原	著
---	---

ヒト歯槽骨骨膜由来細胞を用いた新しい移植片作製法

尾形 顕 出口 眞二

神奈川歯科大学大学院歯学研究科歯周病学講座

(受付日：2006 年 4 月 17 日 受理日：2006 年 6 月 20 日)

Novel Preparation of Grafts Composed of Human Alveolar Bone Periosteal Cells

Akira Ogata and Shinji Deguchi

Department of Periodontology, Kanagawa Dental College Graduate School

(Received : April 17, 2006 Accepted : June 20, 2006)

Abstract : We studied the possibility of using grafts composed of human alveolar bone periosteal cells (HABPCs) for periodontal regeneration. HABPCs were inoculated four times to become a multilayer cell sheet every week that was cultured for three days after being folded to create the graft. Graft morphology and protein expression were analyzed using histological (hematoxylin and eosin, alkaline phosphatase (ALP) and von Kossa's staining) and immunohistochemical (type I collagen (Col-I), osteopontin (OPN), osteocalcin (OC) and Ki-67) studies on graft sections.

The graft must be able to be used with tweezers easily, must be about 5×10 mm in size, and must be about 1.5 mm thick. As a result of histological observation, the graft consisted only of the cell and the extracellular matrix. Immunohistochemical staining of graft sections showed a strong positive reaction for Col-I and included OC, OPN, and Ki-67 positive cell.

Grafts may thus be calcified by the above results. Nihon Shishubyo Gakkai Kaishi (J Jpn Soc Periodontol) 48 : 192—200, 2006.

Key words : human alveolar bone periosteal cell, periodontal tissue regeneration, cell sheet, graft, immunohistochemical staining

要旨：本研究の目的はヒト歯槽骨骨膜由来細胞 (HABPCs) による移植片を用いた歯周組織再生療法の可能性を検索することであった。HABPCs を 1 週間毎に、計 4 回、播種することにより、多層細胞シートを形成した。その細胞シートを折りたたんだ後、さらに 3 日間培養することにより移植片を作製した。移植片の形態とタンパク発現は組織学的 (ヘマトキシリン・エオシン染色, アルカリホスファターゼ (ALP) 染色, von Kossa 染色), 免疫組織化学的 (I 型コラーゲン (Col-I), オステオポンチン (OPN), オステオカルシン (OC), Ki-67) 検索を用いて行った。

作製した移植片はピンセットで容易に操作できる物性を有し、大きさは約 5×10 mm であり、厚みは約 1.5 mm であった。組織学的検索の結果、移植片は細胞と細胞外基質のみで構成されていた。移植片の免疫組織化学的染色においては Col-I の強い陽性反応所見が認められた。さらに OC, OPN, Ki-67 の陽性細胞も観察された。

連絡先：尾形 顕

〒 238-8580 神奈川県横須賀市稲岡町 82 番地 神奈川歯科大学大学院歯学研究科歯周病学講座

Akira Ogata

Department of Periodontology, Kanagawa Dental College Graduate School

82 Inaoka-cho, Yokosuka, Kanagawa 238-8580, Japan

E-mail akira128@kdcnet.ac.jp

以上の結果により、今回作製した移植片は石灰化する可能性を有していることが示唆された。

キーワード：ヒト歯槽骨骨膜由来細胞，歯周組織再生療法，細胞シート，移植，免疫組織化学的染色

緒 言

歯周疾患によって失われてしまった歯周組織の完全なる再生は歯科医師の夢であり、患者の希望でもある。たとえ歯そのものが健全であっても、歯周組織の支持を失った歯は機能や審美性を損なってしまう。そのため元の形態や機能を回復する組織再生は歯周治療の究極のゴールといわれている¹⁻⁴⁾。

