

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第4819995号  
(P4819995)

(45) 発行日 平成23年11月24日(2011.11.24)

(24) 登録日 平成23年9月9日(2011.9.9)

(51) Int. Cl. F I  
**A 6 1 L 27/00 (2006.01)** A 6 1 L 27/00 G  
**B 3 2 B 5/18 (2006.01)** B 3 2 B 5/18

請求項の数 14 (全 10 頁)

(21) 出願番号	特願2000-515635 (P2000-515635)	(73) 特許権者	500039717
(86) (22) 出願日	平成10年10月5日 (1998.10.5)		エド・ガイストリヒ・ゼーネ・アクチエン
(65) 公表番号	特表2001-519210 (P2001-519210A)		ゲゼルシャフト・フューア・ヒューミシエ
(43) 公表日	平成13年10月23日 (2001.10.23)		・インダストリー
(86) 国際出願番号	PCT/GB1998/002976		スイス国ツェー・ハー 6 1 1 0 ヴォルフ
(87) 国際公開番号	W01999/019005		ーゼン. パーンホーフシュトラッセ 4 0
(87) 国際公開日	平成11年4月22日 (1999.4.22)	(74) 代理人	100127926
審査請求日	平成17年9月30日 (2005.9.30)		弁理士 結田 純次
(31) 優先権主張番号	9721585.9	(74) 代理人	100140132
(32) 優先日	平成9年10月10日 (1997.10.10)		弁理士 竹林 則幸
(33) 優先権主張国	英国 (GB)	(72) 発明者	ペーター・ガイストリヒ
前置審査			スイス国ツェー・ハー 6 3 6 2 シュタン
			スシュタート. ケールズイテンシュトラ
			ッセ 1 9

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 組織再生誘導に使用する膜

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

骨または軟骨組織の再構築において生体内で使用するのに適した多層膜であって、主としてコラーゲンIIから作られ、スポンジ様の開放性構造を有するマトリックス層および少なくとも一つの比較的の不浸透性の閉鎖性構造を有し、主としてコラーゲンIおよびIIIから作られたバリヤ層からなり、そしてコラーゲンIIスラリーを、比較的の不浸透性の閉鎖性構造を有するバリヤ膜の表面に塗布し、次いで凍結乾燥して、スポンジ様の開放性構造を有するマトリックス層を得ることからなる製造方法によって製造されることを特徴とする膜。

【請求項 2】

単一のバリヤ層からなる請求項 1 記載の膜。

【請求項 3】

マトリックス層が二つのバリヤ層の間に供給される請求項 1 記載の膜。

【請求項 4】

マトリックス層が、天然軟骨から誘導されるコラーゲンII物質によって得られる請求項 1 ~ 3 のいずれか一項に記載の膜。

【請求項 5】

コラーゲンII物質が、豚のヒアリン軟骨から誘導される請求項 4 記載の膜。

【請求項 6】

コラーゲンII物質が熱またはUV照射により物理的に架橋している請求項 4 または 5 記

載の膜。

【請求項 7】

バリア層が、子牛または豚の腹膜から誘導される請求項 1 記載の膜。

【請求項 8】

マトリックス層が、骨髄由来の関節軟骨細胞、骨膜細胞、心膜細胞または間葉幹細胞から単離される軟骨細胞で含浸される請求項 1 ~ 7 のいずれか一項に記載の膜。

【請求項 9】

マトリックス層および/またはバリア層がグリコサミノグリカンで含浸される請求項 1 ~ 8 のいずれか一項に記載の膜。

【請求項 10】

グリコサミノグリカンがヒアルロン酸、コンドロイチン 6 - サルフェート、ケラチンサルフェートまたはデルマトンサルフェートである請求項 9 記載の膜。

【請求項 11】

マトリックス層およびバリア層がプロテオグリカンを含有していない請求項 1 ~ 10 のいずれか一項に記載の膜。

【請求項 12】

コラーゲンIIスラリーを、比較的浸透性の閉鎖性構造を有するバリア膜の表面に塗布し、次いで凍結乾燥して、スポンジ様の開放性構造を有するマトリックス層を得ることからなる請求項 1 記載の膜の製造方法。

