

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第5763880号  
(P5763880)

(45) 発行日 平成27年8月12日 (2015. 8. 12)

(24) 登録日 平成27年6月19日 (2015. 6. 19)

(51) Int. Cl.	F I
A 6 1 L 27/00 (2006. 01)	A 6 1 L 27/00 V
A 6 1 L 15/16 (2006. 01)	A 6 1 L 27/00 C
	A 6 1 L 15/01

請求項の数 5 (全 9 頁)

(21) 出願番号	特願2009-281382 (P2009-281382)	(73) 特許権者	304027279
(22) 出願日	平成21年12月11日 (2009. 12. 11)		国立大学法人 新潟大学
(65) 公開番号	特開2011-120763 (P2011-120763A)		新潟県新潟市西区五十嵐2の町8050番地
(43) 公開日	平成23年6月23日 (2011. 6. 23)	(74) 代理人	100080089
審査請求日	平成24年10月30日 (2012. 10. 30)		弁理士 牛木 護
		(74) 代理人	100137800
			弁理士 吉田 正義
		(74) 代理人	100125081
			弁理士 小合 宗一
		(72) 発明者	川瀬 知之
			新潟県新潟市中央区学校町通2番町527 4番地 国立大学 法人 新潟大学歯学部内

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 再生治療用材料

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

生体吸収性織布にコーティングされた後に凍結乾燥された多血小板血漿を含むことを特徴とする、再生治療のための冷蔵保存用材料。

【請求項 2】

前記再生治療のための冷蔵保存用材料が長期保存用であることを特徴とする、請求項 1 に記載の再生治療のための冷蔵保存治療用材料。

【請求項 3】

前記生体吸収性織布はグリコール酸及び乳酸のポリエステルポリマーでできていることを特徴とする、請求項 1 又は 2 に記載の再生治療のための冷蔵保存用材料。

【請求項 4】

前記固体支持体は、前記多血小板血漿がコーティングされる前に、細胞 - 基質間接着レセプターのリガンドがコーティングされることを特徴とする、請求項 1 ないし 3 のいずれか 1 つに記載の再生治療のための冷蔵保存用材料。

【請求項 5】

前記リガンドはアテロコラーゲンであることを特徴とする、請求項 4 に記載の再生治療のための冷蔵保存用材料。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

## 【0001】

本発明は、再生治療用材料に関し、具体的には、固体支持体にコーティングされた後に凍結乾燥された多血小板血漿を含む再生治療用材料に関する。

## 【背景技術】

## 【0002】

ヒト血液から分画した多血小板血漿 (platelet rich plasma、以下、「PRP」という。) は、フィブリン糊として50年以上昔から外科手術に頻繁に用いられてきた。また、21世紀に入ると、口腔外科の分野においてPRP中に細胞増殖因子が濃縮されて含まれていることが注目され、現在、再生医療のみならず美容外科の分野での応用が進んでいる。しかし、長期保存ができないことからいずれの場合も用時調製が原則である(特許文献1)。1990年代から、緊急時への対応や野戦病院での応急手当などへの汎用性を拡大させるために、凍結乾燥によるPRP保存技術の開発が進んだ。また、肝臓の再生を目的としたPRPの多量保存法のひとつとして凍結乾燥法の研究が進められている。ただし、これらの凍結乾燥PRPは水溶液に溶解させるのに注意を要するのが課題として残されている(非特許文献1)。

10

## 【先行技術文献】

## 【特許文献】

## 【0003】

【特許文献1】国際公開第WO2007/027178号公報パンフレット

## 【非特許文献】

20

## 【0004】

【非特許文献1】Wolkers, W. F. ら、Cryobiology、42:79-87(2001)

## 【発明の開示】

## 【発明が解決しようとする課題】

## 【0005】

そこで、多血小板血漿を利用する再生治療用材料であって、用時調製又は冷凍保存を必要としない再生治療用材料を開発する必要がある。

## 【課題を解決するための手段】

## 【0006】

30

本発明は、固体支持体にコーティングされた後に凍結乾燥された多血小板血漿を含み、前記多血小板血漿が凍結乾燥されてから少なくとも1日間冷蔵保存された後に使用される、再生治療用材料を提供する。