現在、歯周外科治療のフラップ手術による原因除去療法では、歯周組織の治癒を促すことは可能であるが、歯周組織の再生はほとんど望むことはできない。そこで組織再生誘導法（GTR法）⁵⁾ やエムドゲイン[®]療法⁶⁾ が登場し、それまでの原因除去療法に比べ、歯周組織の再生において一定の成績をあげている^{7,8)}。しかし、GTR法やエムドゲイン[®]療法は組織内の細胞に働いて再生を導いているために、広範囲な組織欠損においては十分な細胞の遊走や増殖が困難となり、部分的な再生しか期待できず適応症が限られている。自家骨移植による骨再生も臨床で多く用いられている手法⁹⁾ であるが、採取部位の外科的侵襲や疼痛、知覚障害、変形などの問題がある。さらに移植骨の採取量の限界もあり、それらの欠点を補う方法として他家・異種移植、生体親和性材料がある¹⁰⁻¹⁷⁾。他家骨移植の場合、大量に使用できるという利点はあるが、品質が均一ではなく抗原性や細菌・ウイルスなどの感染のリスクがある。生体親和性材料は品質が均一であり、感染の問題がないが骨誘導能に乏しいという欠点がある。

このように現在行われている再生療法にはそれぞれ利点・欠点がある。理想的な再生療法としては生体への外科的侵襲が少ないこと、生体への親和性が良いこと、抗原性がなく感染の恐れのない安全性の高いこと、操作性・付形性に優れ組織再生量や形態の制御ができることなどが挙げられる。

このような条件を満たす手法の一つとして注目をあびているのが、組織工学の手法を用いた組織再生法である。すなわち組織再生の要素として細胞・シグナル分子・足場（scaffold）の3要素が必要であり¹⁸⁾、生物学的・工学的にこの3要素を組み合わせ、組織再生を導く方法である。また組織再生のプロセスの1つに付加形成があるが、これは欠損部に新たな細胞を補うことによって修復するもので、幹細胞や前駆細胞が活

性化し、新たな細胞を供給するものである。つまり細胞を用いた再生療法は生体に備わっている再生様式である付加形成を模倣しており、理にかなった方法といえる。歯周組織においても様々な組織再生療法が研究されてきた¹⁹⁻²²⁾。しかしながら、その3要素を積極的に用い、かつ異種や他家由来成分を使用しないことにより未知の病原体感染のリスクを減らし、生体への親和性のよい自己由来成分のみを用いた歯周組織再生療法はほとんどない。

そこで我々は細胞を多層に培養することによって強固な細胞シートを形成し、その細胞シートに三次元構造を与えることによって、新しい移植片の作製を試みた。また移植片を構成する細胞は採取時の侵襲が大きく、細胞採取が難しい歯槽骨ではなく、採取しやすい歯槽骨骨膜からの細胞を用いて移植片を作製した。そして免疫組織化学的に検索を行い、作製した移植片の特徴について検討した。

材料および方法

1. 細胞培養

本研究は神奈川歯科大学倫理委員会の承認のもと、インフォームドコンセントの得られた神奈川歯科大学附属病院に来院した患者（40歳・女性）を対象に行った。歯周外科処置時に部分層弁にて剝離を行い、歯槽骨上にある組織を5×5 mm程度採取し、骨膜片として使用した。初代培養細胞を得るために採取した骨膜片を細分化し、Cell culture slip（Thermanox Plastic：Nalge Nunc International, USA）で骨膜片を押えることによって静置した状態で培養した²³⁾。その後、骨膜片から遊出してきた細胞をヒト歯槽骨骨膜由来細胞（human alveolar bone periosteal cells：HABPCs）の初代培養細胞とした。HABPCsがコンフルエントに達した後、0.25%トリプシン（1/250：Difco, USA）で細胞密度を 1.8×10^4 cells/cm²に調整して継代培養を行った。細胞培養液は α -Minimum Essential Medium（ α -MEM：Gibco, USA）に10%ウシ胎児血清（Fetal Calf Serum：Whittaker Bioproducts, USA）、50 μ g/mlのアスコルビン酸-2P（和光純薬、大阪）および100 units/mlのペニシリン（Gibco, USA）を添加した。なお本研究はヘルシンキ宣言を遵守して行った。

