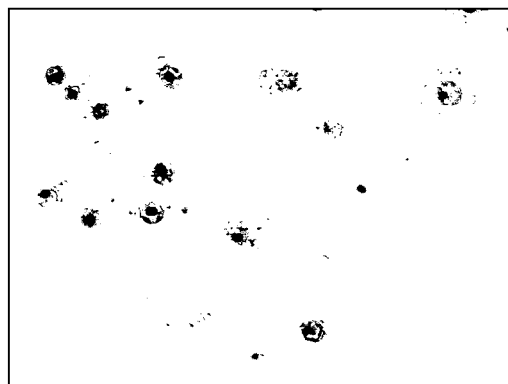
A



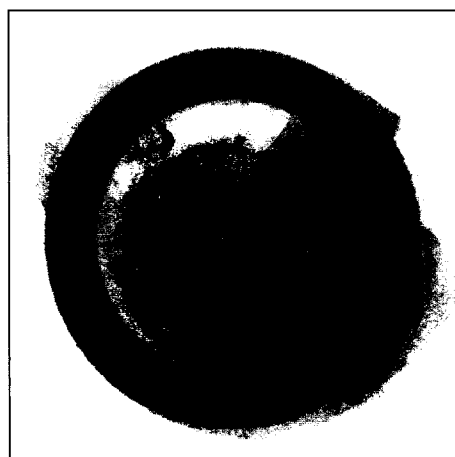
B



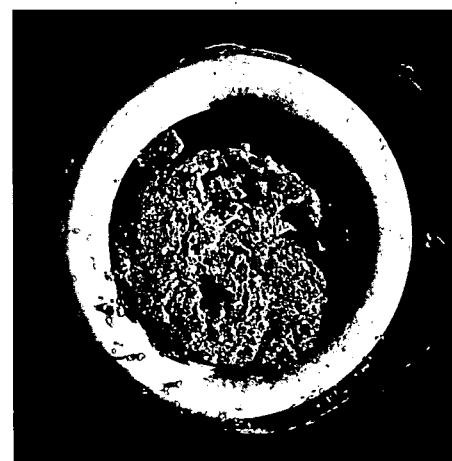
C



D



E



F

図22

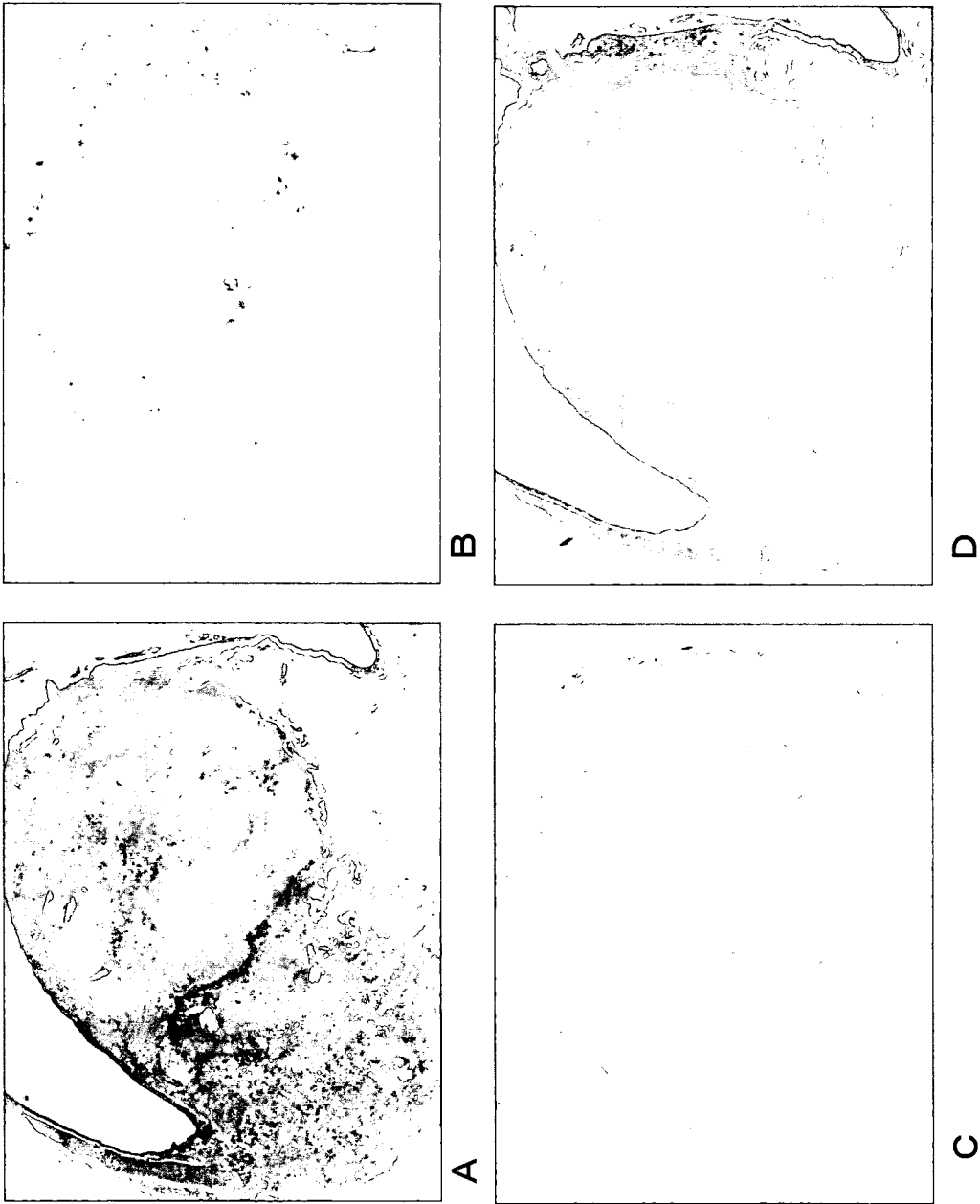


図23