## 【0007】

本発明の再生治療用材料は、前記多血小板血漿が凍結乾燥されてから少なくとも30日間冷蔵保存された後に使用される場合がある。

## 【0008】

本発明の再生治療用材料において、前記固体支持体は、繊維製品、多孔性基材、粒状体及び発泡体からなるグループから選択される場合がある。

## 【0009】

40

本発明の再生治療用材料において、前記固体支持体は生分解性材料でできている場合がある。

## 【0010】

本発明の再生治療用材料において、前記固体支持体は、前記多血小板血漿がコーティングされる前に、細胞-基質間接着レセプターのリガンドがコーティングされる場合がある。

## 【0011】

## 【0011】

本発明の再生治療用材料において、前記リガンドはアテロコラーゲンの場合がある。

## 【0012】

本発明において、固体支持体とは、多血小板血漿をコーティングしてから凍結乾燥され

50

るまでの間、ほぼ一定の形状を保つことができることを条件として、いかなる材質及び形状であってもかまわない。本発明における固体支持体の好ましい材質は、ポリグリコール酸、ポリ乳酸及びこれらの共重合体のような短期吸収性の生分解性ポリマー又は生体吸収性ポリマーと、プロパンジオール、ポリ(L-ラクチド-コ-イブシロン-カプロラクトン)、ポリカプロラクトン及びこれらの共重合体のような長期分解性の生分解性ポリマー又は生体吸収性ポリマーと、ポリブチレンサクシネート、ポリビニルアルコール、キトサンその他の生分解性ポリマー又は生体吸収性ポリマーと、非生分解性ポリマーの絹とを含むが、これらに限定されない。本発明における固体支持体の好ましい形状は、織物、編物、不織布、ステッチ、綿、布、紙、フィルター等の繊維製品と、粒状体及び発泡体を含む多孔性基材とを含むが、これらに限定されない。好ましい繊維製品には、メッシュ、ガーゼ地のような織物の他、編物、不織布、ステッチ、綿のように、創傷被覆材として慣用されるものを含む。

10

**【0013】**

本発明において用いられる用語「コーティング」とは、PRPや、アテロコラーゲンのようなリガンドを含む溶液に、固体支持体が覆われることを指す。すなわちコーティングとは、PRPが前記固体支持体の表面で凝固することの他に、前記溶液が前記固体支持体の繊維間隙や細孔を通して毛細管現象で浸透することや、前記溶液の存在下で前記固体支持体が溶解又は分解するために前記固体支持体の表面に前記溶液の層又は膜が形成されることによって、前記固体支持体に前記溶液が吸収されることを含む広い意味を有する。

**【0014】**

20

本発明においてPRPは、所要の細胞増殖促進活性、創傷治癒促進活性等を有すること及び、血液製剤としての安全性が確保されることを条件として、いかなる出所のものであってもかまわない。しかし、種特異性を考慮すると、再生治療の対象となる患者と同じ種の個体に由来することが好ましい。また、血液製剤としての安全性を担保するためには、PRPは、再生治療の対象となる患者自身から採取された血液から精製されることがより好ましい。PRPの調製は、例えば、Okuda, K.ら(J. Periodontol. 74: 849-857 (2003))及び特開2004-201799号明細書に従って行う。簡潔には、患者から採血した新鮮な全血をクエン酸及びブドウ糖を含む抗凝固剤を添加した10mL遠心管に分注し、最短径約57mm、最長径約140mmのスイングバケット型ロータで2,400rpm、10分間遠心する。遠心分離すると、赤血球が沈殿し、上清の血漿との間に血小板が集まる。次に、血小板及び血漿を別の10mL遠心管に移して3,600rpm、15分間遠心して、血小板を沈殿させ、最少量の血漿中に懸濁して回収した分画を多血小板血漿として使用する。本発明の多血小板血漿は患者から採取した新鮮なものを使用する場合もあるが、凍結保存したものを使用する場合もある。また、PRPの提供者は、患者自身であることが好ましい。しかし、血液製剤としての安全性が確保されることを条件として、献血のように患者以外の人間から採取された血液から調製されたPRPを用いる場合もある。