2. 細胞シートおよび移植片の作製

HABPCs による移植片は細胞シートを形成し、折りたたむことにより作製した。すなわち継代した HABPCs を 1.8×10^4 cells/cm² の細胞密度で直径 100 mm の培養皿に播種を行い、1 週間後、コンフルエントに達した培養皿上に 3.6×10^4 cells/cm² の細胞密度で 1 週間ごとに播種しつづけ、3 週間行った。その後 0.25 % トリプシンで培養皿から細胞シートを浮遊させた。その細胞シートを折りたたんだ後、さらに 3 日間培養することにより、三次元構造を与え、それを移植片とした。

3. 組織学的検索

移植片を作製した後にヘマトキシリン・エオシン (HE) 染色、アルカリホスファターゼ (ALP) 染色、von Kossa 染色を行った。4 % パラホルムアルデヒド水溶液に 2 時間、4 °C にて固定した後パラフィン包埋したものを厚さ 10 μ m の切片を作製した。通法どおりに脱パラフィンを行い、HE 染色は通法に従って行い、マイヤーヘマトキシリン溶液 (和光純薬, 大阪) と 1 % エオシン Y 液 (武藤化学, 東京) を使用した。ALP 染色は 50 mmol/l の MgCl₂ (和光純薬, 大阪) を含んだ 0.1 mol/l トリス-マレイン酸緩衝液 (pH 7.2: 和光純薬, 大阪) で 4 °C にて 1 晩反応させて抗原賦活化を行った。そして ALP 基質溶液 (ファーストレッド: ニチレイバイオサイエンス, 東京) で室温にて 20 分間反応させた。なお対比染色は行わなかった。von Kossa 染色は紫外線下で 5 % 硝酸銀水溶液 (和光純薬, 大阪) に 20 分間反応させて水洗した後 5 % チオ硫酸ナトリウム水溶液 (和光純薬, 大阪) に 3 分間反応させた。そしてケルンエヒトロート水溶液 (武藤化学, 東京) で対比染色を行った。

4. 免疫組織化学的検索

組織学的検索と同様に、切片を作製し、脱パラフィン後に抗原賦活化としてマイクロウェーブ (500 W) でクエン酸ナトリウム緩衝液 (pH 6.0: 三菱化学ヤトロン, 東京) を用いて 5 分間、加熱処理をした。その後 3 % 過酸化水素水 (和光純薬, 大阪) で内因性ペルオキシダーゼの除去を行った。一次抗体は抗ヒト Ki-67 マウスモノクローナル抗体 (1/50: DakoCytomation, USA), 抗ヒト I 型コラーゲン (Col-I) マウスモノクローナル抗体 (1/50: 第一ファインケミカル, 富山), 抗ヒトオステオポンチン (OPN) マウスモノクローナル抗体 (2 μ g/ml: 免疫生物研究所, 群馬), 抗ウシオステオカルシン (OC) マウスモノクローナル抗体 (2.5 μ g/ml: タカラバイオ, 滋賀) を用いた²⁴⁻²⁷⁾。一次抗体の反応条件は抗ヒト Ki-67 マウスモノクローナル抗体が室温で 1 時間、抗ヒト Col-I マウ

スモノクローナル抗体、抗ヒト OPN マウスモノクローナル抗体、抗ウシ OC マウスモノクローナル抗体は 4 °C で 1 晩、行った。二次抗体は免疫染色キット (ヒストファイン SAB-PO: ニチレイバイオサイエンス, 東京) を用いて室温で 10 分間行った。そしてペルオキシダーゼ標識ストレプトアビジンは室温で 5 分間反応させ、発色は Diaminobentidin (シンプルステイン DAB: ニチレイバイオサイエンス, 東京) にて室温で 20 分間行った。対比染色にはヘマトキシリン染色を用いた。