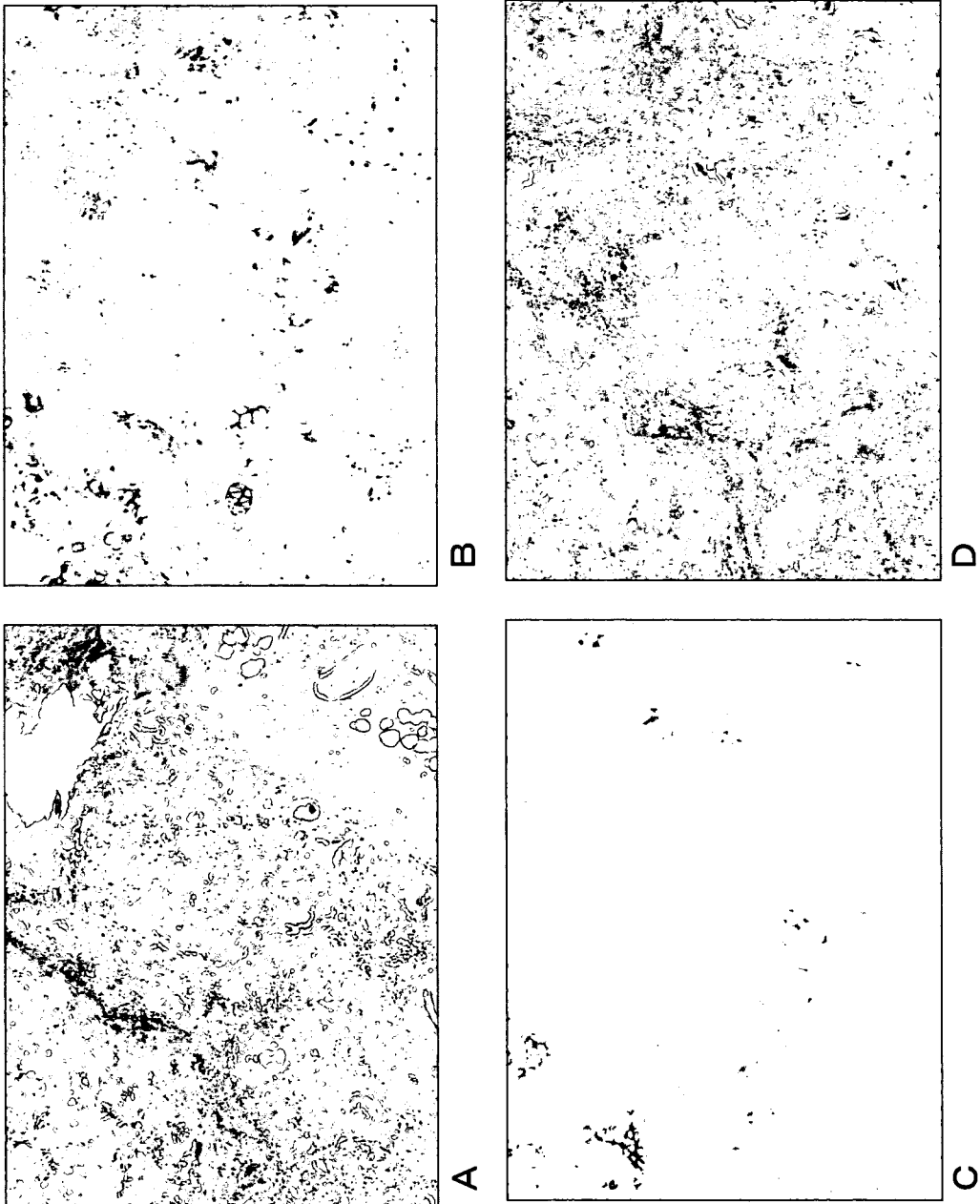


図24

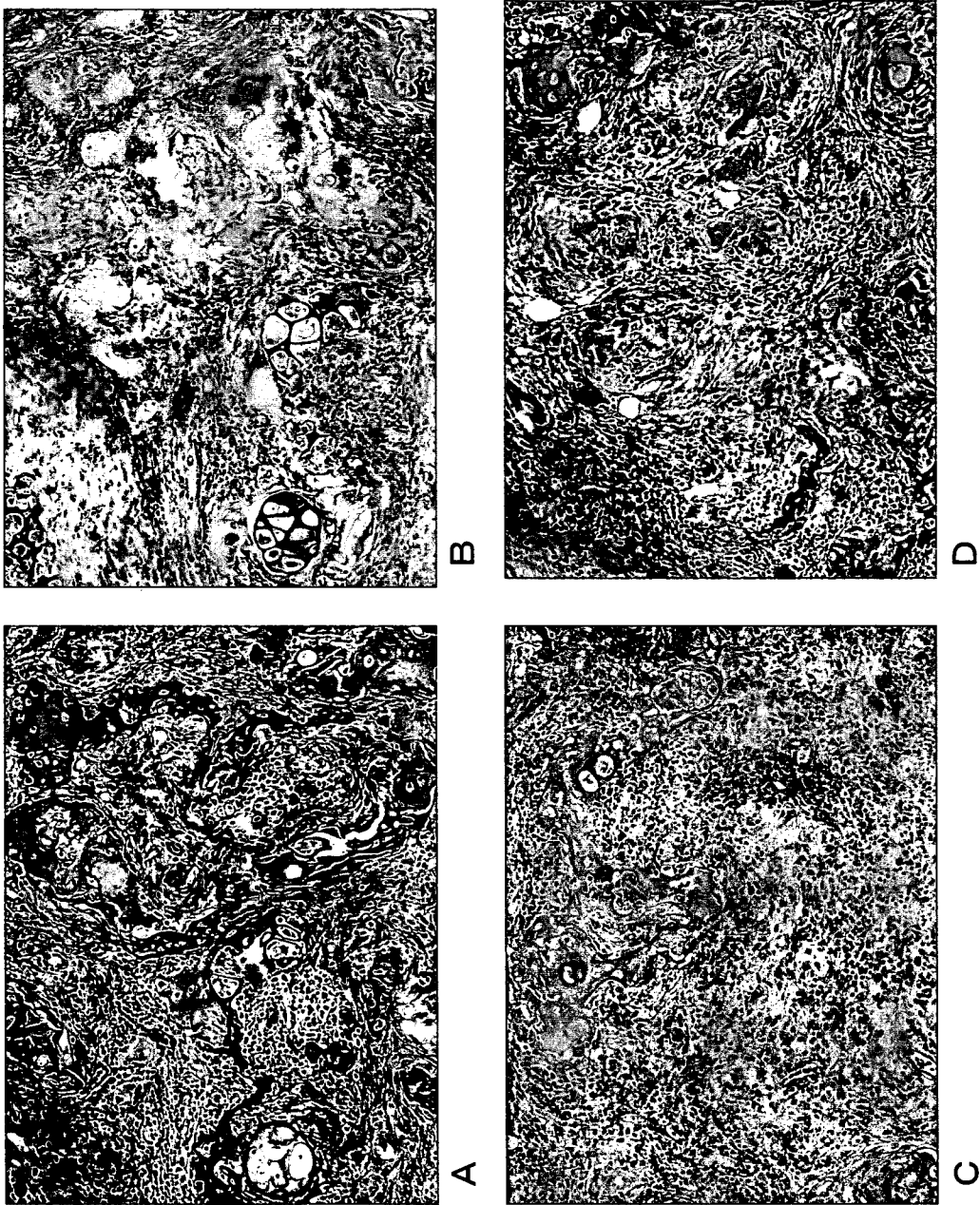


図25

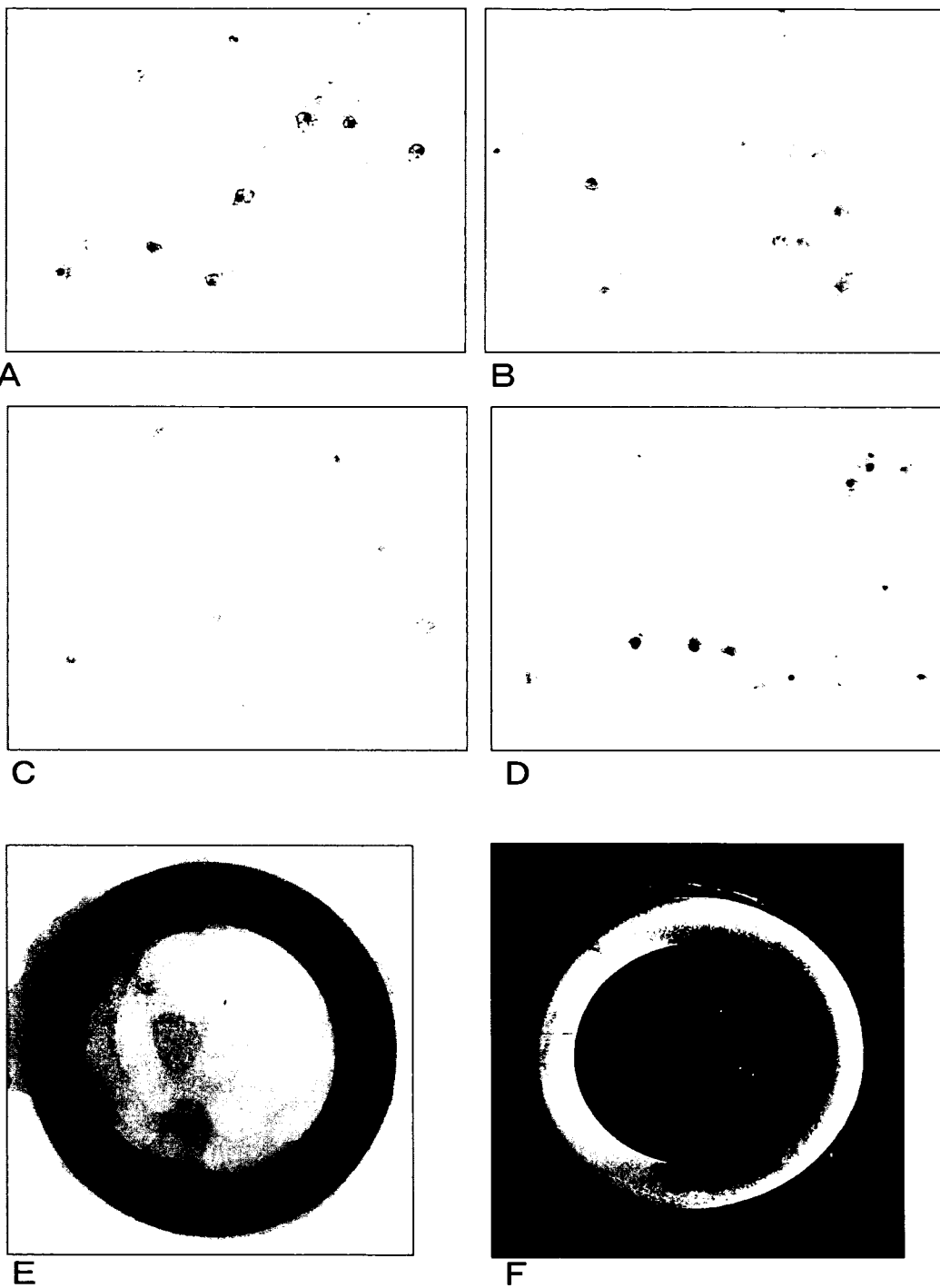


図 26

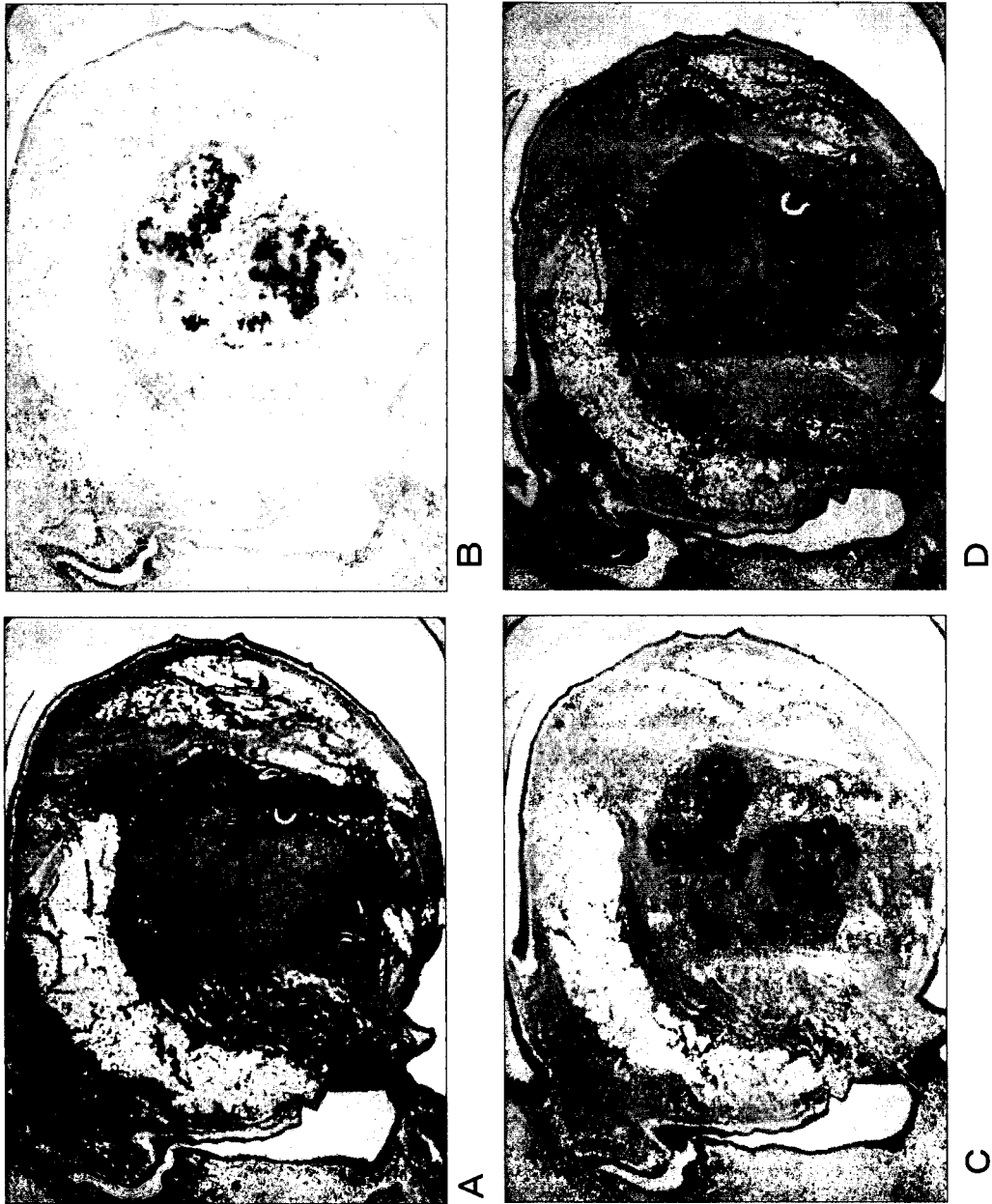
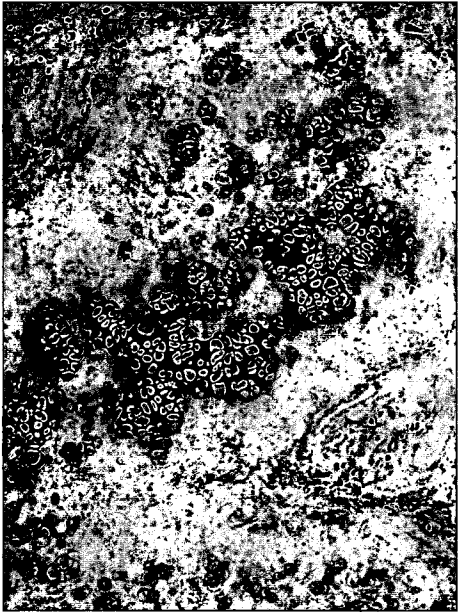


