

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局



(43) 国際公開日
2008年9月18日 (18.09.2008)

PCT

(10) 国際公開番号
WO 2008/111530 A1

- (51) 国際特許分類:
A61K 35/12 (2006.01) A61L 27/00 (2006.01)
A61K 35/44 (2006.01)
- (21) 国際出願番号: PCT/JP2008/054207
- (22) 国際出願日: 2008年3月7日 (07.03.2008)
- (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2007-061025 2007年3月9日 (09.03.2007) JP
- (71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 国立大学法人東京医科歯科大学 (NATIONAL UNIVERSITY CORPORATION, TOKYO MEDICAL AND DENTAL UNIVERSITY) [JP/JP]; 〒1138510 東京都文京区湯島1丁目5番45号 Tokyo (JP). 財団法人ヒューマンサイエンス振興財団 (THE JAPAN HEALTH SCIENCES FOUNDATION) [JP/JP]; 〒1030001 東京都中央区日本橋小伝馬町13-4 共同ビル4階 Tokyo (JP).
- (72) 発明者; および
- (75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 岸田 晶夫 (KISHIDA, Akio) [JP/JP]; 〒1138510 東京都文京区湯島1丁目5番45号 国立大学法人東京医科歯科大学内 Tokyo (JP). 木村 剛 (KIMURA, Tsuyoshi) [JP/JP]; 〒1138510 東京都文京区湯島1丁目5番45号 国立大学法人東京医科歯科大学内 Tokyo (JP). 小林 尚 俊 (KOBAYASHI, Hisatoshi) [JP/JP]; 〒3050047 茨城県つくば市千現一丁目2番1号 独立行政法人物質材料研究機構内 Ibaraki (JP). 藤里 俊哉 (FUJISATO, Toshiya) [JP/JP]; 〒5658565 大阪府吹田市藤白台5-7-1 国立循環器病センター内 Osaka (JP).
- (74) 代理人: 正林 真之 (SHOBAYASHI, Masayuki); 〒1700013 東京都豊島区東池袋1丁目25番8号 タカセビル本館 Tokyo (JP).
- (81) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の国内保護が可能): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, 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: METHOD OF PREPARING DECELLULARIZED SOFT TISSUE, GRAFT AND CULTURE MATERIAL

(54) 発明の名称: 脱細胞化軟組織の調製方法、移植片、及び培養部材

(57) Abstract: It is intended to provide a method of preparing a decellularized soft tissue whereby swelling after an ultrahigh pressure treatment can be inhibited, etc. The above-described method of preparing a decellularized soft tissue comprises the application step wherein an ultrahigh hydrostatic pressure is applied to an isolated soft tissue in a medium to thereby disrupt cells in the soft tissue, and the removal step wherein the disrupted cells are removed. As the medium, use is made of an aqueous solution containing a water-soluble polysaccharide such as dextran.

(57) 要約: 本発明の課題は、超高压処理後の膨潤を抑制できる脱細胞化軟組織の調製方法等を提供することである。本発明に係る脱細胞化軟組織の調製方法は、単離された軟組織に媒体中で超高静水圧を印加することで、軟組織内の細胞を破壊する印加手順と、破壊された細胞を除去する除去手順と、を含む。媒体は、デキストラン等の水溶性多糖を含有する水溶液である。



WO 2008/111530 A1

明 細 書

脱細胞化軟組織の調製方法、移植片、及び培養部材

技術分野

[0001] 本発明は、動物に移植される移植片、及びこの移植片に適した軟組織の調製方法に関する。

背景技術

[0002] 従来、動物に移植される移植片の作製方法としては、生体組織をグルタルアルデヒド等の固定剤で化学処理する方法、又は生体組織から細胞成分を除去する方法が、広く使用され、臨床的に応用されている。

[0003] 例えば、角膜移植を所望する患者は、全世界に100万人以上と見積もられている。しかし、多くの国々において、提供される眼球が不足しているため、角膜移植を受けられる患者数は年間約6万人程度にとどまっている。我が国においても、日本アイバンク協会に登録されている移植待機患者数が約5000人であるのに対し、献眼者数は約1000人、利用可能眼球数は約1500個である。

[0004] しかも、現在の角膜移植医療では、他人の角膜を移植する同種移植が採用されているため、原疾患による拒絶反応が問題となる。そこで、このような問題の抜本的な解決手段として、人工角膜の開発が待望されている。

[0005] 人工角膜の素材としては、ポリメチルメタクリレート(PMMA)、ポリテトラフルオロエチレン(PTFE)、ポリビニルアルコール(PVA)等の合成高分子が試みられている。しかし、これら素材と角膜組織との適合性が小さいため、生体角膜と人工角膜との接合部位における脱落や感染症が発生する場合がある。

[0006] そこで、生体組織との適合性を向上するべく、生体組織から細胞を除去して残存する支持組織である脱細胞化組織を、移植片として使用する技術が近年開発された。脱細胞化組織は、合成高分子に比べ、生体組織に近似した物性を有するため、生体組織との適合性に優れる。

[0007] 従来の細胞除去方法としては、界面活性剤やタンパク質分解酵素等の薬液を生体組織に適用する化学的手法や、生体組織に対して5000気圧以上の超高压を水中

で印加する超高压処理法(特許文献1参照)が存在する。後者の方法は、感染症の防止が必ずしも確保されていないこと、移植後に薬剤を除去する必要があることといった前者の方法が有する問題を解決できる点で有利である。

特許文献1:WO2004-24170号パンフレット

発明の開示

発明が解決しようとする課題

[0008] しかしながら、前述した特許文献1に示される方法では、生体組織として軟組織を使用した場合、超高压処理後の組織が大幅に膨潤するため、組織特性が低下するという問題がある。

[0009] 本発明は、以上の実情に鑑みてなされたものであり、超高压処理後の膨潤を抑制できる脱細胞化軟組織の調製方法、この脱細胞化軟組織からなる移植片、及び脱細胞化軟組織を備える培養部材を提供することを目的とする。

課題を解決するための手段

[0010] 本発明者らは、軟組織への超高压静水圧の印加を、水溶性多糖を含有する水溶液中で行うことにより、組織の膨潤を抑制できることを見出し、本発明を完成するに至った。本発明は、具体的には、以下のようなものを提供する。

[0011] (1) 動物由来の軟組織が脱細胞化された脱細胞化軟組織の調製方法であって、単離された軟組織に媒体中で超高压静水圧を印加することで、前記軟組織内の細胞を破壊する印加手順と、