【請求項 13】

組織再生誘導に使用するための請求項 1 ~ 11 のいずれか一項に記載の膜。

【請求項 14】

骨または軟骨の組織の再生に使用するための請求項 1 ~ 11 のいずれか一項に記載の膜。

【発明の詳細な説明】

【0001】

本発明は組織再生誘導に使用するため、特に骨または軟骨組織の再生に生体内で使用するためのコラーゲン膜インプラントに関する。

組織再生では、例えば軟骨病変の場合のように軟骨組織を再構築することは難しいということが長い間分かっている。例えば膝および足関節のような比較的大きな関節が最も危険であるけれども、いずれもの関節で軟骨損傷は発生し得る。そのような損傷はトラウマ、変性疾患または離断性骨軟骨炎から生起し得る。軟骨損傷は関節症の発症の主要な病理力学的因子である。酵素が遊離すると滑液が炎症状態になり、次いで軟骨の表皮剥脱および関節表面の破壊が起こる。軟骨欠損において生体内で関節軟骨を再生するための最近の試みとしては、培養された自己発生性関節軟骨(CACS)の移植がある。しかし、この技術の成果には限界があった。

【0002】

現在、組織の再構築には諸細胞のための導子として役立つマトリックスの提供が必要であると一般的には認められており、そしてそのマトリックスの繊維に沿っておよび繊維間に諸細胞は成長する。つい最近、再吸収性の合成および天然双方のマトリックスに接種したCACSの使用が提案された。しかし、ポリ乳酸、ポリグリコール酸およびコラーゲンIまたはIIIをベースとするマトリックスを用いて軟骨組織を再構築する試みは、移植前に生体外で軟骨細胞と一緒に詰め込むマトリックスを必要とした。これは軟骨細胞の滅菌培養に関する合併症、すなわちインプラントと組織との間の界面における巨大細胞と繊維芽細胞による免疫学的炎症性反応を生じる。

【0003】

WO - A - 96 / 25961号には、生体内部位で移植でき、マトリックス表面での天然軟骨の成長により軟骨再生を行う、コラーゲンIIをベースとするマトリックスインプラントが提案されている。しかし、軟骨組織の完全な再生を行うためのこのようなマトリックスの能力は限定されている。

10

20

30

40

50

## 【0004】

すなわち、生体内移植に続いて、天然軟骨の十分な内方成長およびそれによる軟骨組織の再生を可能にするようなマトリックスインプラントが必要とされている。そこで本発明者等は軟骨、および究極的には新規な骨組織が、周辺の結合組織からのみならず、下にある骨または軟骨の欠損からも生体内で保護されるコラーゲンIIマトリックスの使用により再構築され得るということを見いだした。考えられるところによれば、それ自体がマトリックス中へのあらゆる周辺組織の望ましくない内方成長を防止することができるか、またはこの効果を達成するためにその欠損の部位に外科的に移植してもよいような多層膜インプラントを使用することにより、これは成就され得る。

## 【0005】

すなわち、本発明の一つの特徴によれば、主としてコラーゲンIIからなり、スポンジ様の開放性構造を有するマトリックス層および少なくとも一つの比較的浸透性の閉鎖性構造を有するバリア層からなる多層膜が提供される。

## 【0006】

使用する際の本発明膜の特別な利点は、天然細胞が比較的浸透性の閉鎖性構造を有するバリア層の中に浸透したりまたはその層中に入って成長したりすることができないという点にある。