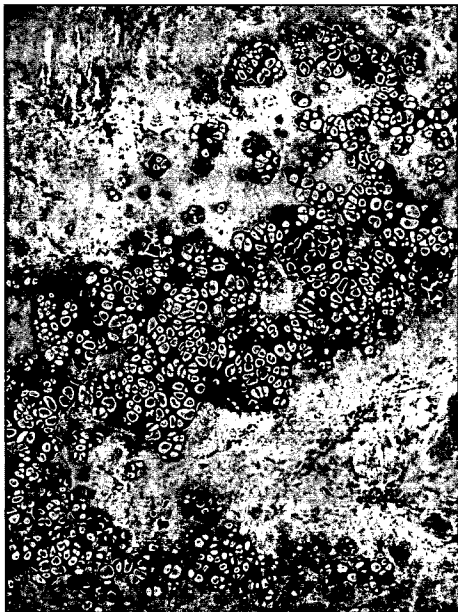
図27



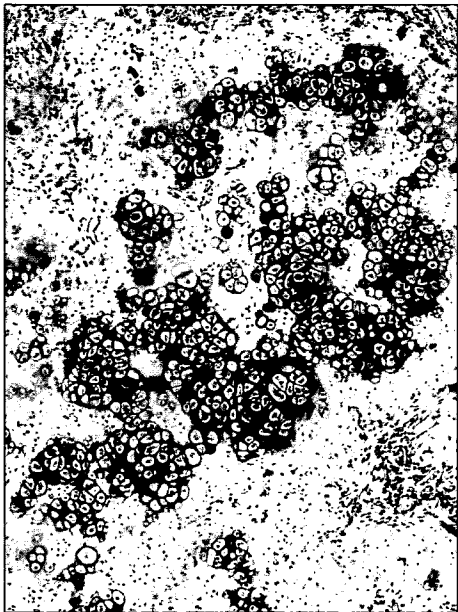
A



B

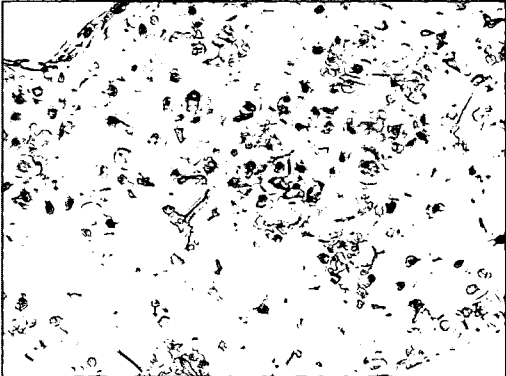


C

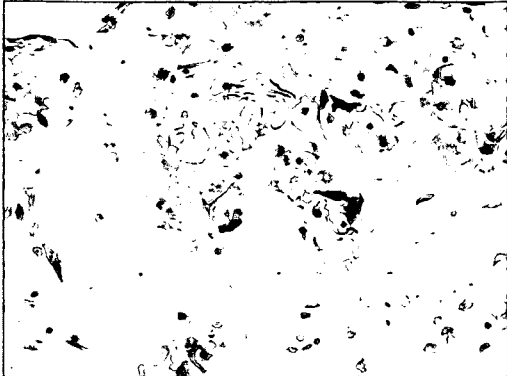


D

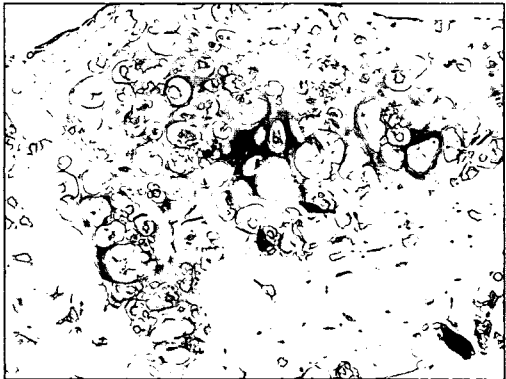
図28



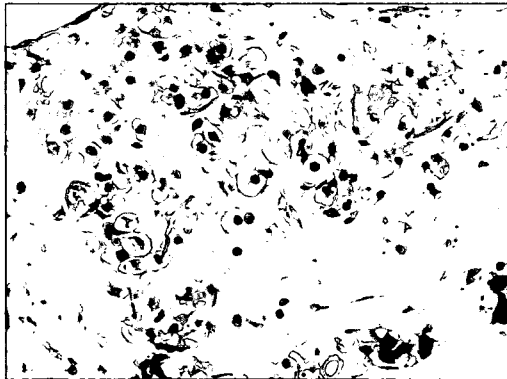
A