破壊された細胞を除去する除去手順と、を含み、

前記媒体は、水溶性多糖を含有する水溶液である調製方法。

[0012] (2) 前記水溶性多糖は、デキストラン、アルギン酸、ヒアルロン酸、トレハロース、2-メタクリロイルオキシエチルホスホリルコリン、ポリビニルピロリドンからなる群より選ばれる少なくとも1種である(1)記載の調製方法。

[0013] (1)又は(2)の発明によれば、印加手順において軟組織内の細胞が破壊され、破壊された細胞が除去手順において除去されるため、脱細胞化軟組織が得られる。

ここで、印加手順における媒体として、水溶性多糖を含有する水溶液を採用したので、超高压処理の印加後における軟組織の膨潤を抑制できる。

[0014] (3) 前記超高静水圧は、1000気圧以上である(1)又は(2)記載の調製方法。

[0015] 軟組織に印加される圧力が不足すると、軟組織内に存在する常在菌の細胞の破壊が不十分となり、調製された脱細胞化軟組織に常在菌が残存するおそれがある。

そこで(3)の発明によれば、超高静水圧を1000気圧以上としたので、常在菌の細胞が十分に破壊され、脱細胞化組織への常在菌の残存が抑制される。よって、安全性を向上できる。

[0016] (4) 前記印加手順は、前記媒体の温度を、前記超高静水圧における前記媒体の融点以上に保持する温度保持手順を有する(1)から(3)いずれか記載の調製方法。

[0017] (4)の発明によれば、媒体の温度が超高静水圧における融点以上に保持されるので、超高静水圧まで昇圧された条件においても、媒体の凝固が抑制される。これにより、脱細胞化組織の構造や特性の損傷を抑制できる。

[0018] (5) 前記印加手順は、前記媒体に印加される印加圧が、前記媒体の融解圧以上になることを制限する圧力制限手順を有する(1)から(4)いずれか記載の調製方法。

[0019] (5)の発明によれば、印加圧が媒体の融解圧未満に調節されるので、印加手順における昇圧及び降圧の過程での媒体の凝固が抑制される。これにより、脱細胞化組織の構造や特性の損傷を抑制できる。

[0020] (6) 前記軟組織は、角膜である(1)から(5)いずれか記載の調製方法。

[0021] 角膜由来の脱細胞化組織は、膨潤すると光透過性が低下するため、動物への移植後における有用性が低下する。

(6)の発明によれば、軟組織として角膜を採用したので、角膜由来の脱細胞化組織の膨潤が抑制される。これにより、動物への移植後における有用性を向上できる。

[0022] (7) 動物に移植される移植片であって、

(1)から(6)いずれか記載の調製方法で調製された脱細胞化軟組織を備える移植片。

[0023] (8) 前記脱細胞化軟組織上に位置し、前記動物において前記軟組織に隣接する隣接組織を更に備える(7)記載の移植片。

[0024] (9) (1)から(6)いずれか記載の調製方法で調製された脱細胞化軟組織を備え、前記動物において前記軟組織に隣接する隣接組織の細胞を培養するために用いら

れる培養部材。

発明の効果

[0025] 本発明によれば、印加手順において軟組織内の細胞が破壊され、破壊された細胞が除去手順において除去されるため、脱細胞化軟組織が得られる。ここで、印加手順における媒体として、水溶性多糖を含有する水溶液を採用したので、超高压処理の印加後における軟組織の膨潤を抑制できる。

図面の簡単な説明

[0026] [図1]本発明の一実施形態に係る調製方法で調製される脱細胞化組織の概略構成図である。

[図2]本発明の一実施例に係る調製方法で調製した脱細胞化組織の膨潤度及び脱細胞化の程度を示す図である。

[図3]本発明の一実施例に係る調製方法で調製した脱細胞化組織の膨潤度の程度を示す図である。

[図4]本発明の一実施例に係る調製方法で調製した脱細胞化組織の透明性を示す図である。

[図5]本発明の一実施例に係る調製方法で調製した脱細胞化組織の透過率を示すグラフである。

[図6]本発明の一実施例に係る調製方法で調製した脱細胞化組織の力学的特性を示すグラフである。

[図7]本発明の一実施例に係る移植片の移植直後における状態を示す図である。

[図8]本発明の一実施例に係る移植片の移植8週間後における状態を示す図である。

[図9]本発明の一実施例に係る移植片の移植8週間後における定着状態を示す図である。

[図10]本発明の一実施例に係る移植片を移植した際の隣接組織の再生状態を示す図である。

発明を実施するための形態

[0027] 以下、本発明の実施形態について説明するが、本発明を限定することを意図する

ものではない。

[0028] <調製方法>

本発明の脱細胞化組織の調製方法は、印加手順と、除去手順とを含む。各手順の詳細を以下に説明する。

[0029] [印加手順]

印加手順は、単離された軟組織に媒体中で超高静水圧を印加することで、軟組織内の細胞を破壊する手順である。使用される軟組織としては、特に限定されないが、例えば、角膜、軟骨、気管、心膜、羊膜、及び皮膚が挙げられる。

[0030] ここで、超高静水圧は、軟組織に存在する常在菌の細胞を破壊できるとされる静水圧を指し、具体的には1000気圧以上であることが好ましい。また、超高静水圧は、軟組織に存在する細菌を破壊できる点で4000気圧以上であることがより好ましく、ウイルスを破壊できる点で6000気圧以上であることが更に好ましい。

[0031] 本発明で使用される媒体は、水溶性多糖を含有する水溶液である。この媒体中で超高静水圧の印加を行うことで、印加手順後における組織の膨潤を大幅に抑制できる。

[0032] 水溶性多糖としては、特に限定されないが、例えば、デキストラン、アルギン酸、ヒアルロン酸、トレハロース、2-メタクリロイルオキシエチルホスホリルコリン、ポリビニルピロリドンが挙げられる。これら水溶性多糖は、1種単独で又は複数種を混合して使用されてよい。

[0033] 水溶液における水溶性多糖の濃度は、印加される超高静水圧値、使用される軟組織の種類等に応じ、許容される範囲内に膨潤度を制限できるよう適宜設定されてよい。例えば、軟組織として角膜を使用する場合、水溶性多糖(例えば、デキストラン)の濃度は、通常1質量%以上10質量%以下であってよい。

[0034] 具体的な手順としては、例えば、まず、水不透過性フィルムの袋内に水溶性多糖を含有する水溶液を満たし、この水溶液に軟化組織を湿潤させる。そして、内部に気体が残留しないように留意しつつ、袋を厳重に密閉する。この袋を、超高静水圧処理装置(例えば、「Dr. CHEF(型式)」(神戸製鋼所社製))のチャンバー内に設置し、装置を作動させる。