結 果

1. 移植片の作製

HABPCs は紡錘形を示し、100 mm の培養皿上に約 7 日間でコンフルエントに達する細胞増殖能があった (図 1a)。そして細胞播種を繰り返すことにより HABPCs を積層することができた (図 1b)。トリプシンにより培養皿から積層した HABPCs をシート状に浮遊させても、細胞シートは崩れることなく、その形状を保っていた。そして、その細胞シートはピンセットで操作するのに十分な強度があり、細胞シートを折りたたんで移植片を作製することが可能であった (図 2)。また移植片の強度は、細胞シートを折りたたんだ直後では移植片の形態を保つことができなかった。その後、移植片は徐々に収縮し、作製してから 3 日目になるとピンセットで把持しても移植片の形態を保つことのできる物性を持ち、大きさは約 10 × 5 mm で厚みは約 1.5 mm あった (図 3)。

2. 組織学的所見

移植片の組織は培養皿に接していた側では細胞外基質が主であり、非接触側では細胞成分に富んでいた。移植片内の HABPCs は小型の細胞で濃縮した核を持ち、細胞質は少なかった。組織内には細胞シートを折りたたんだ際にできたと思われる層構造が認められた (図 4)。

3. 免疫組織化学的所見

Col-I 陽性反応は組織全体に観察され、HABPCs はコラーゲンを足場に使っていた (図 5)。ALP 陽性反応も全体に観察されたが、細胞成分に富んでいた培養皿非接触側に強い反応が見られた (図 6)。細胞増殖マーカーである Ki-67 陽性反応は培養皿非接触側の細胞核に認められた。また OPN, OC, von Kossa の陽性所見はわずかであったため移植片内での局在は明確でなかった (図 7)。

図 1 HABPCs の位相差顕微鏡所見

- a : 細胞播種してから 7 日目の HABPCs。ほぼコンフルエントに達していた (×40)。
b : 細胞シート形成直前の HABPCs。HABPCs が積層していた (×40)。

図 2 移植片作製前の細胞シートの肉眼所見

ピンセットで操作できる強度が認められた。

考 察

今回、我々が用いた骨膜は骨の発生、成長、再生に重要な役割をはたす組織である。構造は単一の組織ではなく、外層に緻密な膠原線維を主体とする線維層があり、骨側には骨形成層と呼ばれる組織がある。線維層は線維芽細胞や細胞外基質を含んでおり、骨形成層は骨芽細胞、骨細胞へ分化する能力のある細胞を含んでいるといわれている。採取した骨膜片の切片を作製し、観察したところ、骨形成層や線維層と思われる部

図 3 移植片の肉眼所見

- a : 移植片はピンセットで把持しても、形態が崩れない強度を有していた。
b : 大きさは約 10×5 mm で厚みは約 1.5 mm であった。

位が含まれており、使用した HABPCs には骨芽細胞や線維芽細胞といった様々な細胞が存在していると考えられる。骨膜には幹細胞と思われる細胞が存在しているという報告もあることから²⁸⁾、今後、HABPCs の特性について更なる研究が必要である。

また細胞は単独または複合体として機能して複雑な情報ネットワークを形成しており、これらの細胞内外の情報伝達に関係するシグナル分子の数は膨大であり、解明されていないことも多い。そのため HABPCs のように骨膜を構成している多様な細胞を用いることは細胞間コミュニケーションにとって有益であり、容易に細胞間コミュニケーションを模倣できると思われる。

図 4 HE 所見

a : 弱拡大所見 (×40) b : 培養皿非接触側 (×200) c : 培養皿接触側 (×200)

図 5 Col- I 陽性反応所見

a : 弱拡大所見 (×40) b : 培養皿非接触側 (×200) c : 培養皿接触側 (×200)

図 6 ALP 陽性反応所見

a : 弱拡大所見 (×40) b : 培養皿非接触側 (×200) c : 培養皿接触側 (×200)