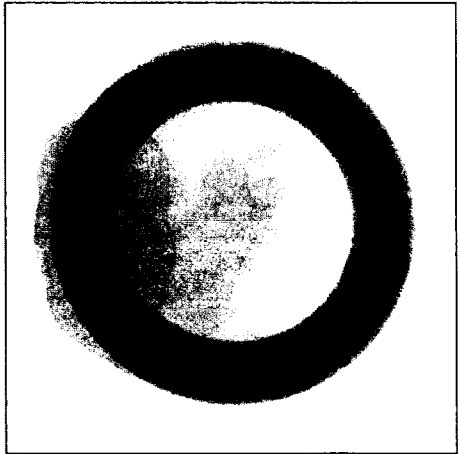
B



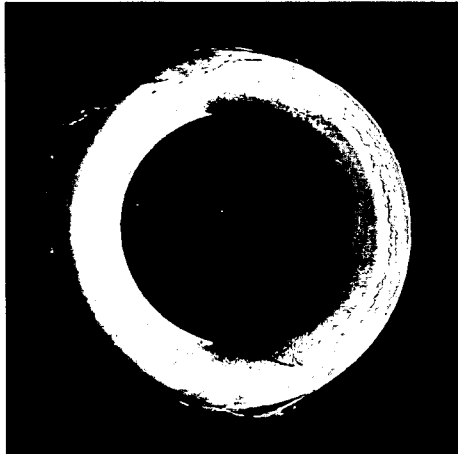
C



D



E



F

図29

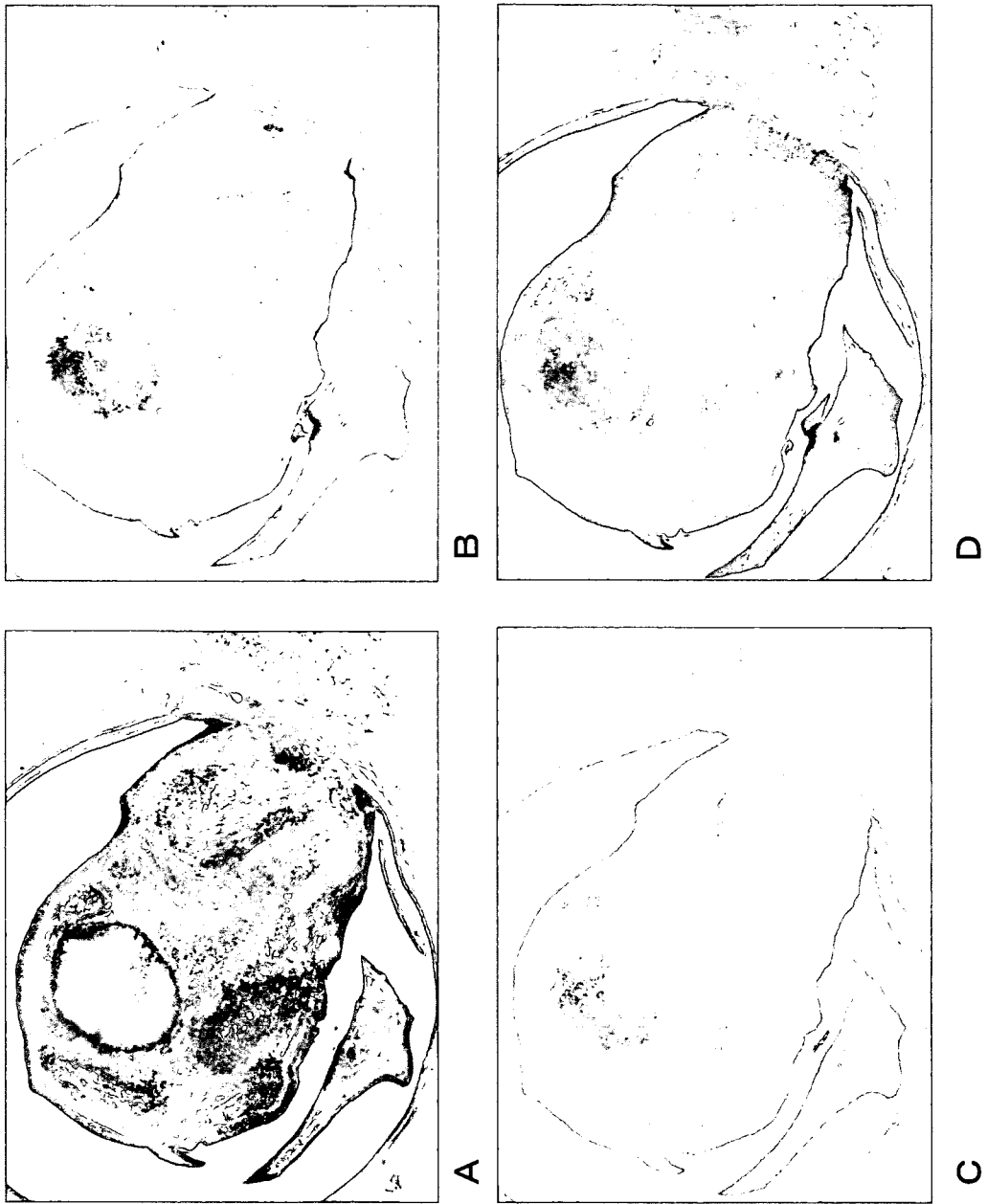


図30

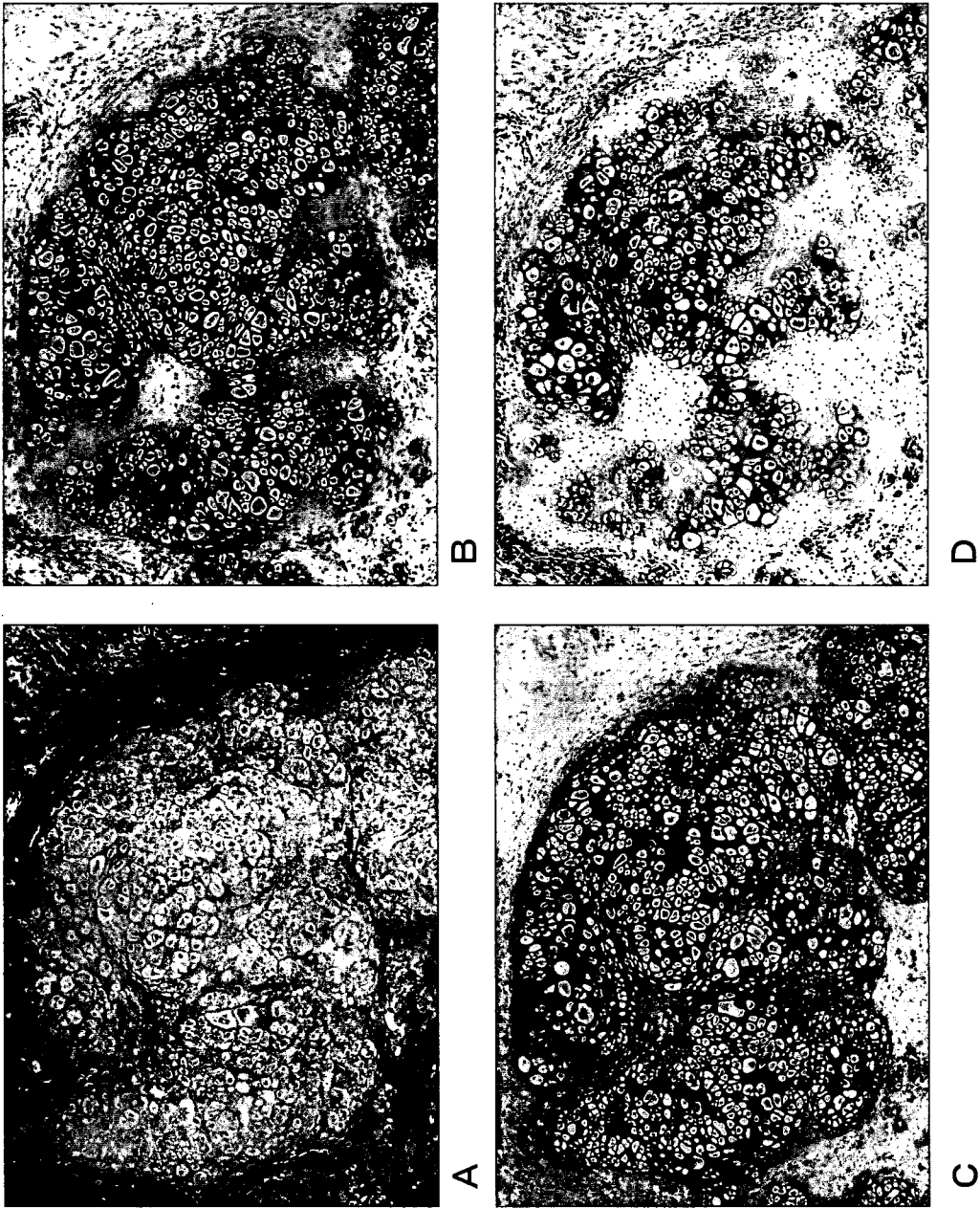
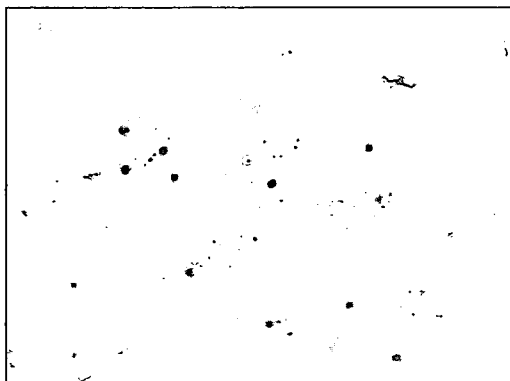
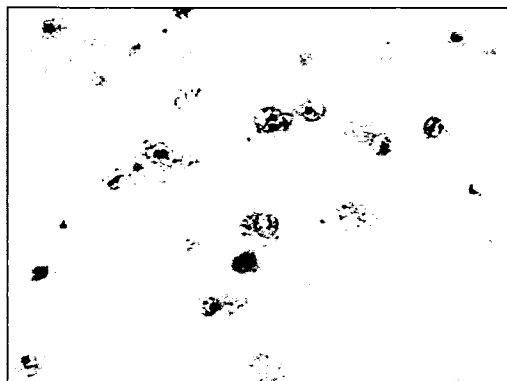