[0035] なお、印加手順の時間は、所望の細胞破壊性が得られる限りにおいて特に限定されないが、通常10分～30分程度でよい。

[0036] (温度保持手順)

印加手順は温度保持手順を有することが好ましく、この温度保持手順は、媒体の温度を、超高静水圧における媒体の融点以上に保持する手順である。これにより、超高静水圧まで昇圧された条件においても、媒体の凝固が抑制され、調製される脱細胞化組織の構造や特性の損傷を抑制できる。

[0037] なお、媒体の温度は、高すぎると脱細胞化組織の構造や特性が低下するおそれがあることから、通常25℃～40℃であり、好ましくは30℃付近である。

[0038] 具体的な手順としては、まず、予め設定した超高静水圧値における媒体の融点を、媒体の組成に基づいて算出する。そして、超高静水圧処理装置を、そのチャンバー内温度が算出した融点以上となるように制御すればよい。媒体の温度は、一定値に固定してもよいし、媒体の融点以上の範囲で変動させてもよい。

[0039] (圧力制限手順)

印加手順は圧力制限手順を有することが好ましく、この圧力制限手順は、媒体に印加される印加圧が、媒体の融解圧以上になることを制限する手順である。印加圧の昇圧や降圧の開始時には、瞬間的に媒体の温度が急変し、軟組織の構造や特性が大きく損傷される場合がある。圧力制限手順では、媒体の組成に基づいて融解圧を予め算出し、特に印加圧の昇圧及び／又は降圧の速度を所定値以下に低減することで、媒体温度の急変を抑制する。これにより、昇圧及び降圧の過程での媒体の凝固が抑制され、脱細胞化組織の構造や特性の損傷をより抑制できる。

[0040] [除去手順]

除去手順は、破壊された細胞を除去する手順である。移植後において、破壊された細胞の残渣が免疫反応等を誘発することが懸念されるが、この懸念は除去手順により払拭される。

[0041] 除去の方式は、特に限定されないが、組織の構造や特性の低下を抑制できる適切な液で組織を洗浄すればよい。ここで使用される液としては、例えば、水溶性多糖を含有する水溶液、PBS水溶液、HEPES緩衝液、MES緩衝液、公知の細胞培養液

であってよいが、膨潤をより抑制できる点で、水溶性多糖を含有する水溶液が好ましい。

[0042] このようにして調製される脱細胞化組織の保存方式は、滅菌状態である限りにおいて特に限定されず、冷凍状態、液体内での湿潤状態、又は乾燥状態であってよい。保存方式が限定されないことは、本発明の脱細胞化組織の有利な点である。

[0043] <移植片>

本発明の脱細胞化組織は、動物に移植される移植片の構成として有用である。即ち、本発明の移植片は、前述の脱細胞化組織を備える。また、移植片は、脱細胞化組織が由来する軟組織が動物体内において隣接していた隣接組織を、脱細胞化組織上に備えてよい。例えば、脱細胞化組織(図1(B)参照)が由来する軟組織が角膜であった場合(図1(A)参照)、隣接組織は角膜上皮又は角膜内皮となる。

[0044] <培養部材>

本発明の脱細胞化組織は、隣接組織の細胞を培養するために用いられる培養部材としても有用である。即ち、本発明の培養部材は、前述した脱細胞化組織を備えるものであり、この脱細胞化組織上に隣接組織由来の細胞を載置し、適切な条件下で培養することで、特別な装置を使用する必要なく且つ感染を抑制しつつ、細胞培養を行うことができる。これらの点は、従来公知の培養シートや羊膜に比べて格別に有利な効果である。

実施例

[0045] <実施例1>

食用ブタ養殖場からブタ由来の角膜を購入し、4℃にて搬送した。この角膜をPBS溶液で洗浄した後、媒体としての3.5質量%デキストラン70を含むPBS溶液が満たされたポリエチレン製フィルムの袋内に湿潤させた。この袋を、「Dr. CHEF」(神戸製鋼所社製)のチャンバー内に載置し、温度を30℃に保持しつつ、4000気圧の静水圧を30分間印加した(印加手順)。この間、昇圧及び降圧速度がそれぞれ5000気圧/分となるように、「Dr. CHEF」を制御した(圧力制限手順)。その後、印加後の角膜をPBS溶液で72時間洗浄し、角膜内部の細胞を除去した(除去手順)。これにより、脱細胞化組織を調製した。

[0046] <実施例2>

印加圧を10000気圧の静水圧とした点を除き、実施例1と同様の手順で、脱細胞化組織を調製した。

[0047] <実施例3>

媒体の温度を10°Cとした点を除き、実施例2と同様の手順で、脱細胞化組織を調製した。

[0048] <比較例1>

実施例1で使用した角膜を、1w/v% SDSを含むPBS溶液に37°Cで24時間浸漬した後、PBS溶液に24時間浸漬した。これにより、脱細胞化組織を調製した。

[0049] <比較例2>

実施例1で使用した角膜を、1w/v%「TritonX-100」(登録商標)を含むPBS溶液に37°Cで24時間浸漬した後、PBS溶液に24時間浸漬した。これにより、脱細胞化組織を調製した。

[0050] <比較例3>

実施例1で使用した角膜を、1w/v% コール酸ナトリウムを含むPBS溶液に37°Cで24時間浸漬した後、PBS溶液に24時間浸漬した。これにより、脱細胞化組織を調製した。

[0051] <比較例4>

デキストラン70を含むPBS溶液の代わりに、デキストラン70を含まないPBS溶液を用いた点を除き、実施例1と同様の手順で脱細胞化組織を調製した。

[0052] [評価]

(膨潤度)

実施例及び比較例で調製した脱細胞化組織と、対照区として実施例で使用した印加前の角膜(未処理)とについて、膨潤の程度を観察した。この結果を図2及び図3に示す。図2における(A)は対照区、(B)は比較例1、(C)は比較例2、(D)は比較例3、(E)は実施例1、(F)は実施例2の結果をそれぞれ示す。また、(A)、(E)、(F)は、各脱細胞化組織の上面図であり、(B)、(C)、(D)は、各脱細胞化組織の側面図である。図3における左側は比較例4、右側は実施例1の結果を示す。