図 7 移植片の機能

a : Ki-67 陽性反応所見 (×200) b : OPN 陽性反応所見 (×200)
c : OC 陽性反応所見 (×200) d : von Kossa 陽性反応所見 (×200)

骨芽細胞の分化の初期には Col-I のマトリックスが形成される。その後、骨特異的 ALP, 続いてオステオネクチン, OPN, OC などの遺伝子発現, タンパク量が上昇する。最終的には産生された骨基質は細胞外へ沈着していくといわれている²⁹⁻³²⁾。また骨膜は骨折後に骨形成層の細胞が増殖し, Col-I や OPN などの遺伝子の強い発現があり, 細胞外基質の合成が盛んに行われる³³⁻³⁵⁾。さらに骨付近の細胞は OC 遺伝子を発現しており, 成熟した骨芽細胞まで分化が進んでいるといわれている^{34,35)}。作製した移植片は顕著な Col-I と ALP 陽性反応がみられ, 若干の OPN, OC の陽性反応が観察された。このことから, この移植片には分化がある程度進んだ骨芽細胞が存在しており, 骨折時の骨膜反応に類似していると思われる。細胞増殖能の検索には proliferating cell nuclear antigen (PCNA) や Ki-67 などが用いられる。PCNA は DNA 複製に中心的役割を演じる DNA polymerase δ を活性化させるのに必須の補助タンパクである。しかし半減期が約 24 時間と長く, 増殖細胞で合成された PCNA の 40% が G₀ 期に入った 48 時間後でも検出され, 核染色所見や染色強度に多様性があるといわれている。Ki-67 は増殖細胞の核小体および核分裂期の染色体に存在しているが, その機能は不明である。半減期は約 20 分と短いために増殖細胞に対する特異性が高いといわれている³⁶⁾。我々は細胞増殖マーカーとして Ki-67 を用いたが, 培養皿非接触側, つまり培養液に接しやすい部分で陽性反応が多く見られた。これは, その部分に十分な培養液が供給されたためと考えられ, 今後は移植片を作製した後の培養方法や, 生体に移植した場合にこの違いがどのような影響を及ぼすかを考慮しなければならない。

細胞シートを用いた研究は数多く行われてきているが³⁷⁻⁴²⁾, 多層に細胞を培養することにより強固な細胞シートを形成して細胞シートを折りたたむことができるようになり, 今までにない厚みをもった移植片を作成することが可能となった。この方法は細胞シートの大きさを変えることにより移植片の大きさを, 細胞シートの折りたたみ方を変えることにより移植片の厚みを自由に決められるために, 組織再生量を自在にコントロールすることができると思われる。このような三次元構造を形成できることになると, この移植片を再生療法に使用した場合, より多様な骨欠損に応用できると考えられる。そしてこの移植片の足場は自己由来のコラーゲンで構成されており, 生体親和性に優れた移植片であると思われる。移植片の強度もピンセットで把持できる強度があり, キャリアを用いる必要がなく操作性にも優れていたが, 生体内に移植した

場合に組織再生にとって必要な空間をどこまで確保できるかは, 今後検討しなければならないと考えられる。

以上のことから, 作製した移植片は自己由来の細胞と足場をもった優れた移植材と考えられる。しかし移植片が厚くなればなるほど培養組織では酸素や栄養供給が問題となり, 内部の細胞がネクロシスを生じない移植片の厚みや, その工夫は今後の研究課題であると思われる。移植片の培養期間により移植片の特徴が変化し, 治療効果にも影響を及ぼすと考えられるが, 培養期間は移植片の厚みとも関係しているために合わせて検討を行う必要がある。また細胞シートを形成するのに 4 週間という長い期間がかかっており, さらに効率よく強固な細胞シートの形成方法を見出すことも必要であると考えられる。最後に, この移植片を臨床応用するためには, 生体に対するリスクを最小限にしなければならない。そこで問題となることとして培養に用いられる血清, 基本培地などの生体に対する影響がある。そのために, より安全な血清もしくは無血清による培養研究, 移植片に残存する不純物による影響を検討することも重要であると考えられる。