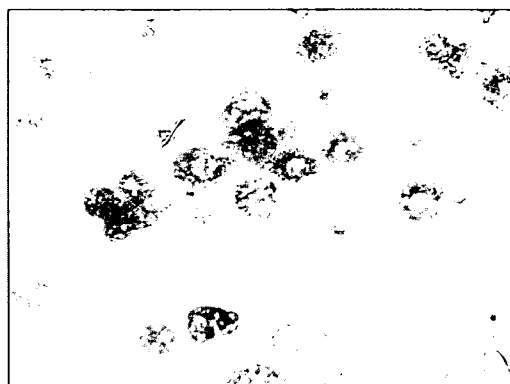
図31



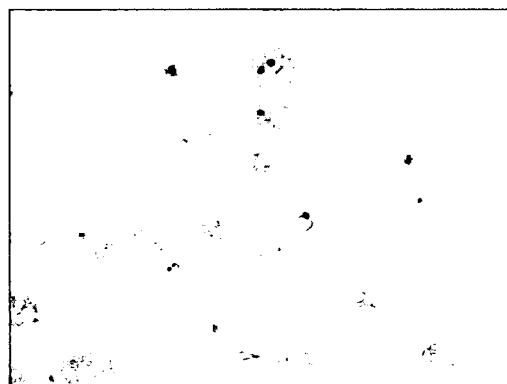
A



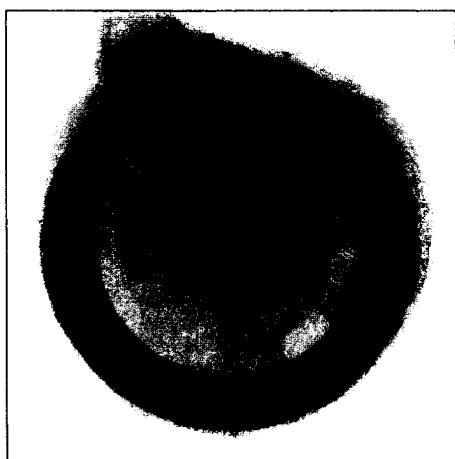
B



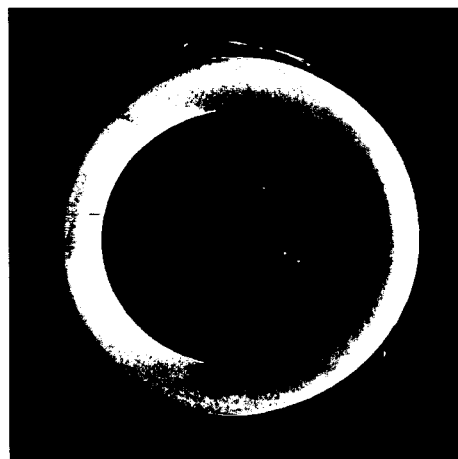
C



D



E



F

図32

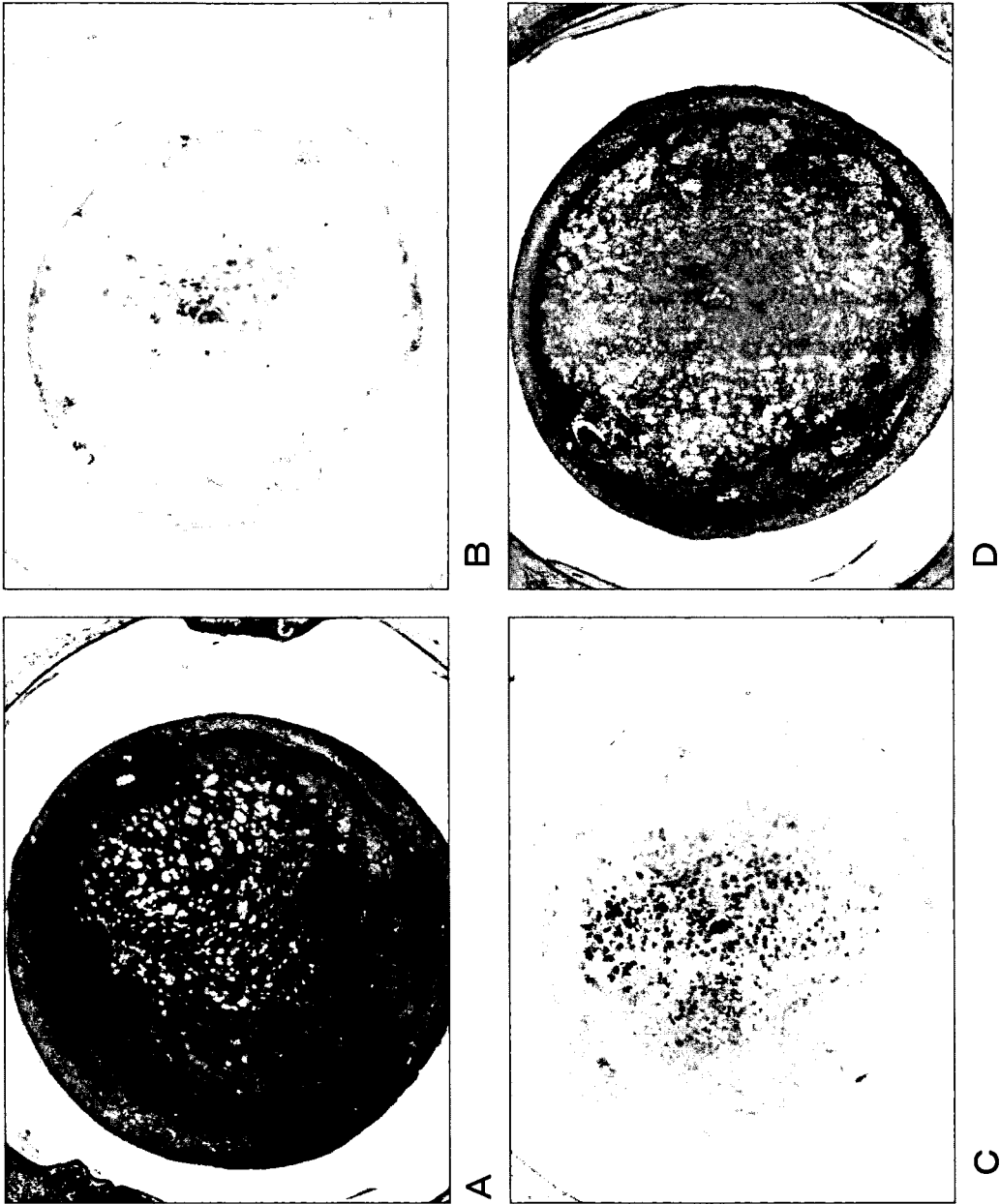
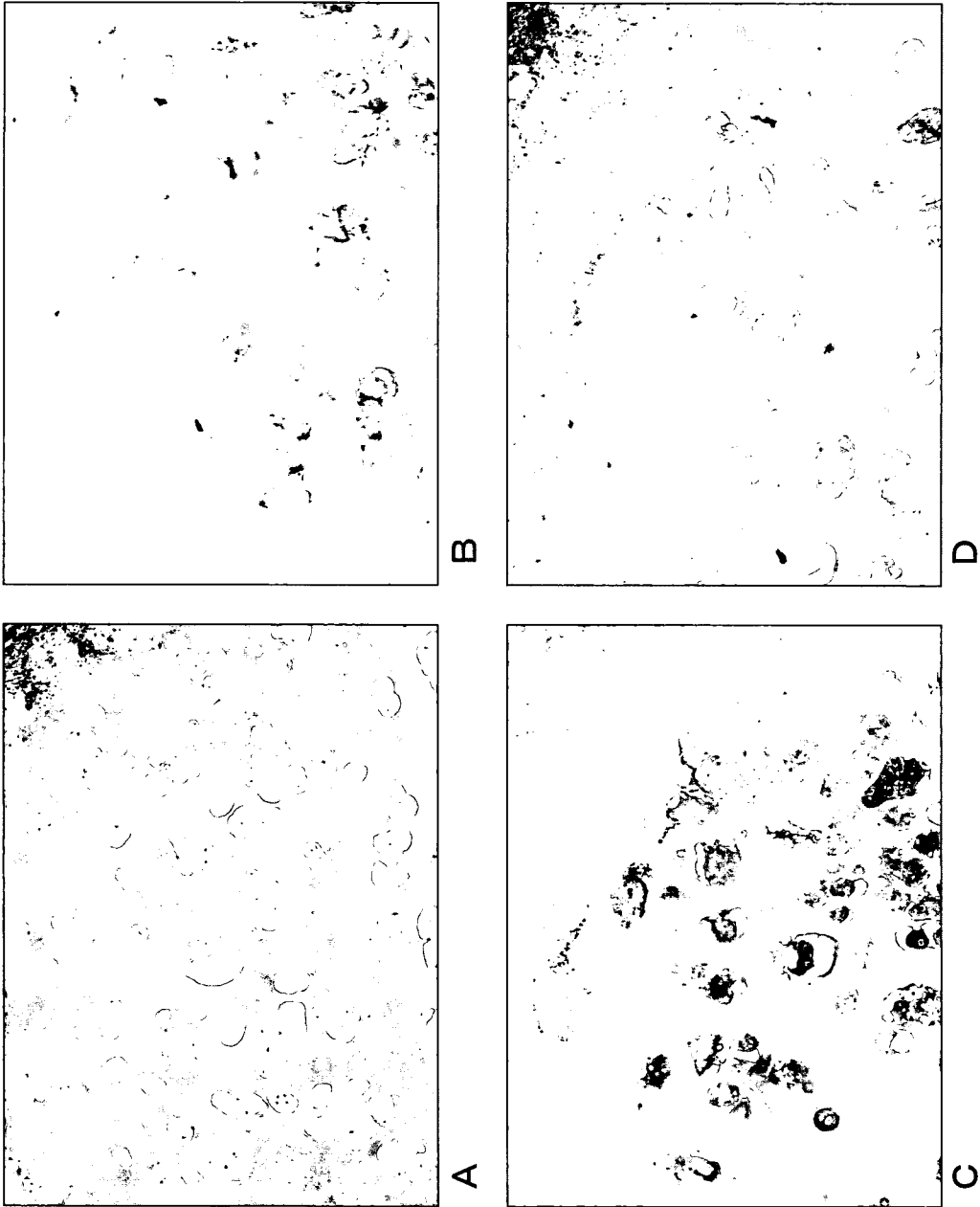
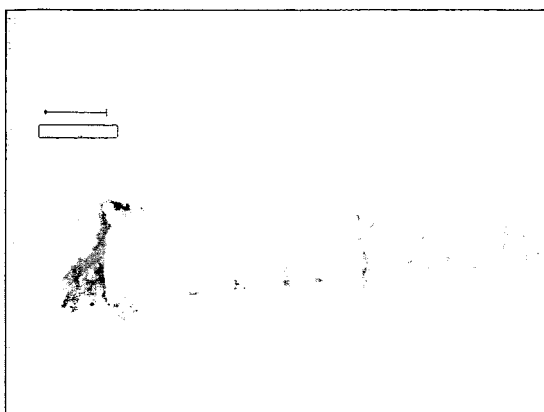