30

**【0015】**

本発明において、凍結乾燥は、冷却及び/又は減圧によって乾燥させることを指し、遠心分離を伴う場合がある。例えば、PRPや、アテロコラーゲンのようなリガンドでコーティングされた織物が、-80°Cのディープフリーザー内で約1時間予備凍結され、その後、凍結乾燥装置で-45°C、20Paで約10分間処理される場合がある。完全に凍結乾燥させるために、さらに20ないし50分間処理される場合もある。

40

**【0016】**

本発明において、冷蔵保存とは、-80°Cないし-20°Cの保存のための冷凍庫を必要としない、室温より低いいずれかの温度で保存することを指し、0°Cないし10°Cの範囲の温度での保存が好ましく、4°Cないし10°Cの範囲の温度での保存がより好ましい。

**【0017】**

本発明において、細胞-基質間接着とは、細胞と細胞外マトリクスとの接着や、細胞と

50

培養容器の表面との接着を指す。本発明における細胞 - 基質間接着レセプターのリガンドは、コラーゲン及びアテロコラーゲンや、フィブロネクチン、ラミニンを含むが、これらに限定されない。

【0018】

本発明の再生治療用材料は、創傷被覆材や、硬組織及び/又は軟組織の欠損部分に包埋するインプラント材として利用できる。また、従来の凍結乾燥PRPの代替品として、細胞増殖因子の供給源等の目的で利用することができる。

【0019】

本発明の再生治療用材料は少なくとも1日間冷蔵保存された後に使用されるため、用時調製の必要がない。そこで、遠心機等の設備がない小規模の医療機関での再生治療に特に有用である。また本発明の再生治療用材料は冷蔵保存が可能なので、輸送及び保存にドライアイス、ディープフリーザー等の必要がない。そのため、エネルギー消費の点からも凍結PRPの代替品として有用である。

【0020】

(生命倫理)

ヒト由来の培養細胞、PRP及びラットを使用するにあたって、新潟大学医歯学総合病院の倫理規定に基づき作成した実験計画を新潟大学歯学部倫理委員会で承認を受けた。さらに、インフォームドコンセントにより、その都度、提供者に対して骨膜細胞及びPRPの採取と実験への供与について説明し、書面による同意を得た。

【図面の簡単な説明】

【0021】

【図1】PRPコーティング織布のヒト骨膜由来培養細胞の増殖への影響を調べる実験結果の棒グラフ。

【図2】生体吸収性織布を用いないで処置された対照実験のラットの創傷組織(A)と、PRPがコーティングされた生体吸収性織布を用いて処置されたラットの創傷組織(B)とのヘマトキシリン・エオジン染色された組織の光学顕微鏡写真。

【図3】アテロコラーゲン及びPRPでコーティングされた生体吸収性織布上で培養された骨膜片初代培養の隣接する薄切切片に、それぞれ、ヘマトキシリン・エオジン染色(A)及びフォン・コッサ染色(B)を施した組織標本の光学顕微鏡写真。

【発明を実施するための形態】

【0022】

以下に説明する本発明の実施例は例示のみを目的とし、本発明の技術的範囲を限定するものではない。本発明の技術的範囲は特許請求の範囲の記載によってのみ限定される。

【実施例1】

【0023】

ヒト骨膜由来培養細胞の増殖促進効果

PRPの調製

患者から採血した新鮮な全血がクエン酸及びブドウ糖を含む抗凝固剤を添加した10mL遠心管に分注され、最短径約57mm、最長径約140mmのスウィングバケット型ロータで2,400rpm、10分間遠心された。遠心分離により赤血球が沈殿し、上清の血漿との間に血小板が集まった。前記血小板及び血漿が別の10mL遠心管に回収され、3,600rpm、15分間遠心された。沈殿した血小板は最少量の血漿中に懸濁して回収され、これが多血小板血漿として使用された。