[0053] 図2(B)～(D)に示されるように、化学的処理で脱細胞化を行った比較例1～3の脱細胞化組織は、その膨潤が甚だしく、対照区における角膜(薄すぎるため、図示せず)の約3倍の膜厚となっていた。これに対して、実施例1及び2の脱細胞化組織は、対照区における角膜の約1.5倍の膜厚であった(図示せず)。従って、脱細胞化を超高静水圧で行うことで、従来技術に比べ、膨潤を格段に抑制できることが確認された。

[0054] また、図3に示されるように、実施例1の脱細胞化組織は、比較例4の脱細胞化組織よりもはるかに膜厚が小さかった。これにより、水溶性多糖を含有する水溶液中で超高静水圧を印加することで、膨潤を格段に抑制できることが確認された。しかも、実施例1の脱細胞化組織は、比較例4の脱細胞化組織よりも全体的に透明性が高いことから、水溶性多糖を含有する水溶液中で超高静水圧を印加することで、角膜の透明性を向上できることも分かった。

[0055] (脱細胞化の程度)

実施例及び比較例で調製した脱細胞化組織と、対照区として実施例で使用した印加前の角膜(未処理)との断面について、通常の手順でHE染色を行った。染色後の各組織断面の顕微鏡写真を図2に示す。(G)は対照区、(H)はSDSを用いた比較例、(I)はTritonX-100を用いた比較例、(J)はコール酸ナトリウムを用いた比較例、(K)は実施例1、(L)は実施例2の結果をそれぞれ示す。

[0056] 図2(G)～(J)に示されるように、対照区の角膜及び比較例の脱細胞化組織には、染色されたスポットが多数存在しており、細胞が十分に除去されていないことが分かる。これに対して、図2(K)、(L)に示されるように、実施例1、2の脱細胞化組織には、染色されたスポットが確認されず、細胞がほぼ完全に除去されたことが分かる。

[0057] 以上から、脱細胞化を超高静水圧で行うことで、膨潤を格段に抑制できるとともに、安全性も格段に向上できることが確認された。

[0058] (構造の保持)

生体角膜は、角膜内皮細胞のポンプ機能により約70%の膨潤度に調節され、その透明性が維持されていることが既に知られている。従って、角膜由来の脱細胞化組織を脱水により収縮させた際、透明性が回復するのであれば、移植後に膨潤度が調

節されて透明性が回復する可能性が高く、移植片としての応用可能性が示唆されることになる。

[0059] そこで、対照区の角膜と、実施例2で調製した脱細胞化組織とを、高張液である50%、100%グリセロール水溶液に24時間浸漬することで、脱水処理を行った。その後の角膜及び脱細胞化組織を観察した。この結果を図4に示す。なお、(A)は浸漬前の脱細胞化組織、(B)は50%グリセロール水溶液による処理後の脱細胞化組織、(C)は100%グリセロール水溶液による処理後の脱細胞化組織、(D)は100%グリセロール水溶液による処理後の角膜をそれぞれ示す。

[0060] (A)に示されるように、脱水処理前の脱細胞化組織は、白濁し、透明性が低かった。これに対し、(B)、(C)に示されるように、脱水が進行するにつれ、脱細胞化組織の白濁が解消され、透明性が回復した。従って、実施例2の脱細胞化組織は、その構造が破壊されている訳ではなく、移植後に自然に脱水し、その透明性を回復できることが示唆された。

[0061] 次に、各組織の透過性を数値化して、比較することを試みた。即ち、実施例2、3で調製した脱細胞化組織とを、100%グリセロール水溶液に72時間浸漬し脱水処理を行う前後において、波長600nmでの吸光度を測定することで透過率を測定した。また、対照区として、角膜(対照区1)、この角膜をPBS溶液中に72時間浸漬したもの(対照区2)、並びに3.5質量%デキストラン70を含有するPBS溶液に浸漬したもの(対照区3)をそれぞれ用意し、その透過率を併せて測定した。この結果を図5に示す。なお、Aは対照区1、Bは対照区2、Cは対照区3、Dは実施例3、Eは実施例4をそれぞれ示す。また、空白バーは脱水処理前の透過率、陰バーは脱水処理後の透過率を示す。

[0062] A、D、Eに示されるように、実施例2、3の脱細胞化組織はいずれも、脱水処理後に、その透過率が角膜と同等以上にまで回復することが確認された。従って、実施例2、3の脱細胞化組織は、その構造が破壊されている訳ではなく、移植後に自然に脱水し、その透明性を回復できることが示唆された。

[0063] 更に、実施例3の方が、実施例2よりも更に透過性が高かったことから、超高静水圧の印加を30°Cで行うことで、移植片としての有用性をより向上できることも示唆された

。

[0064] (力学強度)

次に、脱細胞化組織の力学的特性についての評価を行った。まず、実施例2、3で調製した脱細胞化組織と、これら脱細胞化組織を50%グリセロール水溶液に3日間浸漬し脱水処理を行ったものとの、それぞれ幅3mm、長さ15mmの短冊状に切り取り、この切片に対して、力学試験機「レオナーII」(山電社製)を用いて、種々の張力を負荷した際の応力を計測した。また、対照区として、角膜(対照区1)、この角膜をPBS溶液中に72時間浸漬したもの(対照区2)、並びに対照区2のものを100質量%グリセロールに1時間浸漬したもの(対照区3)をそれぞれ用意し、張力及び応力の関係を併せて測定した。この結果を図6(A)に示す。なお、図6(A)におけるAは実施例3、Bは実施例2、Cは実施例3の脱水処理後、Dは実施例2の脱水処理後、Eは対照区1、Fは対照区2、Fは対照区3をそれぞれ示す。

[0065] A～Dに示されるように、実施例2、3で調製した脱細胞化組織は、優れた応力を示すとともに、脱水処理後においても、角膜と同等以上に高い応力を示すことが確認された。従って、移植後に自然に脱水した後も、角膜と同等の強度を保持できることが示唆された。

[0066] 更に、切片の厚みを測定し、応力歪み特性から弾性率を算出した。この結果を図6(B)に示す。なお、図6(B)におけるAは対照区1、Bは対照区2、Cは実施例3、Dは実施例2を示し、空白バーは脱水処理前の弾性率、陰バーは脱水処理後の弾性率を示す。

[0067] A～Dに示されるように、実施例2、3で調製した脱細胞化組織は、優れた弾性率を示すとともに、脱水処理後においても、角膜と同等以上に高い弾性率を示すことが確認された。従って、移植後に自然に脱水した後も、角膜と同等の弾性率を保持でき、角膜の代替物としての機能を十分に発揮できることが示唆された。

[0068] (臨床1)