謝 辞

稿を終えるにあたり, 終始御懇篤なる御指導と御校閲を賜りました本学人体構造学講座組織学分野高橋 理教授に深甚なる感謝の意を表します。また本研究に対し多くの御教示と御校閲を戴きました口腔治療学講座歯科保存学分野寺中敏夫教授に深く感謝の意を表します。

本研究の遂行に対し, 御理解と御支援を戴きました口腔治療学講座歯周病学分野の諸先生方に感謝致します。

本研究の一部は平成 17 年度科学研究費基盤研究 (C) 課題番号 17592171 の補助を受けて行いました。

本論文の要旨は, 第 48 回秋季日本歯周病学会学術大会 (平成 17 年 9 月 22 日) において発表した。

文 献

- 1) Melcher AH : On the repair potential of periodontal tissues. J Periodontol, 47 : 256-260, 1976.
- 2) Egelberg J : Regeneration and repair of periodontal tissues. J Periodont Res, 22 : 233-242, 1987.
- 3) Pitaru S, McCulloch CA, Narayanan SA : Cellular origins and differentiation control mechanisms during periodontal development and wound healing. J Periodont Res, 29 : 81-94, 1994.
- 4) Cochran DL, Wozney JM : Biological mediators for periodontal regeneration. Periodontol 2000, 1999 :