図33



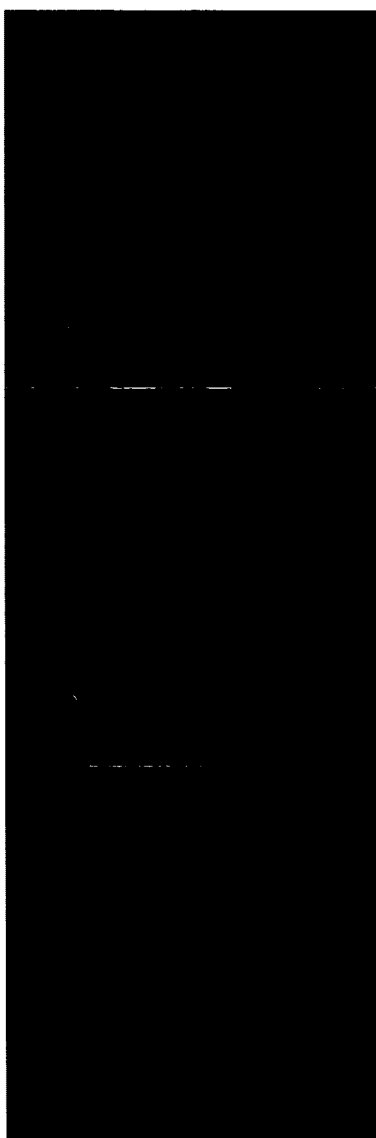
34
A



B



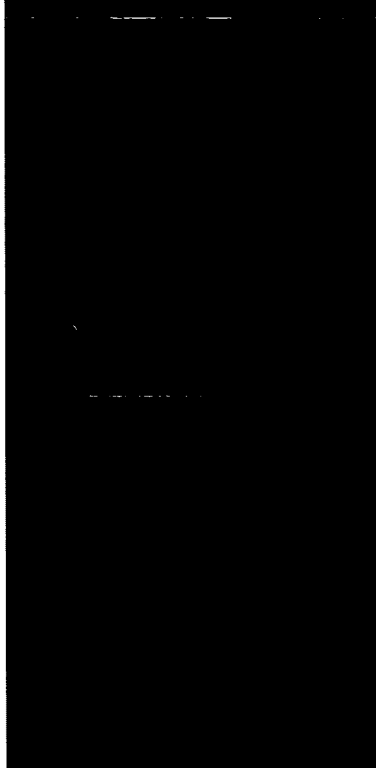
C



D



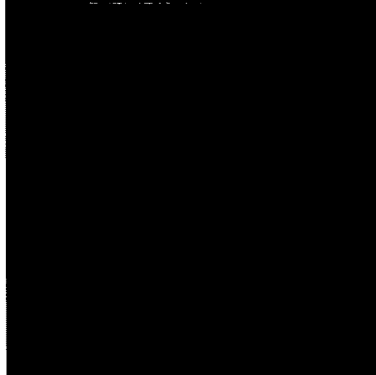
E



F



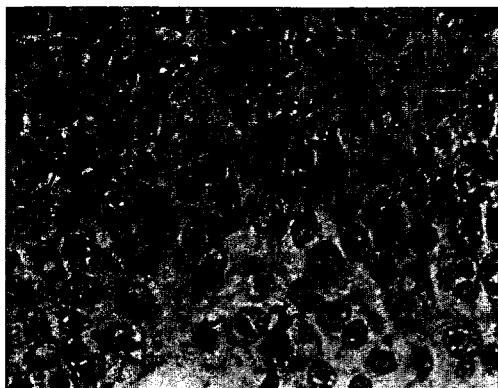
G



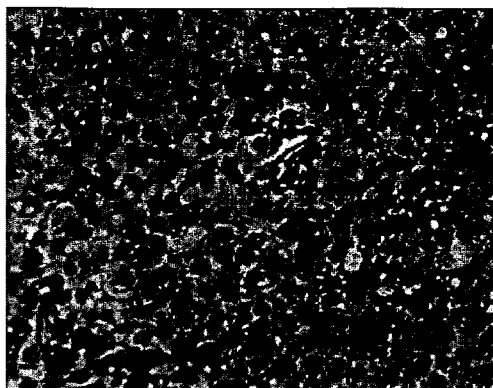
H



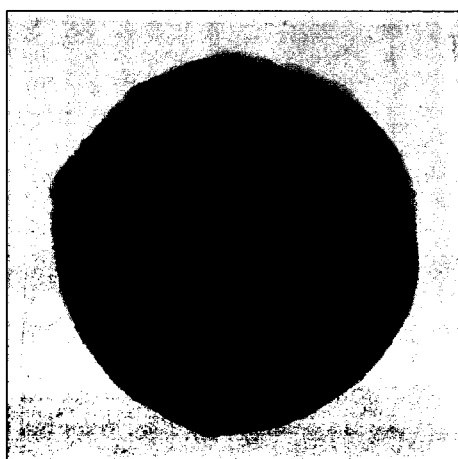
図35



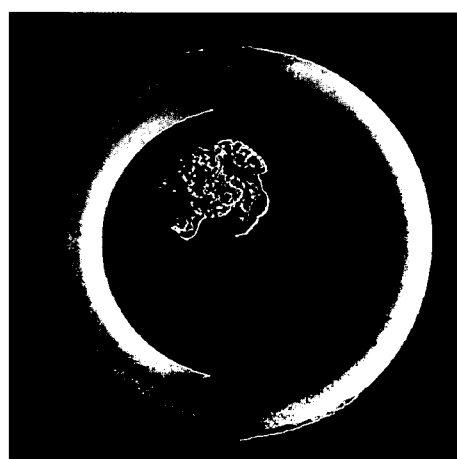
A



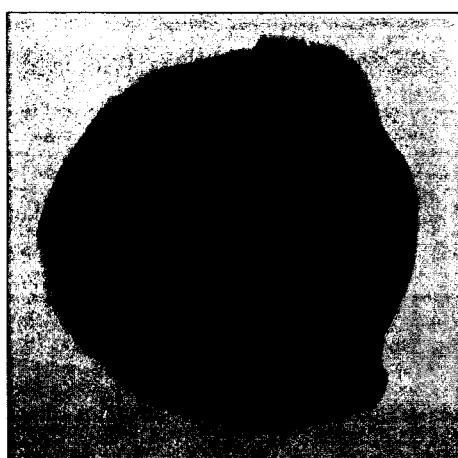
B



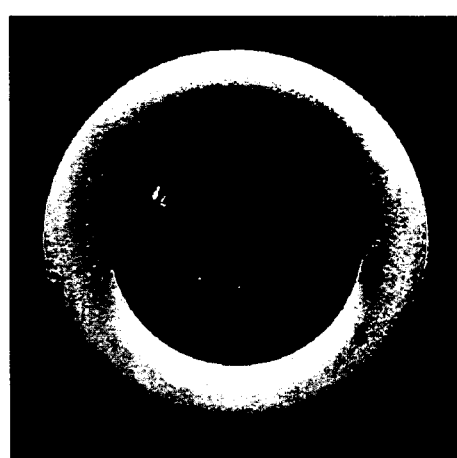