ウサギの角膜実質のみを、4箇所において部分的に切除した。一方、実施例2で調製した脱細胞化組織及び実施例2で使用した角膜を、切除部位と同じ大きさに切り取ることで、移植片を作製した。この移植片の各々を、切除部位に埋入し、残してお

いた角膜上皮を被せた。この時点におけるウサギの眼球の状態を図7に示す。その後、ウサギを通常の条件で8週間飼育した後、眼球の状態を再び観察した。この結果を図8に示す。図7及び8における1及び4で示される切除部位には角膜の移植片を、2及び3で示される切除部位には脱細胞化組織の移植片を、それぞれ埋入した。

[0069] 図7及び8に示されるように、角膜の移植片を埋入した切除部位1、4は、移植直後において透明性を有していたが、移植8週間後において白濁していた。一方、実施例2の脱細胞化組織の移植片を埋入した切除部位2、3は、移植直後においてやや白濁していたものの、移植8週間後には周囲と同等レベルにまで透明化していた。

[0070] 更に、移植8週間後の角膜を回収し、その切除部位1及び2における切断面について、それぞれHE染色を行った。染色後における顕微鏡写真を図9に示す。図9におけるAは切除部位1、Bは切除部位2における断面である。

[0071] 図9に示されるように、切除部位1では埋入された移植片の周囲に多数の細胞が湿潤していることが観察され、免疫反応が活発に発生していることが分かった。これに対して、切除部位2では、移植片の周囲における細胞の湿潤がほとんど観察されず、移植片が周囲組織に定着していることが確認された。

[0072] (臨床2)

角膜上皮を被せず、脱細胞化組織の移植片を露出させた点を除き、臨床1で述べると同様の手順で試験を行った。移植1週後、2週後、及び3週後において、フルオレセインナトリウムを、フローレンス試験紙を用いて眼球に滴下し、その後1～10分の間における眼球を蛍光照射下で観察した。なお、この蛍光色素は、角膜上皮を染色することはできず、角膜実質を染色できることが既に確認されている。この結果を図10の上段に示す。観察後は試薬を生理食塩水にて洗い流し、1週間ごとに繰り返し観察を行った。また、移植1週後、2週後、及び3週後における眼球を可視光下で観察した結果を図10の下段に示す。

[0073] 図10の上段に示されるように、移植1週間後では上皮が存在しないために移植片が蛍光色素で染色されていたが、2週間後では染色される移植片の部位が限定的になり、3週間後では染色された部位はほとんど観察されなかった。これにより、実施例2の脱細胞化組織は、隣接組織である角膜上皮を再生する能力を備えることが実証

された。

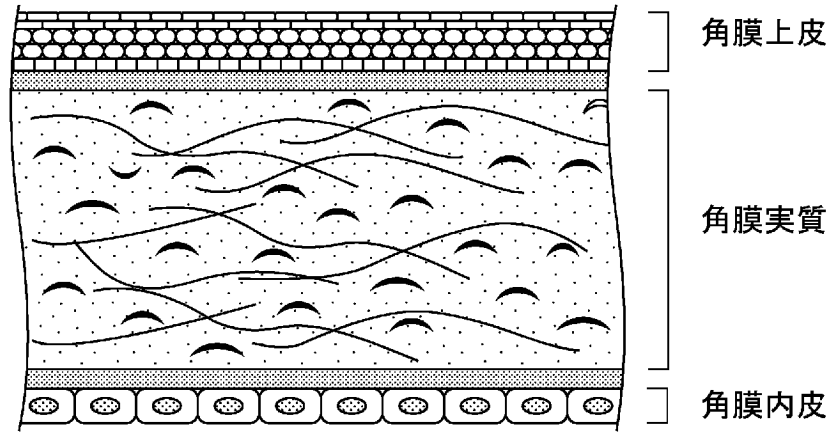
[0074] また、図10の下段に示されるように、移植1週間後では眼球の大部分が白濁していたが、2週間後では白濁部位が限定的になり、3週間後では眼球全体が透明になり、血管浸潤等の現象は観察されなかった。これにより、実施例2の脱細胞化組織は、移植後に透明性を回復する能力を備えることが実証された。

請求の範囲

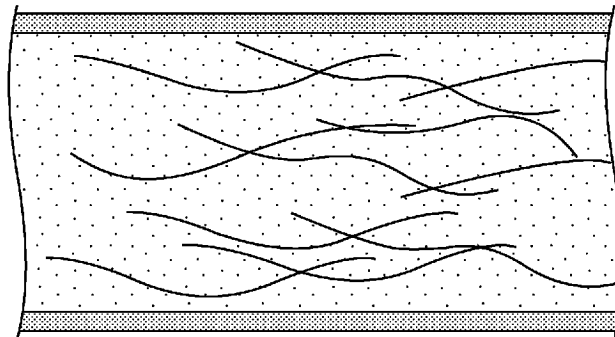
- [1] 動物由来の軟組織が脱細胞化された脱細胞化軟組織の調製方法であって、単離された軟組織に媒体中で超高静水圧を印加することで、前記軟組織内の細胞を破壊する印加手順と、破壊された細胞を除去する除去手順と、を含み、前記媒体は、水溶性多糖を含有する水溶液である調製方法。
- [2] 前記水溶性多糖は、デキストラン、アルギン酸、ヒアルロン酸、トレハロース、2-メタクリロイルオキシエチルホスホリルコリン、ポリビニルピロリドンからなる群より選ばれる少なくとも1種である請求項1記載の調製方法。
- [3] 前記超高静水圧は、1000気圧以上である請求項1又は2記載の調製方法。
- [4] 前記印加手順は、前記媒体の温度を、前記超高静水圧における前記媒体の融点以上に保持する温度保持手順を有する請求項1から3いずれか記載の調製方法。
- [5] 前記印加手順は、前記媒体に印加される印加圧が、前記媒体の融解圧以上になることを制限する圧力制限手順を有する請求項1から4いずれか記載の調製方法。
- [6] 前記軟組織は、角膜である請求項1から5いずれか記載の調製方法。
- [7] 動物に移植される移植片であって、請求項1から6いずれか記載の調製方法で調製された脱細胞化軟組織を備える移植片。
- [8] 前記脱細胞化軟組織上に位置し、前記動物において前記軟組織に隣接する隣接組織を更に備える請求項7記載の移植片。
- [9] 請求項1から6いずれか記載の調製方法で調製された脱細胞化軟組織を備え、前記動物において前記軟組織に隣接する隣接組織の細胞を培養するために用いられる培養部材。