- 40-58, 1999.
- 5) Nyman S, Lindhe J, Karring T, Rylander H : New attachment following surgical treatment of human periodontal disease. *J Clin Periodonto*, 9 : 290-296, 1982.
- 6) Heijl L : Periodontal regeneration with enamel matrix derivative in one human experimental defect A case report. *J Clin Periodontol*, 24 : 693-696, 1997.
- 7) Tonetti MS, Lang NP, Cortellini P, Suvan JE, Adri-aens P, Dubravec D, Fonzar A, Fourmouis I, May-field L, Rossi R, Silvestri M, Tiedemann C, Topoll H, Vangsted T, Wallkamm B : Enamel matrix pro-teins in the regenerative therapy of deep intra-bony defects : A multicentre randomized control-led clinical trial. *J Clin Periodontol*, 29 : 317-325, 2002.
- 8) Murphy KG, Gunsolley JC : Guided tissue regen-eration for the treatment of periodontal intrabony and furcation defects. A systematic review. *Ann Periodontol*, 8 : 266-302, 2003.
- 9) Reynolds MA, Aichelmann-Reidy ME, Branch-Mays GL, Gunsolley JC : The efficacy of bone re-placement grafts in the treatment of periodontal os-seous defects. A systematic review. *Ann Peri-odontol*, 8 : 227-265, 2003.
- 10) Masters LB, Mellonig JT, Brunsvold MA, Num-mikoski PV : A clinical evaluation of demineralized freeze-dried bone allograft in combination with tet-racycline in the treatment of periodontal osseous defects. *J Periodontol*, 67 : 770-781, 1996.
- 11) Yukna RA, Evans GH, Scott JB, Callan DP, Moore K, Krauser JT, Cruz R, Aichelmann-Reidy ME : Multi-Center Clinical Evaluation of Combination Anorganic Bovine-Derived Hydroxyapatite Matrix (ABM) /Cell Binding Peptide (P-15) as a Bone Re-placement Graft Material in Human Periodontal Os-seous Defects. 6-Month Results. *J Periodontol*, 69 : 655-663, 1998.
- 12) Movin S, Borring-Moller G : Regeneration of infra-bony periodontal defects in humans after implanta-tion of allogenic demineralized dentin. *J Clin Periodontol*, 9 : 141-147, 1982.
- 13) Kim CK, Choi EJ, Cho KS, Chai JK, Wikesj • UME : Periodontal repair in intrabony defects treated with a calcium carbonate implant and guided tis-sue regeneration. *J Periodontol*, 67 : 1301-1306, 1996.
- 14) Mora F, Ouhayoun JP : Clinical evaluation of natu-ral coral and porous hydroxyapatite implants in periodontal bone lesions : results of a 1-year fol-low-up. *J Clin Periodontol*, 22 : 877-884, 1995.
- 15) Ong MMA, Shyr Y, Wang HL, Eber RM, Korsnes MI, MacNeil RL, Glickman GN : Evaluation of a bio-active glass alloplast in treating periodontal intra-bony defects. *J Periodontol*, 69 : 1346-1354, 1998.
- 16) Shahmiri S, Singh IJ, Stahl SS : Clinical response to the use of the HTR polymer implant in human in-trabony lesions. *Int J Periodontics Restorative Dent*, 12 : 294-299, 1992.
- 17) Yukna RA : Clinical evaluation of coralline calcium carbonate as a bone replacement graft material in human periodontal osseous defects. *J Periodontol*, 65 : 177-185, 1994.
- 18) Langer R, Vacanti JP : Tissue engineering. *Sci-ence*, 260 : 920-926, 1993.
- 19) Murakami S, Takayama S, Kitamura M, Shimabu-kuro Y, Yanagi K, Ikezawa K, Saho T, Nozaki T, Okada H : Recombinant human basic fibroblast growth factor (bFGF) stimulates periodontal re-generation in class II furcation defects created in beagle dogs. *J Periodont Res*, 38 : 97-103, 2003.
- 20) Yamada Y, Boo JS, Ozawa R, Okazaki Y, Ueda M, Nagasaka T, Hata KI : Bone regeneration follow-ing injection of mesenchymal stem cells and fibrin glue with a biodegradable scaffold. *J Craniomaxillo-fac Surg*, 31 : 27-33, 2003.
- 21) Kawaguchi H, Hirachi A, Hasegawa N, Iwata T, Ha-maguchi H, Shiba H, Kurihara H, Takata T, Kato Y : Enhancement of periodontal tissue regenera-tion by transplantation of bone marrow mesenchy-mal stem cells. *J Periodontol*, 75 : 1281-1287, 2004.
- 22) Okuda K, Momose M, Murata M, Saito Y, Yoshie H, Inoie M, Shinohara C, Wolff LF : Treatment of chronic desquamative gingivitis using tissue-engi-neered human cultured gingival epithelial sheets : A case report. *Int J Periodontics Restorative Dent*, 24 : 119-125, 2004.
- 23) Kawase T, Sato S, Miake K, Saito S : Alkaline phos-phatase of human periodontal ligament fibroblast-like cells. *Adv Dent Res*, 2 : 234-239, 1988.
- 24) Aoki T, Karakida K, Ota Y, Otsuru M, Kaneko A, Tsukinoki K : Expression of cyclooxygenase-2, Bcl-2 and Ki-67 in pleomorphic adenoma with spe-cial reference to tumor proliferation and apoptosis. *Oral Oncol*, 40 : 954-959, 2004.
- 25) Sakamoto R, Nitta T, Kamikawa Y, Kono S, Kami-kawa Y, Sugihara K, Tsuyama S, Murata F : Histo-chemical, immunohistochemical, and ultrastructu-ral studies of gingival fibromatosis : A case report. *Med Electron Microsc*, 35 : 248-254, 2002.
- 26) Gotoh M, Sakamoto M, Kanetaka K, Chuuma M, Hi-rohashi S : Overexpression of osteopontin in hepa-tocellular carcinoma. *Pathology Int*, 52 : 19-24,