## 【0007】

理論に縛られたくはないが、現在では、十分な軟骨再生には、例えば結合組織、血管等の天然組織細胞だけでなくあらゆる新規骨組織の、欠損部位中への迅速な内方成長が防止されることが必要であると信じられている。これは、一方の側の天然組織細胞の内方成長からコラーゲンマトリックスを保護するのに役立つ本発明の二重層膜を用いて成就され得る。外科移植中、これは、反対側の天然組織細胞の内方成長を防止するのに有効である組織移植片例えば骨膜移植片と組み合わせて使用することができる。すなわち、例えば、骨膜移植片が骨または軟骨欠損上のおおいになるように、最初にその移植片を正しい位置に縫合することができる。次いで本発明の二重層膜を、これが移植片と接触し、そしてそのマトリックス層が骨欠損に面するような方法で配置され得るようにして欠損部位に移植することができる。より好ましくは、本発明の二重層膜を、バリア層が骨または軟骨欠損に面するようにして、その欠損部位に最初に移植する。次いで骨膜移植片を、これがマトリックス層に接触しているように配置する。この移植片は例えばフィブリングルーのような生物学的に適合性の接着剤で付着されるか、または再吸収性のポリ乳酸の (polylactic) ピンで留めるか、または必要によりもしくは可能ならば、これが次いでいずれか周辺の結合組織の内方成長に対して浸透性バリアを提供するのに役立つような方法で縫合され得る。

## 【0008】

本発明の別の態様において、膜それ自体が、いずれもの天然組織細胞の内方成長を防止するのに有効であることがある。すなわち、本発明のさらに別の特徴によれば、主としてコラーゲンIIからなり、スポンジ様の開放性構造を有するマトリックス層が、比較的浸透性の閉鎖性構造を有する二つのバリア層の間に供給される少なくとも三つの層からなる膜が提供される。

## 【0009】

前記マトリックス層は、天然軟骨の内方成長のための媒体として作用することができ、それにより軟骨組織の再生を行うことが可能である。しかし、軟骨組織の再生をさらに促進するためには、生体内移植の前または後のいずれかにマトリックス層に軟骨細胞を含浸させるのがよい。移植の直前に、例えば注射によりマトリックス層に軟骨細胞を含浸させてもよいが、一般には、その軟骨細胞は、移植後に軟骨細胞の懸濁液を直接注射することによりマトリックス層中に導入され得ることが考えられる。

## 【0010】

本発明で使用する軟骨細胞は、骨髄由来の関節軟骨細胞、骨膜細胞、心膜細胞または間葉(間質の)幹細胞から単離される同種異系細胞または自己発生性細胞を含む細胞源から得

10

20

30

40

50

ることができる。同種異系細胞は免疫反応および感染性合併症の可能性を有するので、自己発生性細胞、特に自己発生性関節軟骨から軟骨細胞を単離する方が好ましい。細胞を収集する技術は知られており、その例としては酵素による消化または増殖培養がある。次いで収集した細胞を、身体に再導入する前に細胞培養中で膨張させる。最適な軟骨組織再生を得るには、一般には少なくとも $10^6$ 個、好ましくは少なくとも $10^7$ 個の細胞をマトリックス層中に含浸すべきである。

#### 【0011】

一般に、本発明膜のマトリックス層は、軟骨細胞が埋められそして成長するようになり得るような天然媒体を提供するのに役立つグリコサミノグリカン(GAGs)、例えばヒアルロン酸、コンドロイチン6-サルフェート、ケラチンサルフェート、デルマトンサルフェート等を含むのが望ましい。軟骨からの場合と同一の組成、分子量および物理学的性質を必ずしも有してはいない種々の供給源からのグリコサミノグリカンをコラーゲンマトリックス中に混入することは可能であるが、より好ましいグリコサミノグリカンは軟骨それ自体から抽出されるものである。一般に、マトリックス層は1~10重量%、例えば2~6重量%のグリコサミノグリカンを含むのが好ましい。いくらかのグリコサミノグリカンが不浸透性層に存在するかもしれないが、大部分はマトリックス層に存在する。

10

#### 【0012】

天然コラーゲン組織中にはGAGsが少なくとも部分的に、プロテオグリカン(PGs)の成分として存在する。PGsの形態でのGAGsの使用は、PGsのタンパク質含有量により惹起され得る潜在的な免疫学的問題を考慮すると望ましくない。したがって、マトリックス層は実質的にはいずれものプロテオグリカンを含まないのが好ましい。好都合には、これはテロペプチド(telopeptide)を含まない精製コラーゲンII物質とグリコサミノグリカンとの混合物からマトリックス層を製造することにより成就され得る。