[図1]

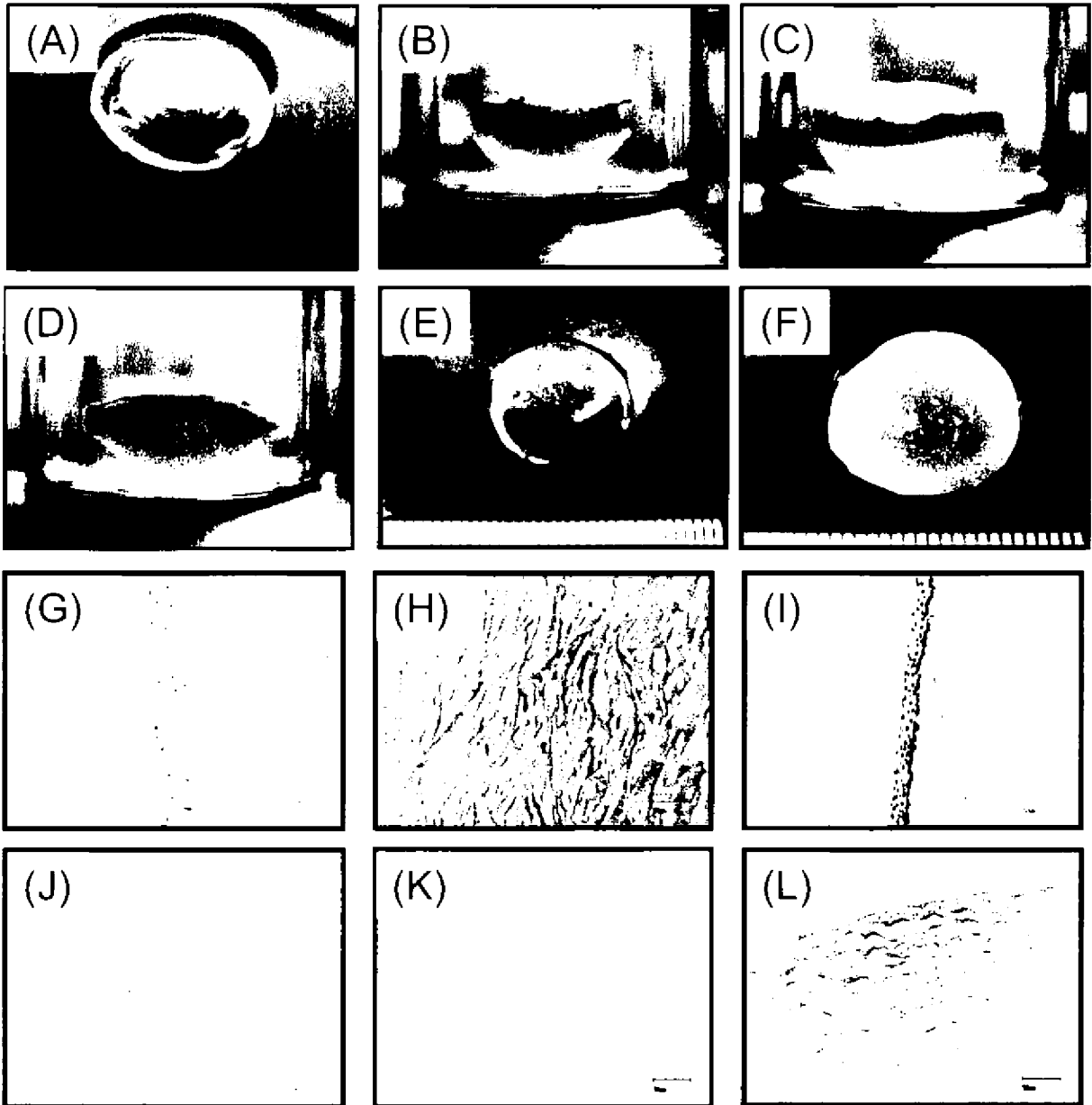
(A) 未処理の角膜



(B) 脱細胞化角膜



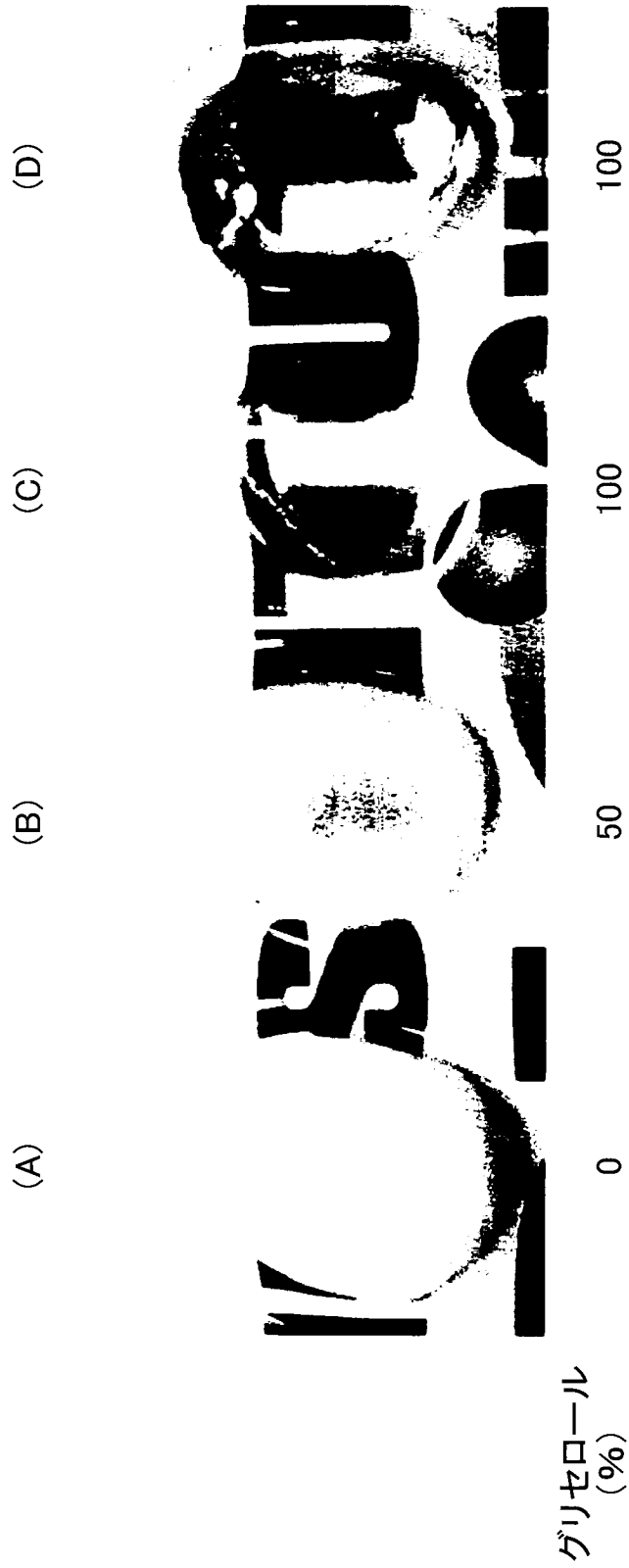
[図2]