- 2002.
- 27) Su M, Tokairin T, Nishikawa Y, Yoshioka T, Takahashi O, Watanabe H, Doi Y, Omori Y, Yoshioka T, Sageshima M, Tanaka T, Enomoto K : Primary osteosarcoma of the uterine corpus : Case report and review of the literature. *Pathology Int*, 52 : 158–163, 2002.
- 28) Sakaguchi Y, Sekiya I, Yagishita K, Muneta T : Comparison of human stem cells derived from various mesenchymal tissues : Superiority of synovium as a cell source. *Arthritis Rheum*, 52 : 2521–2529, 2005.
- 29) Butler WT, Ritchie H : The nature and functional significance of dentin extracellular matrix proteins. *Int J Dev Biol*, 39 : 169–179, 1995.
- 30) Ohgushi H, Caplan AI : Stem cell technology and bioceramics : From cell to gene engineering. *J Biomed Mater Res*, 48 : 913–927, 1999.
- 31) Lekic P, Sodek J, McCulloch CAG : Relationship of cellular proliferation to expression of osteopontin and bone sialoprotein in regenerating rat periodontium. *Cell Tissue Res*, 285 : 491–500, 1996.
- 32) Liu F, Malaval L, Gupta AK, Aubin JE : Simultaneous detection of multiple bone-related mRNAs and protein expression during osteoblast differentiation : Polymerase chain reaction and immunocytochemical studies at the single cell level. *Dev Biol*, 166 : 220–234, 1994.
- 33) Nakazawa T, Nakajima A, Okawa A, Moriya H, Yamazaki M, Seki N, Kato M, Amizuka N, Einhorn TA : Gene expression of periostin in the early stage of fracture healing detected by cDNA microarray analysis. *J Orthop Res*, 22 : 520–525, 2004.
- 34) Yamazaki M, Majeska RJ, Yoshioka H, Moriya H, Einhorn TA : Spatial and temporal expression of fibril-forming minor collagen genes (types V and XI) during fracture healing. *J Orthop Res*, 15 : 757–764, 1997.
- 35) Yamazaki M, Nakajima F, Ogasawara A, Moriya H, Majeska RJ, Einhorn TA : Spatial and temporal distribution of CD 44 and osteopontin in fracture callus. *J Bone Joint Surg Br*, 81 : 508–515, 1999.
- 36) Rose DSC, Maddox PH, Brown DC : Which proliferation markers for routine immunohistology? A comparison of five antibodies. *Journal of Clinical Pathology*, 47 : 1010–1014, 1994.
- 37) Okano T, Yamada N, Sakai H, Sakurai Y : A novel recovery system for cultured cells using plasma-treated polystyrene dishes grafted with poly (N-isopropylacrylamide). *J Biomed Mater Res*, 27 : 1243–1251, 1993.
- 38) Kushida A, Yamato M, Konno C, Kikuchi A, Sakurai Y, Okano T : Decrease in culture temperature releases monolayer endothelial cell sheets together with deposited fibronectin matrix from temperature-responsive culture surfaces. *J Biomed Mater Res*, 45 : 355–362, 1999.
- 39) Yamato M, Utsumi M, Kushida A, Konno C, Kikuchi A, Okano T : Thermo-responsive culture dishes allow the intact harvest of multilayered keratinocyte sheets without dispase by reducing temperature. *Tissue Eng*, 7 : 473–480, 2001.
- 40) Shimizu T, Yamato M, Kikuchi A, Okano T : Cell sheet engineering for myocardial tissue reconstruction. *Biomaterials*, 24 : 2309–2316, 2003.
- 41) Nishida K, Hayashida Y, Watanabe K, Maeda N, Watanabe H, Yamamoto K, Tano Y, Yamato M, Nagai S, Kikuchi A, Okano T : Functional bioengineered corneal epithelial sheet grafts from corneal stem cells expanded ex vivo on a temperature-responsive cell culture surface. *Transplantation*, 77 : 379–385, 2004.
- 42) Hasegawa M, Ishikawa I, Yamato M, Kikuchi A, Okano T : Human periodontal ligament cell sheets can regenerate periodontal ligament tissue in an athymic rat model. *Tissue Eng*, 11 : 469–478, 2005.