20

#### 【0013】

マトリックス層にさらに存在してもよいその他の添加剤としては、例えば、軟骨細胞のコラーゲンII繊維への付着を助けるためのコンドロネクチン、ラミニン、フィブロネクチン、アルギン酸カルシウムまたはアンコリンII、および成長因子例えば軟骨誘導因子(CIF)、インスリン様成長因子(IGF)、ホモダイマーまたはヘテロダイマーとして存在する形質転換誘発成長因子(TGF)および骨形態発生因子(BMP)例えば天然または組み換えのヒトBMP-2、BMP-3(オステオゲニン)、BMP-4およびBMP-7(OP-1、骨形成性タンパク質-1)を挙げることができる。BMP-2は独立して、骨形成の二つの経路、すなわち骨の直接的形成並びに後に除去されそして骨に置き換えられる軟骨の形成に影響を及ぼす。種々の供給源の皮質骨からの抽出により得られる骨マトリックスまたは脱ミネラルされた骨マトリックスを含む、BMPsとコラーゲンとの複合物は、BMP活性またはBMP/NCP軟骨発生誘発に関して90%コラーゲンおよび10%非コラーゲン性タンパク質(NCP)からなる。骨マトリックスに不溶性のコラーゲン性マトリックスおよびラミニンまたはフィブロネクチンは、BMPsのためのキャリアーとして作用する。いくつかの成長因子もまた不浸透性層に存在することができる。しかし、大部分はマトリックス層に存在する。一般に、その膜は100 $\mu$ g~5mgの成長因子を含む。

30

40

#### 【0014】

前述のように、その膜は異なる構造を有する少なくとも二つの層からなる。その膜のバリア層は、主としてコラーゲンIおよびIIIから作られるのが好ましい。あるいはまた、これは合成物質、例えばI型コラーゲンおよび/またはIII型コラーゲンのようなコラーゲン物質で場合により被覆された再吸収性の合成ポリマー網状構造からなってもよい。

#### 【0015】

適当な合成物質の例としては、ポリエステル、ポリグリコール酸およびポリ乳酸(PLA)のホモポリマーおよびコポリマー、グリコリドおよびラクチドのコポリマー、ポリオルトエステルおよびポリカプロラクトンがある。これらの多くの例は公に、例えばペーリンガーインゲルハイム社からそれらのRESOMER範囲で入手可能である。約650~1

50

200の適当な分子サイズおよび余りに迅速すぎる程ではない劣化を有するワックスとしてのPLAポリマーが好ましい。特に好ましい生分解性ポリマーは、D-ラクチド対L-ラクチドの比率が70:30であるポリ(D,L-乳酸)である。このような合成物質の利点は、これらが、引き裂かれずに膜インプラントを複雑な三次元の骨欠損上に伸ばすことを可能ならしめるような高い機械的安定性を有することができる点にある。このような物質はまた、縫合用にも適している。

#### 【0016】

有利には、バリア層は、非常にしっかりと結合されるが故に高分子物質がこのバリアに浸透することができないような長いコラーゲン繊維からなる。これらの長い繊維は、高い引っ張り強度および引き裂き抵抗性を有するので、その物質は良好な分離膜であるだけでなく、さらにまた容易に縫合可能でもある。外科においては、膜インプラントは縫合可能であり、または正しい位置にピンで留めることが可能であることが重要である。従来提案された膜の多くではこの可能性は得られない。本発明膜は、移植に外科的に取り扱うことができる程十分に機械的に安定である。

#### 【0017】

マトリックス層は非常に多孔性であり、0.02程度の小さな比重量を有することができる。細胞が非常に迅速にこの層の中に入って成長できるようになっている。膜のこの層は、通常さらにグリコサミノグリカンも含有するが、激しく膨張しそして5000%もの多量の液体を吸収することができる。理想的には、このマトリックス層は、細胞の接着および成長を可能にし、そして接種された細胞が軟骨特異性タンパク質の合成により特徴づけられる軟骨細胞表現型を維持することができるような多孔性構造(孔の容量フラクションおよび孔のサイズ)を提供すべきである。孔のサイズは、コラーゲンIIマトリックスを製造するのに用いる凍結乾燥工程に左右されるが、しかし10~120 $\mu\text{m}$ 、例えば20~100 $\mu\text{m}$ であると考えられる。場合により、孔のサイズは約85 $\mu\text{m}$ であるべきである。このような孔のサイズは、-5~-10で約24時間徐々に凍結し次いで凍結乾燥することにより、または凍結乾燥前にスラリーに重炭酸アンモニウムを加えることにより容易に得られる。