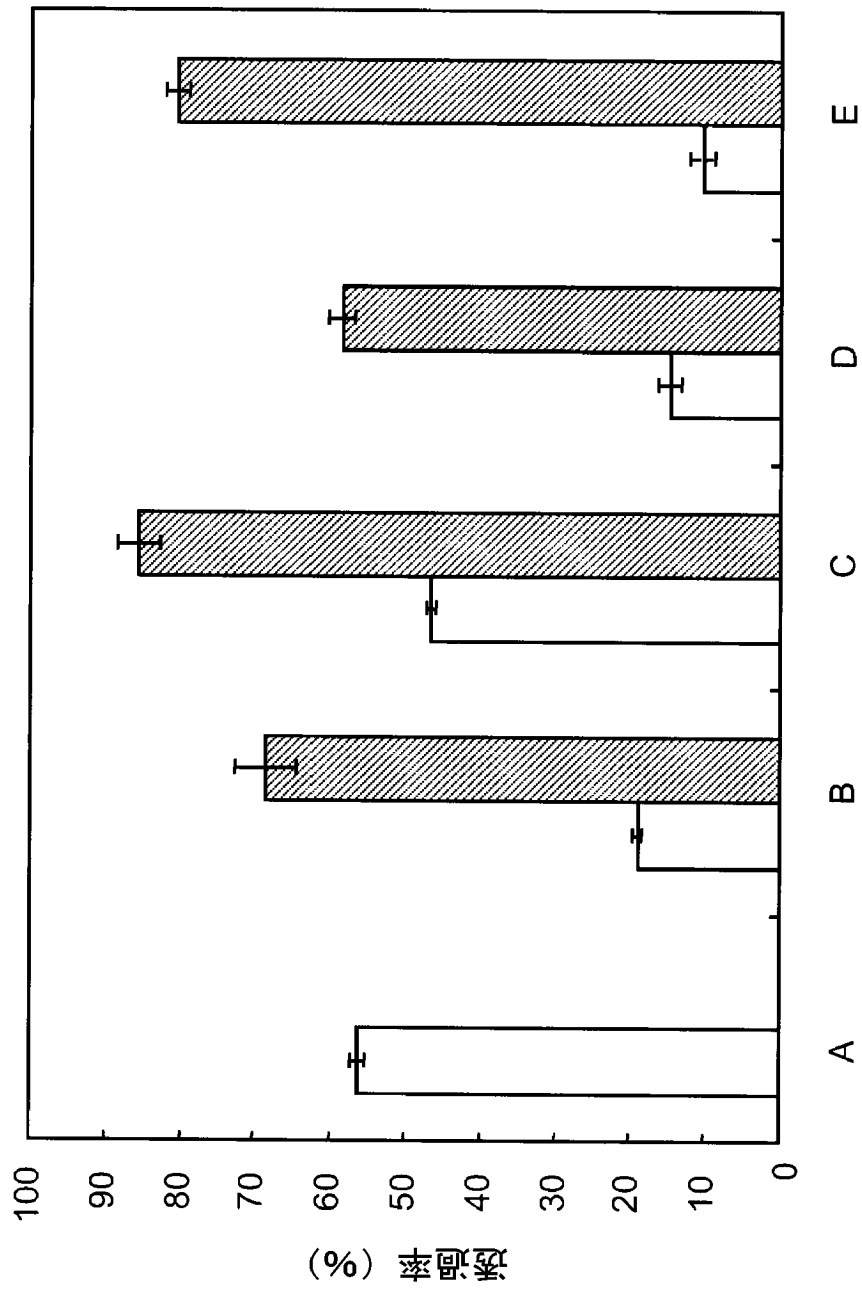
[図3]



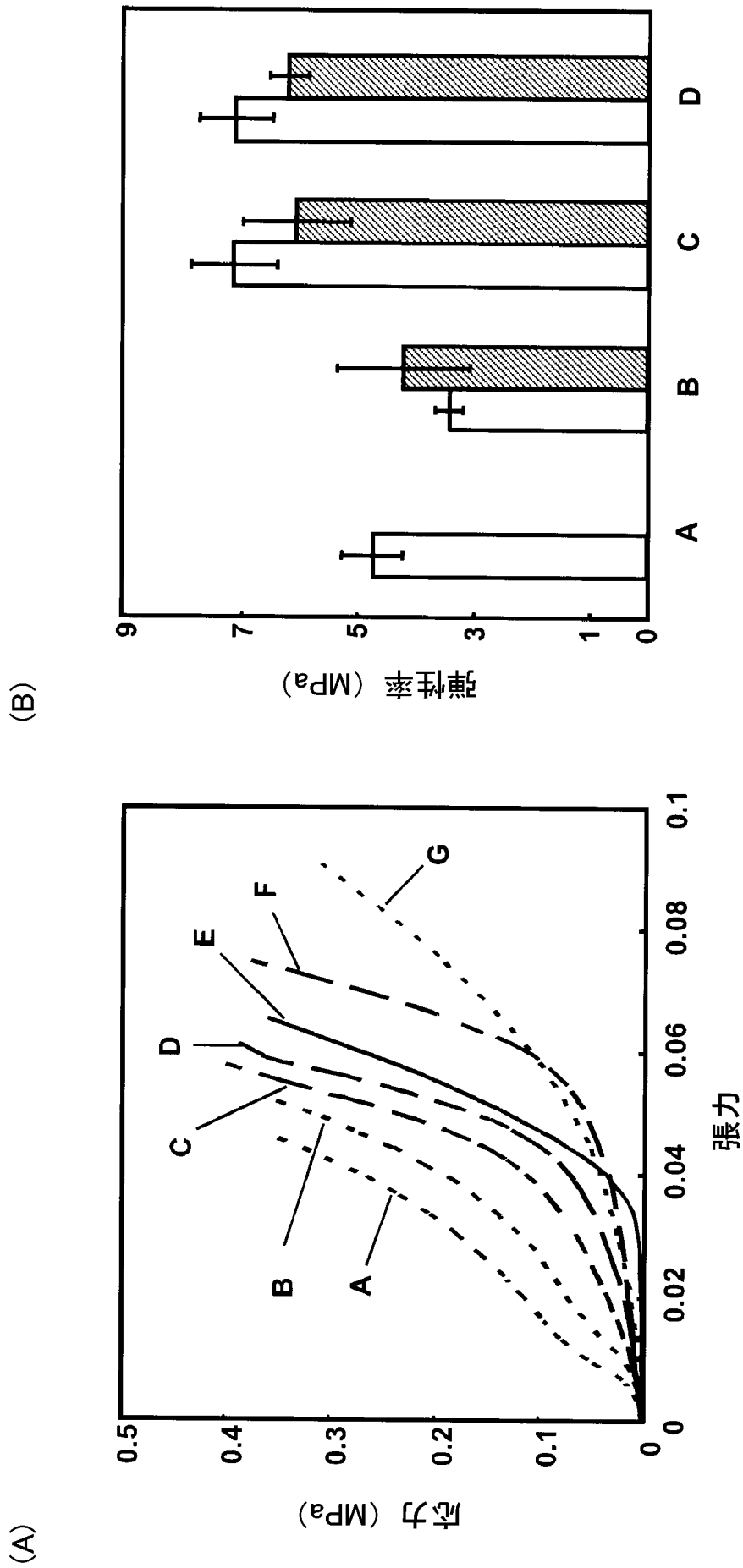
[図4]