【0024】

PRPコーティング織布の調製

5、mm×5mm及び5mm×10mmの生体吸収性織布(バイクリルメッシュ、カタログ番号:VICRYL WOVEN MESH (Polyglactin 910) VWMM、ジョンソン・エンド・ジョンソン株式会社)が、それぞれ、前記PRP30μL及び60μLで室温、3-5分間コーティングされた。前記織布は、-80°Cのディープフリーザー内で約1時間予備凍結され、その後、凍結乾燥装置で-45°C、20

10

20

30

40

50

Paで30ないし60分間処理された。(以下、それぞれ「PRP×1」及び「PRP×2」という。)。前記PRPコーティング織布は、使用まで冷蔵庫で貯蔵及び保存された。

#### 【0025】

##### 細胞

患者から採取された骨膜片由来の培養細胞(以下、「ヒト骨膜由来培養細胞」という。 )が用いられた。ウシ胎児血清が10%添加されたダルベッコ変法イーグル培地での継代6回目の前記ヒト骨膜由来培養細胞は、セルインサート(ベクトン・ディキンソン、#353090)付きの6ウェルプレート(ベクトン・ディキンソン、#353502又は#55467)にウェルあたり $1 \times 10^5$ 個となるように播種された。培養は、ウシ胎児血清が1%添加されたダルベッコ変法イーグル培地(以下、「分化用培地」という。)をウェルに2mL、セルインサートに1mL添加して、 $37^{\circ}\text{C}$ 、5% $\text{CO}_2$ 及び飽和水蒸気雰囲気下で2日間行なわれた。前記セルインサートには、前記骨膜片を採取したのと同じ患者由来のPRP×1又はPRP×2が1枚浸漬された。対照実験は、PRPをコーティングしない織布を使用した培養と、PRP×1及びPRP×2を使用せず分化用培地のみの培養とであった。

10

#### 【0026】

##### 細胞増殖の定量

2日間の培養後、細胞は解離され、粒子数計測分析装置(CDA-100X、シスメックス社)で細胞数が測定された。

20

#### 【0027】

##### 結果

図1は、PRPコーティング織布のヒト骨膜由来培養細胞の増殖への影響を調べる実験結果の棒グラフである。図1に示すとおり、ウェルあたりの細胞数は、対照実験では $1.0 \times 10^5$ 個、PRP×1を用いた場合には $1.2 \times 10^5$ 個、PRP×2を用いた場合には $1.4 \times 10^5$ 個であった。この結果は、PRPコーティングバイクリルメッシュのサイズが大きいほど、細胞増殖を促進する活性が高いことを示唆する。なお、PRPをコーティングしない生体吸収性織布は、細胞増殖促進活性を示さなかった(図示されない)。また、本実施例では冷蔵庫での貯蔵期間が1日のPRPコーティング織布を用いたが、貯蔵期間が30日のPRPコーティング織布でも、同様の細胞増殖促進活性が認められた。

30

#### 【実施例2】

#### 【0028】

##### ラット皮膚創傷の治癒促進効果

##### 創傷及び処置

局部麻酔されたラット(F334、オス、6週齢)背部の表皮が、 $10\text{mm} \times 10\text{mm}$ 切開除去された。PRPをコーティングした $10\text{mm} \times 10\text{mm}$ の生体吸収性織布(バイクリルメッシュ、カタログ番号:VICRYL WOVEN MESH (Polyglactin 910) VWMM、ジョンソン・エンド・ジョンソン株式会社)が創傷部位に留置され、その上から外科用ポリウレタンフィルム(サージット、ニプロ)が貼付された。対照実験は、生体吸収性織布を留置せず外科用ポリウレタンフィルムだけを創傷部位に貼付したラットであった。

40

#### 【0029】

##### 組織学的観察

創傷処置の5日後に創傷組織が摘出され、光学顕微鏡観察用組織標本が作製された。薄切切片の作製及びヘマトキシリン・エオジン染色は、当業者に周知の標準的な方法に従って実施された。