#### 【0018】

膜のマトリックス層は軟骨、好ましくは豚のヒアリン軟骨から得られるコラーゲンII物質によって提供されるのが好ましい。

#### 【0019】

マトリックス層の望ましい厚さは、治療されるべき骨または軟骨の欠損の性質によるが、一般的には2~10mm、例えば4~6mmであると考えられる。バリア層の厚さは0.2~2mm、例えば0.2~0.7mmであるのが好ましい。

#### 【0020】

バリア層はコラーゲンIおよびIIIからなる天然の動物膜により提供され得る。天然源から誘導され、これは身体中で全体に再吸収性であって、有毒な分解生成物を形成しない。また、このような膜は、湿った状態または乾燥状態のいずれでも極めて高い引き裂き強度を有し、それが故に必要により、外科的に縫い合わせることができる。湿っている場合には、その物質は非常に弾性があり、それを不揃いな形の骨欠損上に伸ばすことができる。

#### 【0021】

コラーゲンの外に、天然の動物膜は多くのその他の生物学的物質を含有するが、それらは除去されなければならない。このような膜を酵素、溶媒または他の化学薬品で処理して精製すること、および医薬にこれらの膜を使用することは知られている。これらの物質の大部分は薄すぎるし、しかも使用が特に容易でないことが非常に多い。それらのコラーゲン原繊維はそれらの本来の性質を失ってしまっており、さらに別の不利点は、その物質が、縫合可能な物質として使用するには不十分な強度を有することが多いし、水膨潤性を有していないことが多いし、しかも平滑な銀面と繊維状の肉面との間に全く相違を与えない点である。テロペプチドを含まない精製されたコラーゲンI型またはIII型の繊維状形態は、溶解性がより少なく、生分解性であり、最も有利なキャリアー物質になることが見いだ

10

20

30

40

50

された。

【 0 0 2 2 】

本発明生成物のバリア層を提供する膜としては、天然のコラーゲン構造を保持している子牛または豚の腹膜を挙げることができる。6 ~ 7 週令の若い豚 ( 6 0 ~ 8 0 kg 重量 ) の腹膜が特に好ましい。

バリア層は好ましくは純粋な、天然の ( 変性されていない ) 不溶性コラーゲンからなるべきであり、WO - A - 95 / 18638号に記載の方法にしたがって製造することができる。すなわち、最初に天然膜をアルカリ例えばNaOH水溶液0.2 ~ 4重量%の濃度で処理する。これはアルカリに感受性であるいずれもの脂肪およびまたタンパク質をケン化するのに役立つ。第2工程はその物質を酸、通常は無機酸例えばHClで処理することである。これにより酸感受性の汚染物が除去される。その物質を引き続き、pHが2.5 ~ 3.5になるまで洗浄する。次いでその膜は、平滑面または銀面、および比較的緩くて、より多く繊維状の面を有する。その膜を100 ~ 120 に加熱することによって、いくらか架橋させることが有利であることがある。

10

【 0 0 2 3 】

膜のマトリックス層を提供するのに使用されるコラーゲンII物質は、主としてコラーゲンIおよびIIIからなるバリア層について上述したのと同様の操作によって軟骨から得ることができる。アセトンで処理し、次いでn-ヘキサンのような炭化水素で脂肪を抽出することにより軟骨から水を除去するのが好ましい。ここでエタノールのようなアルカノール、ジエチルエーテルのようなエーテルまたはクロロホルムのような塩素化炭化水素またはこれらの混合物を使用してもよい。次いで脱脂した物質を、いずれもの残留脂肪をケン化しそして存在するタンパク質のいくらかを分解するアルカリでの処理に付す。最後に、その物質を、さらにタンパク質分解を行う酸で処理する。その物質を水中で膨張させ、次いでコロイドミルに通してスラリーを得る。