[図5]



[図6]



[[図7]]



[[図8]]



4

[図9]



250 μm

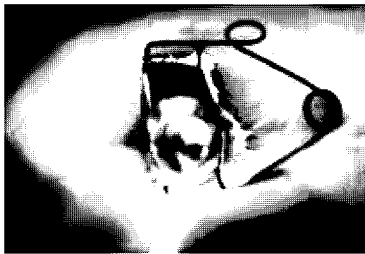
(A)

250 μm

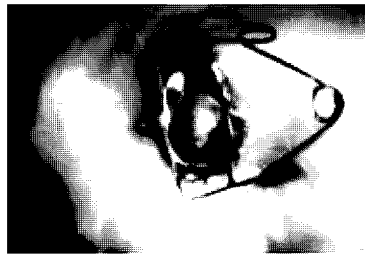
(B)

[図10]

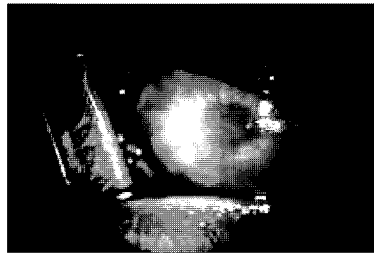
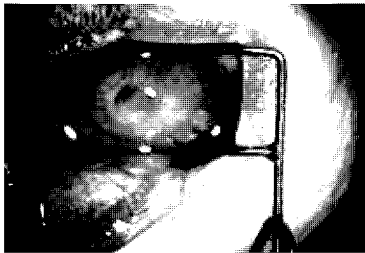
(a) 術後1週間



(b) 術後2週間



(c) 術後3週間



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2008/054207

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER A61K35/12(2006.01) i, A61K35/44(2006.01) i, A61L27/00(2006.01) i		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED		
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) A61K35/12, A61K35/44, 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 (STN), CA (STN), MEDLINE (STN), JSTPlus (JDreamII), JMEDPlus (JDreamII), JST7580 (JDreamII)		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X/Y	Tsuyoshi KIMURA et al., "Jinko Kakumaku to shite no Datsu Saiboka Kakumaku no Sosei", Reports of the Institute of Biomaterials and Bioengineering, Tokyo Medical and Dental University, 03 March, 2007 (03.03.07), Vol.40, pages 16 to 19, page 18, left column, 1st paragraph	1-3, 6, 7/4, 5, 8, 9
Y	WO 2004/024170 A1 (Japan as represented by President of National Cardiovascular Center), 25 March, 2004 (25.03.04), Page 4; lines 16 to 25 & JP 2004-097552 A & EP 1541157 A1 & CN 1691950 A & US 2006/110720 A1 & KR 2005047109 A	4, 5
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/> 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 01 April, 2008 (01.04.08)		Date of mailing of the international search report 15 April, 2008 (15.04.08)
Name and mailing address of the ISA/ Japanese Patent Office		Authorized officer
Facsimile No.		Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2008/054207

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	WO 2005/063316 A1 (Osaka Prefecture University), 14 July, 2005 (14.07.05), Par. Nos. [0132] to [0134] & EP 1698358 A1	8, 9

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC)) Int.Cl. A61K35/12(2006.01)i, A61K35/44(2006.01)i, A61L27/00(2006.01)i		
B. 調査を行った分野 調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC)) Int.Cl. A61K35/12, A61K35/44, A61L27/00		
最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの 日本国実用新案公報 1922-1996年 日本国公開実用新案公報 1971-2008年 日本国実用新案登録公報 1996-2008年 日本国登録実用新案公報 1994-2008年		
国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語) BIOSIS (STN), CA (STN), MEDLINE (STN), JSTPlus (JDreamII), JMEDPlus (JDreamII), JST7580 (JDreamII)		
C. 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X/Y	木村剛他, 人工角膜としての脱細胞化角膜の創製, 東京医科歯科大学生体材料工学研究所年報, 2007.03.03, Vol.40, p.16-19 第18ページ左欄第1段落	1-3, 6, 7/ 4, 5, 8, 9
Y	WO 2004/024170 A1 (国立循環器病センター総長が代表する日本国) 2004.03.25, 第4ページ第16から25行目参照 & JP 2004-097552 A & EP 1541157 A1 & CN 1691950 A & US 2006/110720 A1 & KR 2005047109 A	4, 5
<input checked="" type="checkbox"/> C欄の続きにも文献が列挙されている。 <input type="checkbox"/> 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 01.04.2008	国際調査報告の発送日 15.04.2008	
国際調査機関の名称及びあて先 日本国特許庁 (ISA/J P) 郵便番号100-8915 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号	特許庁審査官 (権限のある職員) 佐久 敬 電話番号 03-3581-1101 内線 3452	4C 3037

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリ*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
Y	WO 2005/063316 A1 (公立大学法人大阪府立大学) 2005.07.14, 段落【0132】～【0134】参照 & EP 1698358 A1	8,9