C



D



E



F

図 36

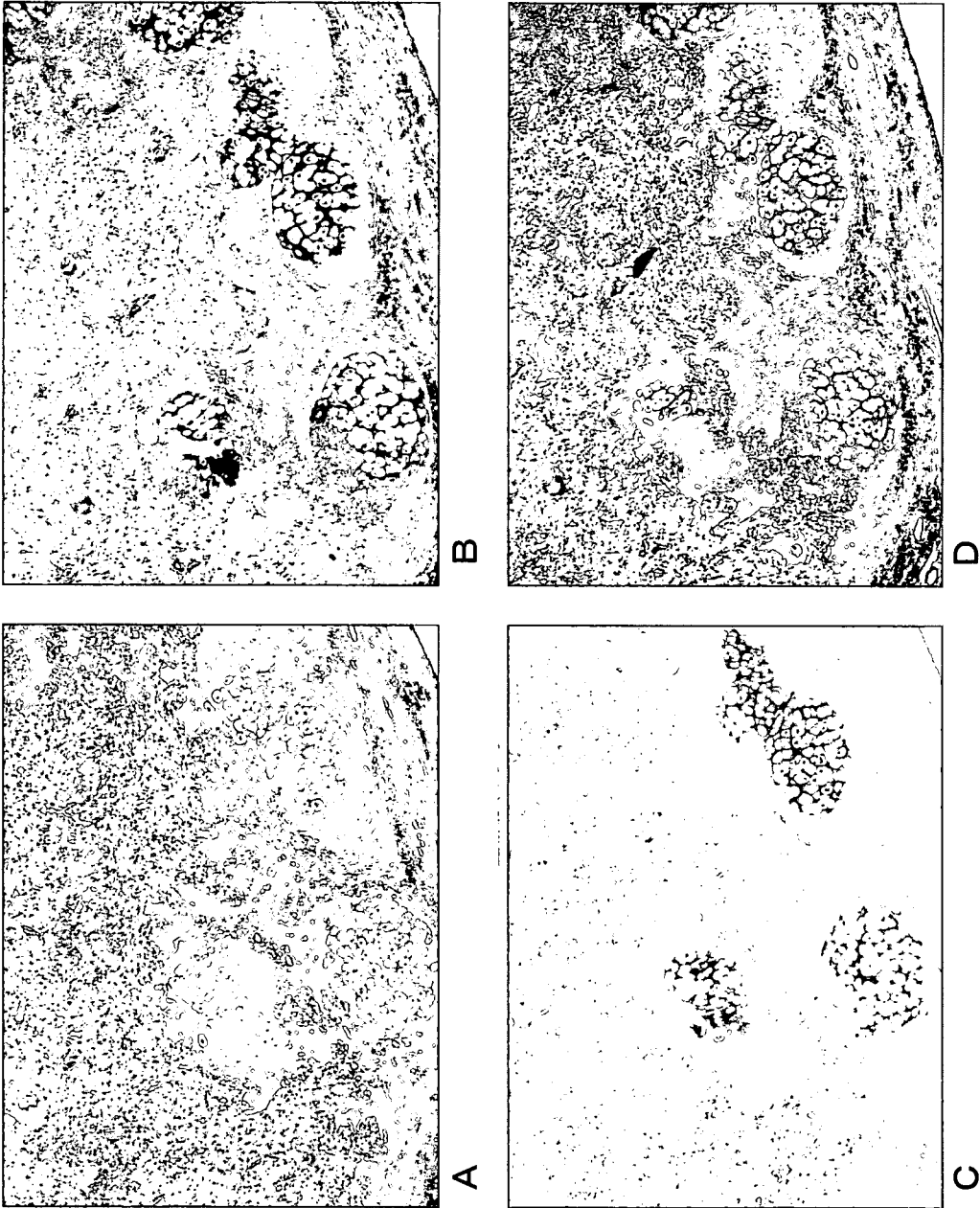


図37

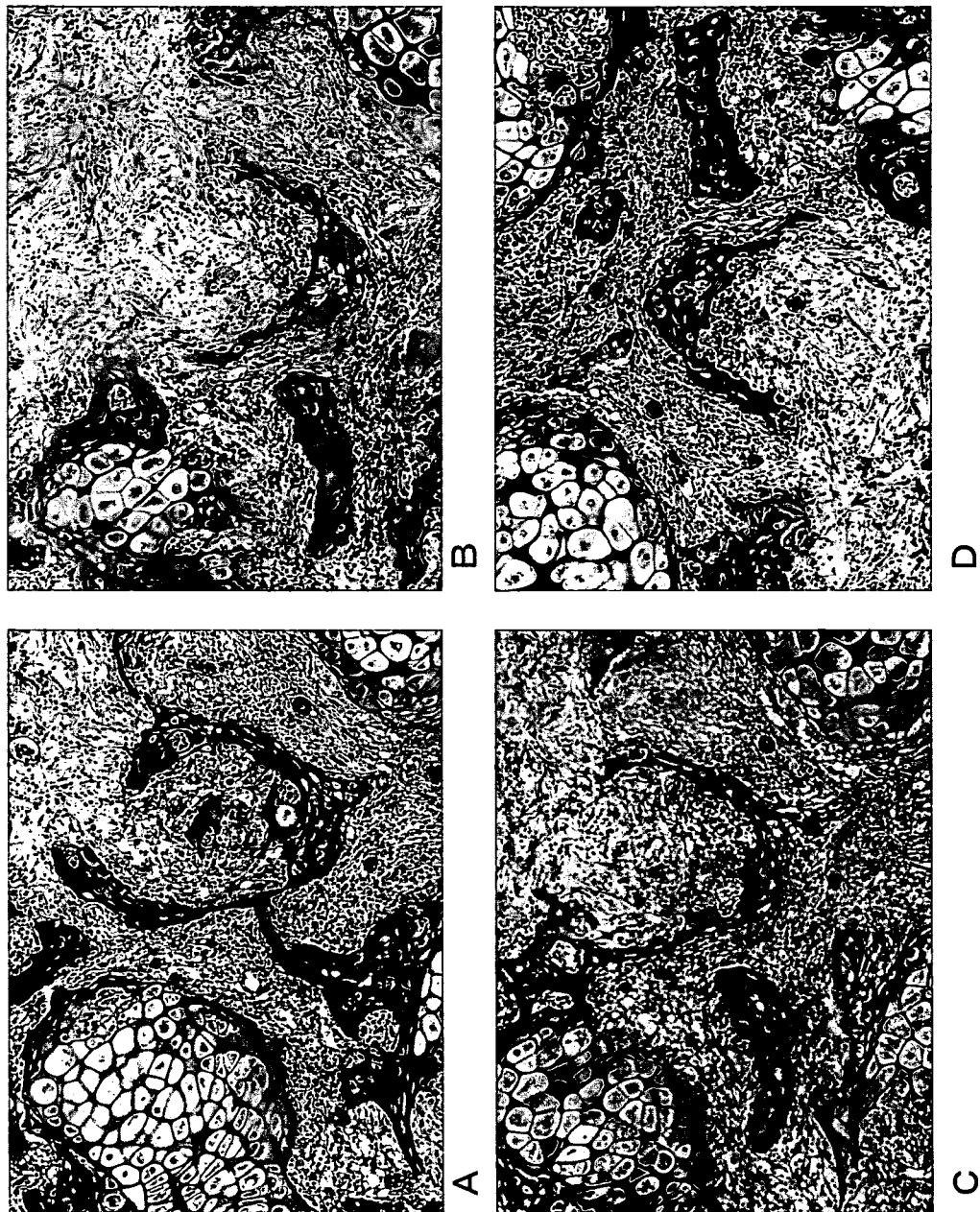


図38



A



B



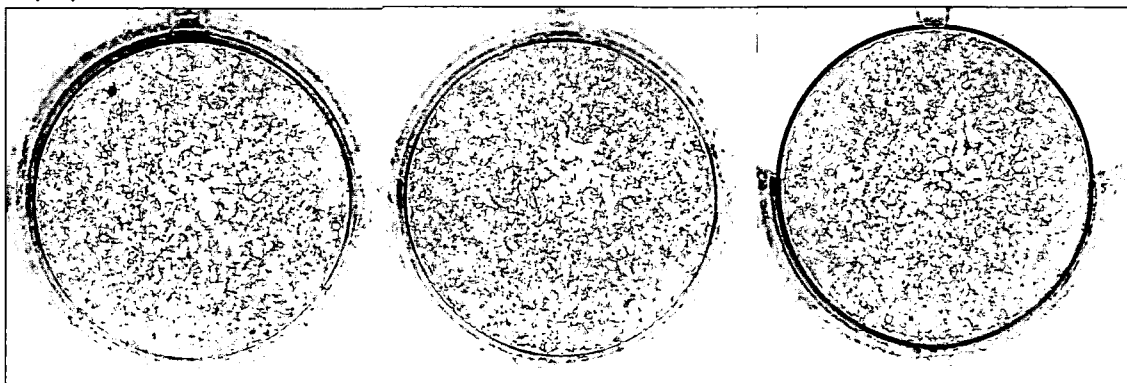
C



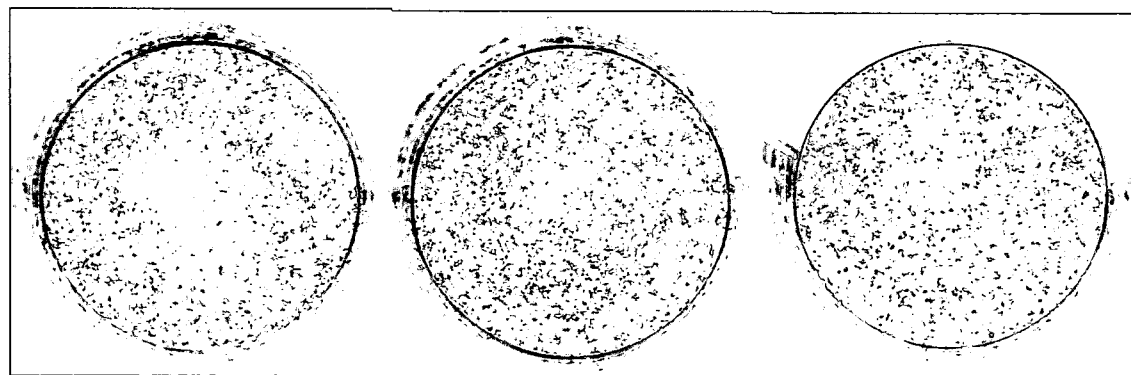
D

図39

(1)



(2)



(3)

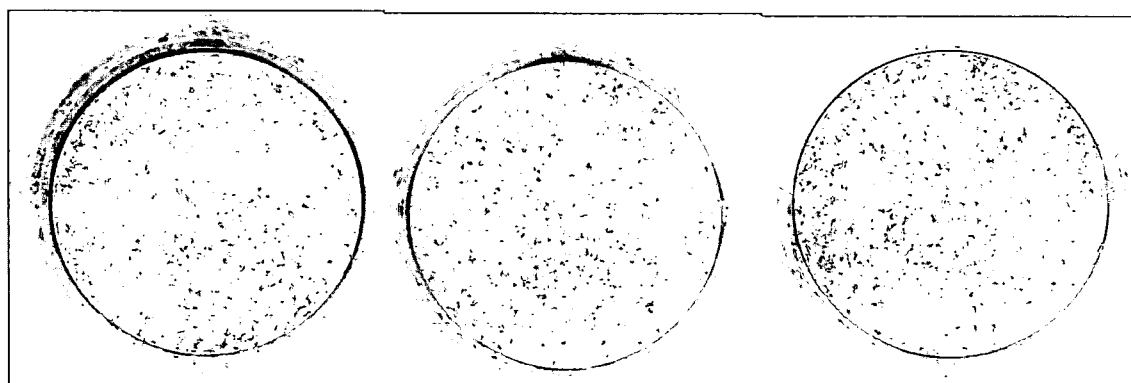


図40A

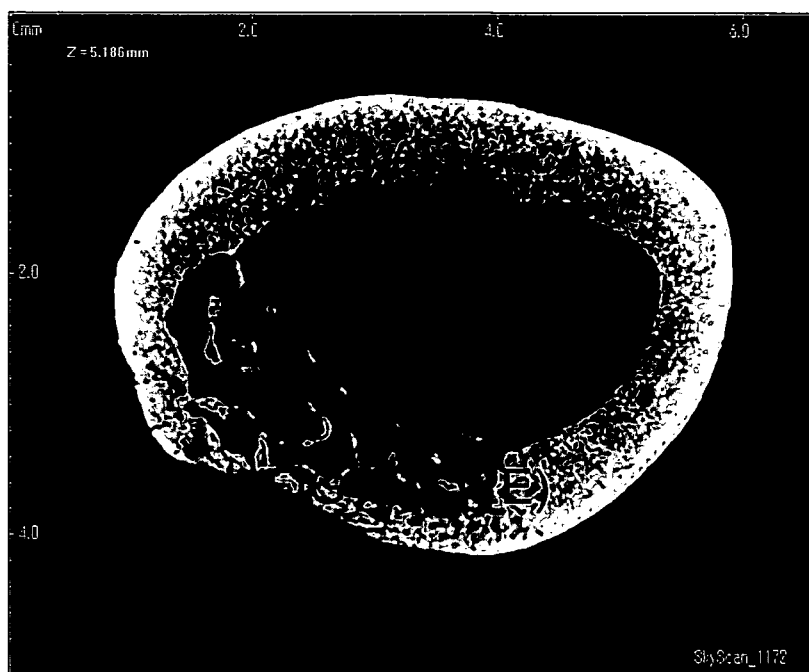


図40B

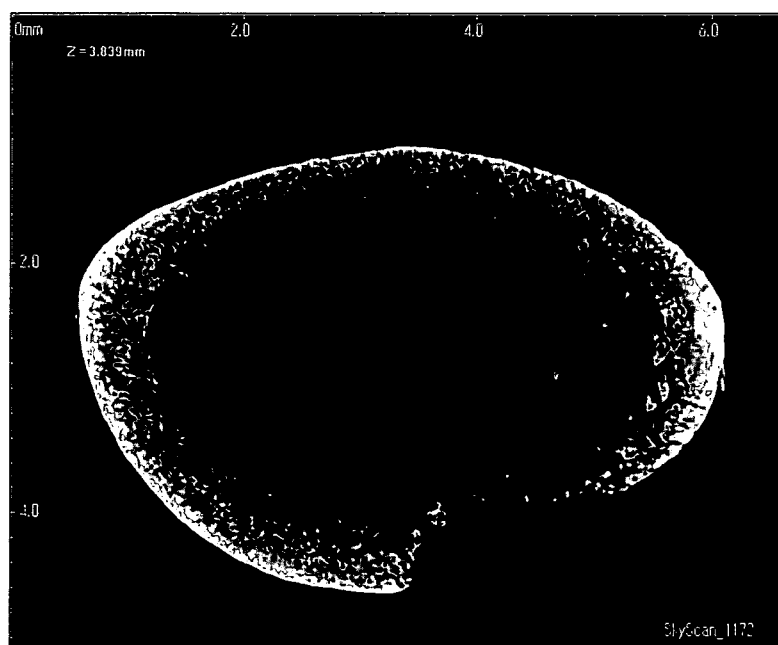
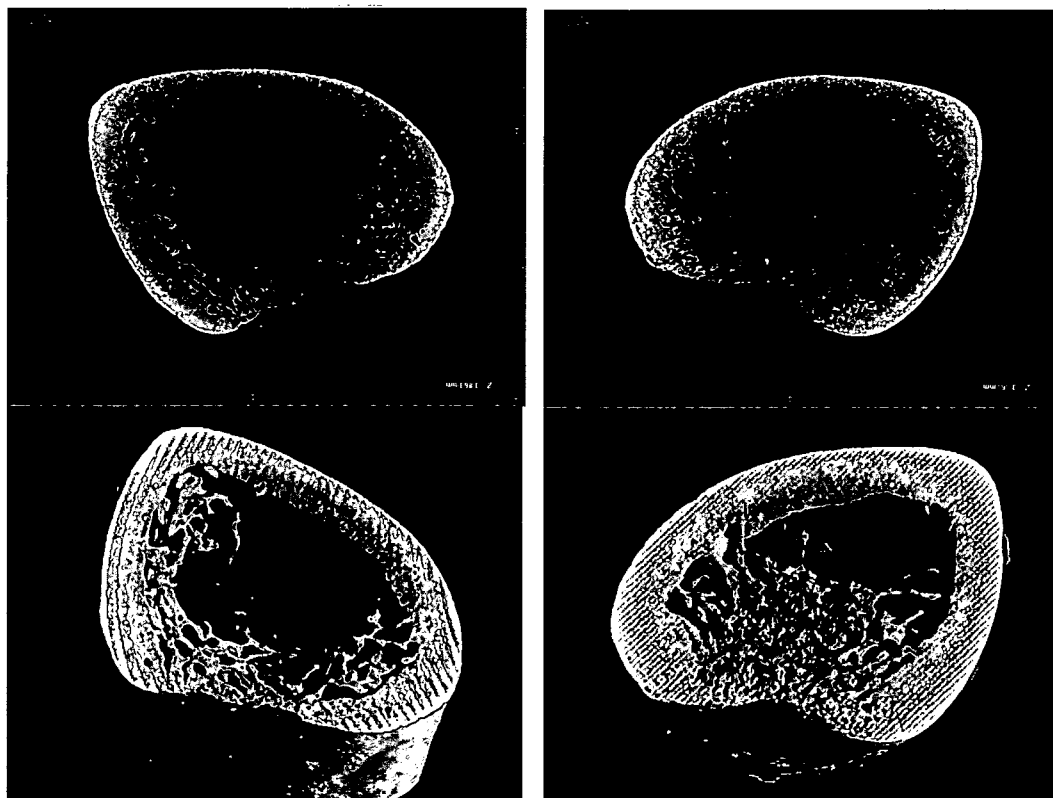