20

【 0 0 2 4 】

多層膜を製造するには、コラーゲンIIを含有するソフトスラリーを、例えばWO - A - 95 / 18638号により製造した平滑膜の繊維状面に塗布する。通常、コラーゲンIIスラリーが容易に塗布され得るようにその膜を肉面を有する平滑表面上に、例えばその膜の繊維状面中にすり込むことによって置く。こうしてそのスラリーは、コラーゲン膜にしっかりと付着する所望の厚さを有する層を形成する。このようにして形成された二重層を次いで凍結および凍結乾燥に付して、所望の孔サイズを有する所望のスポンジ様構造を得る。必要により、均一の厚さを有する二重膜を得るためにマトリックス層のいくつかを除去してもよい。三重層を製造するには、次いで第2の平滑膜をマトリックス層と接触するその繊維状面を有するマトリックス層の頂上に置く。

30

【 0 0 2 5 】

膜に塗布すべきコラーゲンIIスラリーは、一般に1.0 ~ 4.0重量%、有利には2 ~ 3重量%のコラーゲンを含有する。好都合には、この混合物のpH値は2.5 ~ 4.5、有利には3.0 ~ 4.0に調整されるべきである。

【 0 0 2 6 】

コラーゲンII物質は、マトリックス層を安定にするために、凍結乾燥後に架橋するのが有利である。これもまた、マトリックス層の機械的安定性を増加させそして身体によるその再吸収速度を減少させるのに役立つ。理想的には、架橋度はマトリックスの分解速度が組織再生の速度と釣り合うような程度であるべきである。物理的には、架橋は加熱により遂行され得るが、しかしこれは再吸収性の望ましくない損失を回避するために慎重に行う必要がある。30分から5時間、100 ~ 120 に加熱するのが好ましい。より好ましくは、架橋は例えば8時間までの、UVランプを使用するUV照射により遂行され得る。

40

【 0 0 2 7 】

コラーゲンII物質はグリコサミノグリカンを含有するのが有利である。このグリコサミノグリカンは実際にはコラーゲンIIと反応していくらかの架橋を遂行し、不溶性生成物を製造する。必要により、その物質を加熱することにより、または前述のようなUV照射によ

50

りさらに架橋を行うことができる。グリコサミノグリカンとコラーゲンとの反応は、周囲温度でpH 2.5 ~ 3.5において遂行することができる。グリコサミノグリカンの量は1 ~ 10重量%であるのがよい。このような処理の直後にその物質を凍結または凍結乾燥に付すことができる。

【0028】

あるいはまた、コラーゲンII塊状物のpHを上げることによりスラリー形成を行ってもよい。この方法ではその物質を約4℃に冷却し、そのpH値を4でNaOHの冷水溶液を添加することによりpH値6.5 ~ 7.5まで徐々に上昇させる。引き続き、その物質を周囲温度で15 ~ 25時間保持する。この時間の経過後にスラリーが形成され、そしてスラリー形成後にその物質を凍結または凍結乾燥させることができる。

10

【0029】

さらに別の方法は、コラーゲンII塊状物を中和してpH値6.8 ~ 7.4にし、次いで空気を除去することである。この混合物を鋳型中に置き、37℃で15 ~ 20時間インキュベートする。微細スラリーが発生し、それを引き続き凍結し、凍結乾燥させることができる。

【0030】

上記三つの方法のうちどれを使用するかは、所望生成物の諸性質による。第1の方法は最も安定な生成物を与える。しかし、沈殿が物質の塊を与えることがあり、その方法は極めて慎重に実施しなければならない。第2の方法はソフトで均一な生成物を与えるが、しかしそれは第1の方法の生成物よりも可溶性である。

20

【0031】

スラリーの製造において、医薬のようなさらに別の望ましい物質、例えばタウロリジンのような抗菌剤またはゲンタマイシンのような抗生物質をさらに導入することも可能である。