#### 【0030】

##### 結果

図2は、生体吸収性織布を用いないで処置された対照実験のラットの創傷組織(A)と

50

、PRPがコーティングされた生体吸収性織布を用いて処置されたラットの創傷組織(B)とのヘマトキシリン・エオジン染色された組織の光学顕微鏡写真である。図2(A)のアステリク(\*)で示される部分は、皮下に形成された肉芽組織である。対照実験の創傷組織(A)では、創傷部分の皮下の一部にしか肉芽組織が形成されなかったのに対し、PRPがコーティングされた生体吸収性織布で処置された創傷組織(B)では、創傷部分の皮下全体に肉芽組織が形成された。この結果は、PRPをコーティングした生体吸収性織布に創傷治癒促進作用があることを示す。また、本実施例では冷蔵庫での貯蔵期間が1日のPRPコーティング織布を用いたが、貯蔵期間が30日のPRPコーティング織布でも、同様の創傷治癒促進作用が認められた。

### 【実施例3】

10

#### 【0031】

ヒト骨膜片初代培養での細胞遊走及び細胞分化促進効果

ヒト骨膜片培養用PRPコーティング織布の調製

実施例1で用いた生体吸収性織布(バイクリルメッシュ)は、予めステアリン酸カルシウムでコーティングされており、PRPをコーティングしただけではヒト細胞が付着し難いので、ヒト骨膜片細胞の培養基材としては適さない。そこで、本実施例のヒト骨膜片の初代培養のための生体吸収性織布は、PRPのコーティングに先立って、アテロコラーゲンでコーティングされた。具体的には、7-10mm×7-10mmの生体吸収性織布(バイクリルメッシュ、カタログ番号:VICRYL WOVEN MESH (Polyglactin 910) VWMM、ジョンソン・エンド・ジョンソン株式会社)が、3mg/mLのウシ真皮由来アテロコラーゲン(高研、IPC-30)溶液50μLで15-30分間コーティングされてから、滅菌蒸留水で3回軽くリンスされ、ガーゼ上で乾燥された後、実施例1で調製されたPRP120μLで室温、3-5分間コーティングされた。

20

#### 【0032】

ヒト骨膜片の処理

PRPを提供した患者から採取された骨膜片は、培地で湿したガーゼの上に載せて無菌的に培養室に運ばれ、クリーンベンチ内で以下の作業に供された。前記骨膜片は、PBSで3回洗浄されてから、アテロコラーゲン及びPRPをコーティングした織布の上に中央に載置された。前記織布上の骨膜片は、プラスチックディッシュ中で、25μg/mLビタミンC及び10%ウシ胎児血清が含まれるメディウム199培養液を用いて合計26日間培養された。

30

#### 【0033】

骨芽細胞への分化

前記骨膜片の初代培養は、19日後に培地を、10nMのデキサメタゾン、10mMのグリセロリン酸、25μg/mLビタミンC及び10%ウシ胎児血清が含まれるメディウム199培養液に切り替えて、さらに7日間培養された。

#### 【0034】

骨膜片初代培養の組織学的観察

初代培養開始から26日後、前記織布上の骨膜片培養の組織標本が作製された。薄切切片の作製、ヘマトキシリン・エオジン染色及びフォン・コッサ染色は、当業者に周知の標準的な方法に従って実施された。

40

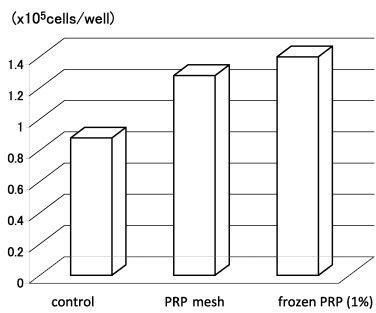
#### 【0035】

図3は、アテロコラーゲン及びPRPでコーティングされた生体吸収性織布上で培養された骨膜片初代培養の隣接する薄切切片に、それぞれ、ヘマトキシリン・エオジン染色(A)及びフォン・コッサ染色(B)を施した組織標本の光学顕微鏡写真である。ヘマトキシリン・エオジン染色標本(A)では、骨膜片からの活発な細胞遊走が観察された。フォン・コッサ染色標本(B)では、骨膜片の中心に黒く染色された部分が観察され、骨膜片内部での石灰化物の沈着が認められた。この結果から、アテロコラーゲン及びPRPでコーティングされた織布は、骨膜片からの細胞遊走及び骨膜片での石灰化を促進することが示