図41

A



B

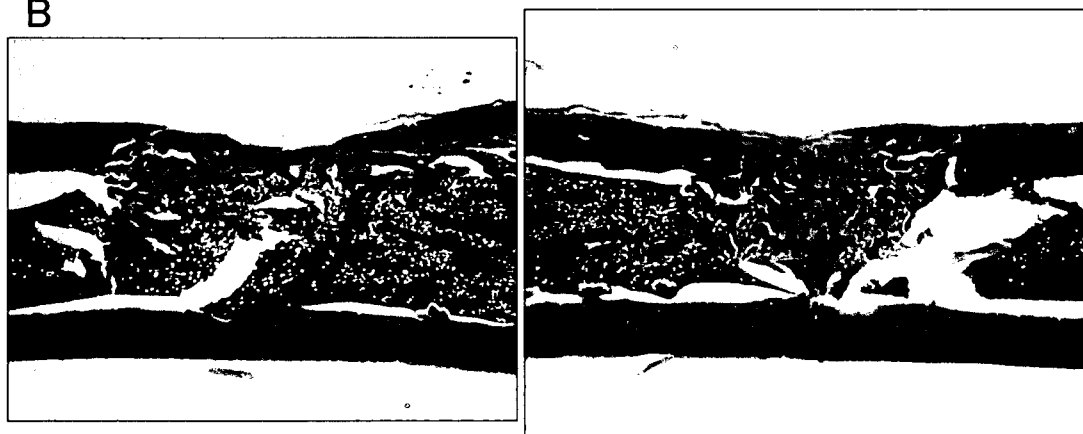
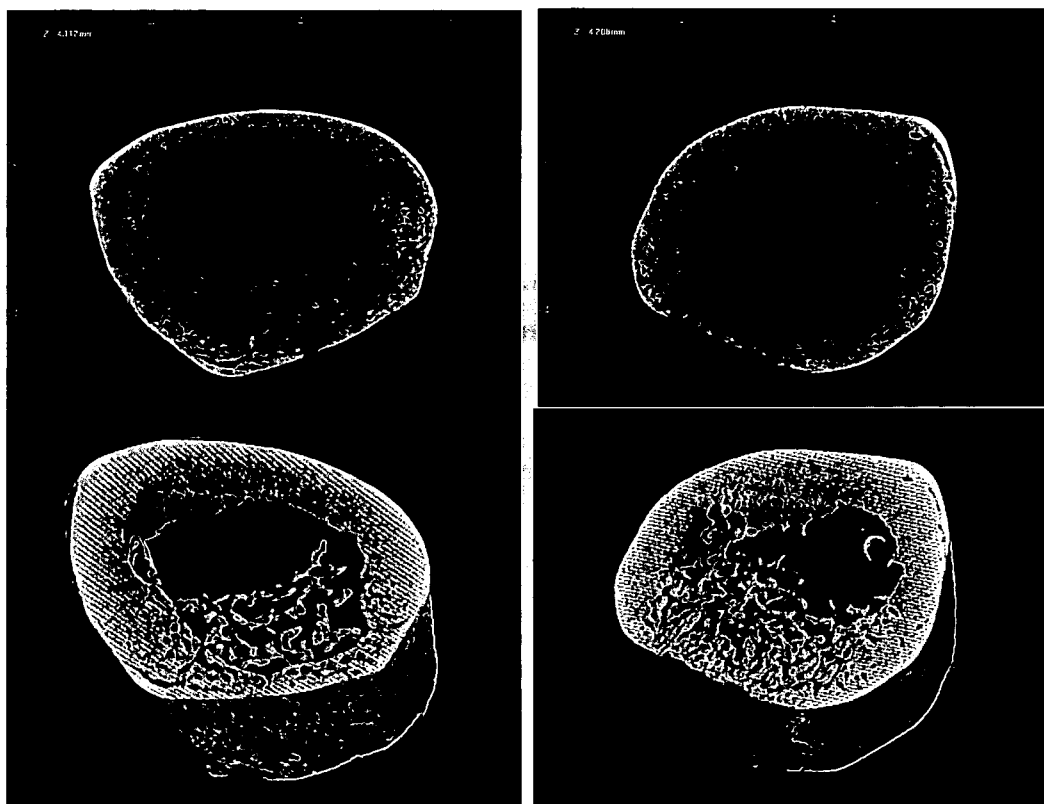
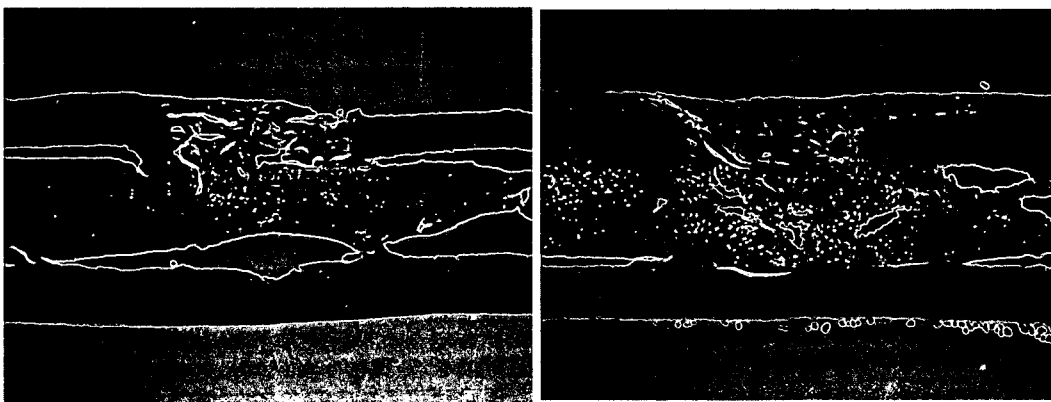


図42

A



B



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2008/061692

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

A61L27/00(2006.01) i

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

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

A61L27/00

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

Jitsuyo Shinan Koho 1922-1996 Jitsuyo Shinan Toroku Koho 1996-2008

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

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

BIOSIS/CAPLUS/EMBASE/MEDLINE (STN), JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamII),

Igaku·Yakugaku Yokoshu Zenbun Database

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	JP 2006-289062 A (Pentax Corp.),	25
Y	26 October, 2006 (26.10.06),	26
A	Claims 1, 19	1-20
	& US 2006/0212125 A1	
Y	Bradham, D.M. et al., In vivo cartilage formation from growth factor modulated articular chondrocytes, Clinical orthopaedics and related research, 1998, Vol.352, pp.239-249, RESULTS, page 247, left column, 3rd paragraph to right column, 2nd paragraph	26
P, X	JP 2007-191467 A (Pentax Corp.), 02 August, 2007 (02.08.07), Claim 69; Par. No. [0179]; example 13 & US 2007/0160976 A1	1-20, 25, 26



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, exhibition 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

17 July, 2008 (17.07.08)

Date of mailing of the international search report

05 August, 2008 (05.08.08)

Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2008/061692

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	Okihana, H. et al., Osteogenic activity of growth cartilage examined by implanting decalcified or devitalized ribs and costal cartilage zone, and living growth cartilage cells, Bone, 1992, Vol.13, pp.387-393	1-20
A	WO 2004/084967 A1 (Anges MG, Inc.), 07 October, 2004 (07.10.04), & US 2007/0003526 A1 & EP 1607108 A1	26

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2008/061692

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.: 21-24
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
The inventions of the above claims are relevant to a method for treatment of a human body by therapy and thus relate to a subject matter which this International Searching Authority is not required, under the provisions of PCT Article 17(2)(a)(i) and PCT Rule 39.1(iv), to search.
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

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, 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 (I P C))

Int.Cl. A61L27/00(2006.01)i

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (I P C))

Int.Cl. A61L27/00

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

日本国実用新案公報	1 9 2 2 - 1 9 9 6 年
日本国公開実用新案公報	1 9 7 1 - 2 0 0 8 年
日本国実用新案登録公報	1 9 9 6 - 2 0 0 8 年
日本国登録実用新案公報	1 9 9 4 - 2 0 0 8 年

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

BIOSIS/Caplus/EMBASE/MEDLINE(STN), JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamII), 医学・薬学予稿集全文データベース

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X	JP 2006-289062 A (ペンタックス株式会社) 2006. 10. 26,	25
Y	請求項 1, 19	26
A	& US 2006/0212125 A1	1-20
Y	Bradham, D.M. et al., In vivo cartilage formation from growth factor modulated articular chondrocytes, Clinical orthopaedics and related research, 1998, Vol.352, pp.239-249 RESULTS, 第 247 頁左欄第 3 段落～同頁右欄第 2 段落	26

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

* 引用文献のカテゴリー

「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの
「E」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの
「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)
「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献
「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの

「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの

「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の 1 以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの

「&」同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

1 7 . 0 7 . 2 0 0 8

国際調査報告の発送日

0 5 . 0 8 . 2 0 0 8

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (I S A / J P)

郵便番号 1 0 0 - 8 9 1 5

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 0 3 - 3 5 8 1 - 1 1 0 1 内線 3 4 5 2

4 C

3 4 3 7

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
P, X	JP 2007-191467 A (ペンタックス株式会社) 2007. 08. 02, 請求項 69, 【0179】, 実施例 13 & US 2007/0160976 A1	1-20, 25, 26
A	Okihana, H. et al., Osteogenic activity of growth cartilage examined by implanting decalcified or devitalized ribs and costal cartilage zone, and living growth cartilage cells, Bone, 1992, Vol.13, pp.387-393	1-20
A	WO 2004/084967 A1 (アンジェス エムジー株式会社) 2004. 10. 07, & US 2007/0003526 A1 & EP 1607108 A1	26

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（PCT17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. ☒ 請求の範囲 21-24 は、この国際調査機関が調査することを要しない対象に係るものである。
つまり、
上記請求の範囲に係る発明は治療による人体の処置方法に該当し、PCT17条(2)(a)(i)及びPCT規則39.1(iv)の規定により、この国際調査機関が調査することを要しない対象に係るものである。
2. ☐ 請求の範囲 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. ☐ 請求の範囲 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ろ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の範囲について作成した。
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の範囲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った。
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ったので、この国際調査報告は、手数料の納付のあった次の請求の範囲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ったので、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の範囲について作成した。

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、異議申立手数料の納付と共に、出願人から異議申立てがあった。
- ☐ 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ったが、異議申立手数料が納付命令書に示した期間内に支払われなかった。
- ☐ 追加調査手数料の納付はあったが、異議申立てはなかった。