【0032】

スラリーを膜に塗布後、その物質を凍結する。再生可能な孔サイズを得るためには、凍結を慎重に調整し、凍結の速度および時間、pH値および粒径を正確に調整しなければならない。非常に小さな孔を得るには、その物質を非常に低い温度で衝撃凍結するのがよい。

【0033】

次いで凍結した膜を凍結乾燥し、引き続き110 ~ 130℃に加熱する。この方法で、いくらかの架橋が行われる。その後、凍結乾燥した生体膜をその必要とされる厚さに調整して、マトリックス層の厚さが一般に約2mmとなるようにすることができる。次いで二重膜を、例えばγ-照射によりまたはエチレンオキシドで滅菌する。強い照射、例えば25 KGyの用量での<sup>60</sup>COによる滅菌は、BMPsを不活性化することがある。そのような状況では、移植前にその滅菌マトリックスを滅菌塩水中でBMPsと一緒に含浸させるのがよい。

30

【0034】

本発明膜は以下の方法で医薬に用いることができる。

- 組織再生誘導用の物質として。細胞増殖はマトリックス層により促進される。バリア層は望ましくない細胞増殖を阻止する。
- 軟骨欠損すなわち軟骨下プレートに浸透しない病変の修復用としておよび骨軟骨欠損の修復における物質として。

40

【0035】

本発明はまた、組織再生誘導における前記のような多層コラーゲン膜の使用も提供する。膜のコラーゲンII含有量は、軟骨組織の再生に特に適しているが、しかしまたその他の組織型にも適している。

すなわち、さらに別の特徴を考慮すると、本発明は組織再生誘導インプラントとして使用するための前記の膜を提供する。

【0036】

本発明はさらに、ヒトまたはヒトでない動物体の骨または軟骨欠損の治療方法を提供する

50

。その方法は前記の膜を欠損に適用することからなるが、その膜はバリア層が、骨または軟骨の再生領域中における望ましくない組織型の内方成長を防止するように志向されている。

【0037】

以下に、本発明を実施例により説明するが、それらは本発明を限定するものではない。実施例中、すべての工程は例えばクリーンルームのような無菌状態の下で実施されなければならない。

【0038】

実施例 1

(A) 若い子牛の腹膜を機械的手段により肉および脂肪から完全に取出し、流水下で洗浄し、2% NaOH 溶液で12時間処理する。次いでその膜を流水下で洗浄し、0.5% HCl で酸性化する。その物質がその全厚さにわたって酸性化された(約3時間)後に、それを pH 3.5 になるまで洗浄する。次いでその物質を7% 塩水溶液で縮ませ、1% NaHCO<sub>3</sub> 溶液で中和し、流水下で洗浄する。次いでその物質をアセトンで脱水し、n-ヘキサンで脱脂する。

10

【0039】

(B) 新たに屠殺した豚の凍結した軟骨を冷水に浸し、完全に洗浄し、肉残留物、骨および堅い切片から機械的に精製する。引き続き、その物質を流水下で30分間洗浄する。次いで、その物質をホモジナイザー中で3回粉碎する。サイズ減少終了時の視覚による粒径は約8mmであった。

20

各軟骨片をアセトンで4回、それぞれ8時間ずつ洗浄することにより脱水した。次いで軟骨をn-ヘキサンで4回抽出することにより脱脂する。各処理は少なくとも8時間続けた。ヘキサン対軟骨の比率は1:10であった。

脱脂後、軟骨を飲料水中で膨張させた。水対軟骨物質の比率は10:1であった。処理時間は24時間であった。

次いでその物質をNaOH(5重量%)で処理し、その際軟骨対液体の比率は1:4であり、処理時間は32時間であった。処理中、軟骨の各片を十分に攪拌した。引き続き、軟骨からアルカリを洗い落としした。これにより最初のpHの14は9~11に減少した。溶解した不純物を完全に洗浄し、軟骨から分離した。上記アルカリ処理から得られた液体をグリコサミノグリカン回収のために収集した。