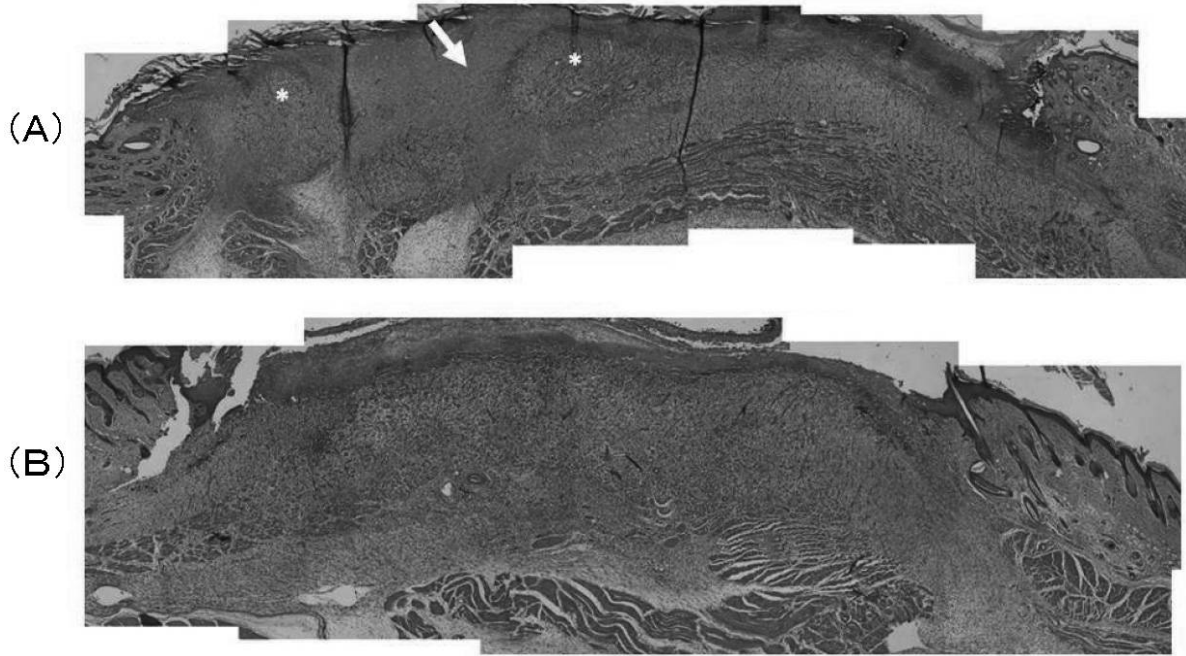
50

された。また本実施例では、アテロコラーゲン及びPRPでコーティングされた織布は冷蔵庫で1日貯蔵後実験に供された。しかし、貯蔵期間が30日のコーティング織布でも、同様の細胞遊走及び細胞分化促進効果が認められた。

【図1】



【 図 2 】



【 図 3 】





## フロントページの続き

- (72)発明者 奥田 一博  
新潟県新潟市中央区学校町通2番町5274番地  
学歯学部内  
国立大学法人 新潟大
- (72)発明者 中島 悠  
新潟県新潟市中央区学校町通2番町5274番地  
学歯学部内  
国立大学法人 新潟大

審査官 佐々木 大輔

- (56)参考文献 国際公開第2007/063820(WO, A1)  
国際公開第2009/018126(WO, A1)  
特開2004-123576(JP, A)  
国際公開第2008/134774(WO, A1)  
特開2005-278910(JP, A)  
特表2009-523058(JP, A)  
Wound Repair Regen., 2008, Vol.16, No.2, pp.218-225  
J. Jpn. Stomatol. Soc., 2008, Vol.57, No.2, pp.219-231  
Wound Repair Regen., 2006, Vol.14, No.5, pp.573-580  
日本歯周病学会学術大会プログラムおよび講演抄録集, 2002, 45th 秋季, p.129, B-42

## (58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

A61L 15/00-33/18  
JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamIII)  
CPlus/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS(STN)  
THOMSON INNOVATION  
G-search  
Cinii  
医中誌WEB  
医学薬学予稿集全文DB