30

次いでコラーゲン物質を、最初は1.0以下のpHの強HCl(約3重量%)で処理した。処理時間は4~6時間であった。

引き続き、その物質をpH値が3~3.5に上昇するのに十分な長い時間、冷水で洗浄した。全ての不純物は除去され、その生成物はスポンジまたは他のコラーゲン物質の製造に適した、塩を含まないコラーゲン塊状物であった。その目的に関して、その軟骨塊状物は意図する結果により、脱脂、凍結ないし凍結乾燥され得る。

前記アルカリ処理から得た抽出物はグリコサミノグリカン、アルカリ、変性タンパク質および塩を含有した。その抽出物を最初にHClで中和したら、中和後のpH値は6であった。次いでその抽出物をろ過助剤すなわち珪藻土で処理した。これは変性タンパク質を除去する効果を有した。0.5重量%の珪藻土を抽出物中に導入し、ろ過により変性タンパク質と一緒に除去した。

40

次いで上澄み液を、約10,000ダルトンで切断される分子量を有する膜を用いた限外ろ過に付した。この方法で塩を除去して、精製グリコサミノグリカンを得た。

こうして得られたグリコサミノグリカン溶液を前記のコラーゲン物質と混合して、グリコサミノグリカンを含有するコラーゲンIIマトリックスを得た。

このコラーゲンII物質は以下の性質:

TG = 2.8 重量%

GAG = 3 重量% (コラーゲン基準で計算された)

pH 値 3.5

を有した。

50

## 【0040】

(C) 前記(A)のようにして製造した新たに製造された腹膜を均一に水中に浸し、繊維状面を上にしてガラスプレート上に平らに置いた。引き続き、その膜を、前記(B)のようにして製造したコラーゲンII塊状物で完全に湿らせた。その膜を、プレートに付着したまま全方向に平らに伸ばした。その際コラーゲンII塊状物は膜の中にすり込んだ。

上記の非常に厚い塊状物をその膜に塗布し、そのプレートを冷蔵庫中約4℃で一夜放置した。その後スラリーが形成された。

そのスラリーを下記の条件：

浴の温度 = -12℃

時間 = 40分

で凍結した。

引き続き、その凍結したスラリーを凍結乾燥し、次いで125℃に加温した。

凍結乾燥時間 = 14時間

コラーゲンIIマトリックス層を引き続き分割して1mmの厚さにした。

## 【0041】

## 実施例 2

実施例1(A)からの新しく製造した腹膜をガラスプレートに塗布し、実施例1に記載のような諸性質を有する厚いコラーゲンII塊状物をその膜の中にすり込んだ。50gのコラーゲンII塊状物を蒸留水で100mlに希釈し、完全に攪拌した。攪拌中、100mlのグリコサミノグリカン溶液を徐々に加えた。コラーゲンがGAGと一緒に塊の形態で沈殿した。沈殿後、その塊をホモジネートし、得られた分散液をその膜に塗布した。スラリーが一夜で形成し、その処理した膜を実施例1に記載のようにさらに加工した。

10

20

---

フロントページの続き

(72)発明者 ズデネク・エクマイア

ドイツ連邦共和国デー - 6 9 4 6 9 ヴァインハイム・ローテトゥルムシュトラッセ 2 8

(72)発明者 ロータール・シュロツサー

ドイツ連邦共和国デー - 6 4 2 9 7 ダルムシュタット・フォン・デア・アーウ・シュトラッセ 2 7

審査官 小森 潔

(56)参考文献 米国特許第 0 5 5 6 7 8 0 6 ( U S , A )

国際公開第 9 6 / 0 2 4 3 1 0 ( W O , A 1 )

国際公開第 9 6 / 0 2 5 9 6 1 ( W O , A 1 )

国際公開第 9 5 / 0 1 8 6 3 8 ( W O , A 1 )

特開平 0 6 - 2 9 2 7 1 6 ( J P , A )

国際公開第 9 7 / 0 3 2 6 1 6 ( W O , A 1 )

特開平 0 8 - 0 0 3 1 9 9 ( J P , A )

国際公開第 9 0 / 0 1 3 3 0 2 ( W O , A 1 )

(58)調査した分野(Int.Cl. , D B 名)

A61L 27/00-27/60

CA/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS(STN)

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamII)