

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第5732197号  
(P5732197)

(45) 発行日 平成27年6月10日 (2015. 6. 10)

(24) 登録日 平成27年4月17日 (2015. 4. 17)

(51) Int. Cl. F I  
**A 6 1 L 27/00 (2006. 01)** A 6 1 L 27/00 G  
**A 6 1 F 2/38 (2006. 01)** A 6 1 F 2/38

請求項の数 10 (全 15 頁)

(21) 出願番号	特願2009-536787 (P2009-536787)	(73) 特許権者	501271413
(86) (22) 出願日	平成19年11月13日 (2007. 11. 13)		ユニヴァーシティ・オヴ・リーズ
(65) 公表番号	特表2010-509965 (P2010-509965A)		イギリス国、エルエス2 9ジェイティー
(43) 公表日	平成22年4月2日 (2010. 4. 2)		リーズ
(86) 国際出願番号	PCT/GB2007/004349	(74) 代理人	100099623
(87) 国際公開番号	W02008/059244		弁理士 奥山 尚一
(87) 国際公開日	平成20年5月22日 (2008. 5. 22)	(74) 代理人	100096769
審査請求日	平成22年11月10日 (2010. 11. 10)		弁理士 有原 幸一
(31) 優先権主張番号	0622846. 4	(74) 代理人	100107319
(32) 優先日	平成18年11月16日 (2006. 11. 16)		弁理士 松島 鉄男
(33) 優先権主張国	英国 (GB)	(74) 代理人	100114591
(31) 優先権主張番号	0707555. 9		弁理士 河村 英文
(32) 優先日	平成19年4月19日 (2007. 4. 19)	(74) 代理人	100154298
(33) 優先権主張国	英国 (GB)		弁理士 角田 恭子
前置審査			最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 半月板インプラントーションのための組織の調製

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

ホストへの引き続くインプラントーションのための天然のドナー半月板組織を調製する方法であって、

( i ) 前記組織を凍結および融解する工程と、  
 ( i i ) 前記組織を低張液中でインキュベートする工程と、  
 ( i i i ) 陰イオン性界面活性剤を含む低張液中で前記組織をインキュベートする工程と、

( i v ) 工程 ( i i ) および ( i i i ) を繰り返す工程と、  
 ( v ) 少なくとも1つのヌクレアーゼ酵素を含む溶液中で前記組織をインキュベートする工程と、

( v i ) 酸化剤を用いて前記組織を洗浄する工程と  
 をこの順番で含み、前記凍結が - 1 0 ~ - 8 0 の間で行われ、

前記凍結および融解する工程が、低張緩衝液の非存在下で少なくとも1回以上行われ、前記組織が低張緩衝液中に浸されるとき1回以上繰り返され、任意選択的に、前記低張緩衝液が pH 8 . 0 の 1 0 m M の T r i s 溶液であり、E D T A およびアプロチニンを含む方法。

【請求項 2】

工程 ( i i ) の低張液でインキュベートする工程が、徐々に上昇する温度での2段階の低張液での洗浄を含み、工程 ( i i ) の低張液でインキュベートする工程が、 陰イオン性

界面活性剤をさらに含む低張溶液中で前記組織をインキュベートする工程を包含する第3段階のインキュベーション工程を任意選択的にさらに含み、前記第3段階のインキュベーション工程が任意選択的に1～3日にわたり、前記第3段階のインキュベーション工程のインキュベーション温度が前記第2段階のインキュベーション工程の温度を任意選択的に上回る、請求項1に記載の方法。

【請求項3】

前記インキュベーション工程(v)の後にキレート剤を含む緩衝液中で前記組織を洗浄する工程をさらに含み、前記緩衝液が任意選択的にPBSであり、前記キレート剤が任意選択的にEDTAである、請求項1または2に記載の方法。

【請求項4】

1つ以上のヌクレアーゼ酵素を含む溶液で前記組織をインキュベートする工程(v)が前記繰り返す工程(iv)の後に続いている、請求項1～3のいずれかに記載の方法。

【請求項5】

酸化剤を用いて前記組織を洗浄する工程(vi)における前記酸化剤がペルオキシ酢酸( $C_2H_4O_3$ )または過酢酸(PAA)であり、前記PAAの濃度が任意選択的に0.01～0.5%(v/v)の範囲である、請求項1～4のいずれかに記載の方法。

【請求項6】

酸化剤を用いて前記組織を洗浄する工程(vi)の後に、漸減する温度でのPBS中の多段階インキュベーション洗浄の工程をさらに包含する、請求項1～5のいずれかに記載の方法。

【請求項7】

移植組織としての使用のための請求項1～6のいずれかに記載の方法によって得られる半月板組織を含む生成物。

【請求項8】

移植組織としての使用のための請求項1～6のいずれかに記載の方法によって得られる半月板組織。

【請求項9】

半月板組織の中央領域における細胞の非存在(100%)または実質的な非存在(90%)によって特徴付けられる請求項7または8に記載の半月板生成物。

【請求項10】

0～20ng/mgの間のゲノムDNA(gDNA)含量によって特徴付けられる請求項7または8に記載の半月板生成物。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、損傷もしくは欠損のある半月板の置換および/または修復のための、組織マトリックス、特に軟部組織マトリックスを調製する方法に関する。本発明はまた、引き続く移植(transplantation)/インプラントーションのための実質的に脱細胞化された半月板組織を提供する。

【背景技術】

【0002】

ヒトの膝は、3つの空間的に相互に関係のある骨(大腿骨、脛骨および膝蓋骨)、靭帯および軟骨構造を含む重要かつ複雑な関節であり、これらの全てが相互に作用して種々の動きを生じる。関節内の膝の骨の表面は、関節軟骨で覆われる。この重要な表面によって骨は骨に対する損傷を生じることなくお互いに対して円滑に滑ることが可能になる。半月板は、骨の関節軟骨表面の間のC型の軟骨クッションであって、重量を分散することによってショックアブソーバとして働き、そのようにして膝の関節の全体的安定性を改善する。各々の膝関節は、内側半月および外側半月を有し、この半月板は線維軟骨細胞、プロテオグリカンならびにコラーゲン線維およびエラスチン繊維からなる細胞外マトリクスから構成される。傷害、疾患または炎症を通じて半月板が損傷されるとき、関節の変化は、罹

10

20

30

40

50

患した個体において膝関節の引き続く膨張、疼痛、および/または膝の関節機能の喪失を発症し得る。断裂した半月板を修復することは可能であるが、重度に損傷した半月板、または大きな裂け目のある半月板は除去しなければならないかもしれない。

【0003】

成体における関節軟骨は通常は大幅な程度では再生されないので、一旦破壊されれば、傷害を受けた成体の半月板は歴史的には、除去および人工補綴物との置換を含む種々の外科的介入によって治療されている。より高齢の患者では、膝関節置換術がしばしば好ましい選択肢である。しかし、より若い個体（50歳または55歳未満の個体）については、関節全体を置換する代わりになる別の方法として、損傷を受けた半月板を置換するために人工の半月板またはドナー組織のいずれかを用いる半月板移植がある。

10

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0004】

半月板の置換のためのドナー組織の使用に関連する問題は、半月板とは細胞外マトリックスを合成、維持および修復を担う細胞である線維軟骨細胞が全体にわたって浸透した高密度の繊維軟骨性組織であるということである。ヒトの内側半月は約4.5cmの長さであって、外側半月は約3.5cmの長さであって、各々の厚みは25~35mmにおよぶ（ブタの値は、ヒト半月の値と同様である）。該半月は分厚くかつ高密度な組織であって、細胞が全体に特に微小血管の周囲に位置するので、特に中央の領域では脱細胞化することが極めて困難で、このことは言い換えると移植のために免疫学的に不活性または脱細胞化された組織を調製することが困難であり、したがって拒絶のリスクがあるということの意味する。言い換えれば、生体適合性が低く、ホストは異種移植片（heterograft）または異種移植片（xenograft）のいずれかに由来する免疫学的反応があるリスクが高い。

20

【0005】

無細胞の生体適合性半月板インプラントを得るために、人工の半月板補綴物が開発されている。しかし、人工の半月板補綴物に関連する問題は、これが天然の半月板組織ほど頑丈ではなく、また天然の半月板の弾性特性を欠き、結果としてこのような補綴物は天然の物質ほどショック吸収に有効ではないということである。

【0006】

ドナーの半月組織を有効に脱細胞化し得る方法によって、半月板のインプラント/移植を必要とする個体の処置に直接の利益がもたらされる。

30

【課題を解決するための手段】

【0007】

本発明の第一の態様によれば、ホストへの引き続くインプラントのためのドナー半月組織を調製する方法が提供され、この方法は、

- (i) 緩衝溶液中で組織を超音波処理する工程と、
- (ii) 該組織を凍結および融解する工程と、
- (iii) 該組織を低張液中でインキュベートする工程と、
- (iv) 陰イオン性界面活性剤を含む低張液中で該組織をインキュベートする工程と、
- (v) 工程(iii)および(iv)を繰り返す工程と、
- (vi) 少なくとも1つのヌクレアーゼ酵素を含む溶液中で該組織をインキュベートする工程と、
- (vii) 酸化剤を用いて該組織を洗浄する工程とを含む。

40

【0008】

好ましくは、工程(ii)は、工程(i)の前に行われてもよく、すなわち、該ドナーの半月組織は、超音波処理手順の前に凍結/融解手順に供されてもよく、これらの2つの工程の順序は、本発明の範囲を限定することを意図していない。

【0009】

50

本明細書の説明および特許請求の範囲を通じて、「含む、包含する (comprise)」および「含む、包含する、含有する (contain)」、ならびにこれらの単語の変化形、例えば、「含んでいる、包含している (comprising)」および「含む、包含する、含有する (comprises)」とは、「含むがそれに限定されない」ことを意味し、他の部分、添加物、成分、整数または工程を除外することは意図しない(そして除外しない)。

【0010】

本明細書の説明および特許請求の範囲の全体にわたって、単数形は、その文脈が他を要求しない限り複数形を包含する。詳細には、不定冠詞を用いる場合、本明細書は、その文脈が他を要求しない限り、複数および単数を意図するものと理解されるべきである。

10

【0011】

本発明の特定の態様、実施形態または実施例に関連して記載される特性、整数、特徴、化合物、化学的部分または基は、矛盾しない限り、本明細書に記載の任意の他の態様、実施形態または実施例に対して適用可能であることが理解されるべきである。

【0012】

本発明の一実施形態では、この方法は、ホストへの引き続くインプラントーションのためのドナー半月板組織を調製する工程を包含し、

(i) 該組織を凍結および融解する工程と、

(ii) 該組織を低張液中でインキュベートする工程と、

(iii) 陰イオン性界面活性剤を含む低張液中で該組織をインキュベートする工程と

20

(iv) 工程(ii)および(iii)を繰り返す工程と、

(v) 少なくとも1つのヌクレアーゼ酵素を含む溶液中で該組織をインキュベートする工程と、

(v) 酸化剤を用いて該組織を洗浄する工程とを包含する。

【0013】

本発明のこの実施形態では、緩衝溶液中で該組織を超音波処理する工程は省略される。本発明の方法は超音波の工程なしに首尾よく達成され得ることが発見されたが、半月板組織が一旦脱細胞化されれば、超音波の工程によって、インプラントーションの際に再細胞化の改善が可能になると考えられる。したがって、これは、本発明の任意の好ましい工程であるが、引き続く再細胞化を改善するために必要であり得る工程であり、したがってある場合には、本発明の方法の一部として行われる。

30

【0014】

該半月板は、同種異系または異種のドナーの膝関節からの内側半月または外側半月の全体または一部を除去することによって入手できることが理解される。

【0015】

好ましくは、好ましい半月板のレシピエントはヒトであり、別の場合には、該レシピエントは、該組織の損傷または変性の結果として半月板インプラントを要する任意の他の種であってもよい。

40

【0016】

異種移植 (xenograft または xeno-transplant) は、ある種のドナーから別の種のレシピエントへの組織の移植である。異種移植 (heterograft および hetero-transplant) という用語も時々用いられるが、同種移植 (homograft または allograft) という用語は、同じ種の移植をいう。

【0017】

本発明では、該レシピエントがヒトである場合、該ドナーは、好ましくはヒト、または厚みおよび強度などのほぼ釣り合いのとれた生理学的特性の半月板を有する任意の他の哺乳動物である。

50

## 【0018】

好ましくは、該半月板ドナー組織はヒトまたはブタのいずれか由来である。

## 【0019】

本明細書で先に言及された脱細胞化は、超音波の非存在下で達成され得るが、本発明の方法に含まれる場合、該超音波処理工程は、リン酸緩衝生理食塩水(PBS)または任意の他の生理学的に受容可能な緩衝液中で行われる。

## 【0020】

好ましくは超音波エネルギーはパルスされ、典型的な形態は1、2、3、4、5、6、7または8秒オンであって、0.5、1または2秒オフであるが、正確なパルスのタイミングは、本発明の範囲を限定するとは意図されないことが理解される。

10

## 【0021】

好ましくは、該超音波のパワーは100~700ワットであり、より好ましくは約400ワットである。

## 【0022】

該超音波処理工程は好ましくは10~40分間、理想的には約20分間行われ、好ましくは室温未満で行われる。理想的には超音波処理は約4で行われる。

## 【0023】

該凍結/融解のプロセスは好ましくは、例えば、-10~-80、典型的には-20で、2~24時間該組織を凍結させる工程と、引き続いて該組織を室温に達するまで約2、3または4時間解凍する工程とを包含する。このプロセスは、少なくとも1回、好ましくは2回、低張性緩衝液の非存在下で行われ、該組織が低張性緩衝液に浸される場合は、再度少なくとも1回、好ましくは2回繰り返される。低張性緩衝液の有無における該凍結/融解は、逆にされてもよく、任意選択的に変更されてもよいことが理解される。低張液とは、電解質の濃度が細胞中の濃度よりも低い溶液である。この状況では、浸透圧によって、細胞壁の内側および外側の電解質濃度を同等にしようとして、細胞への水の移動もたらされる。

20

## 【0024】

好ましくは、低張性緩衝液はpH約8.0の10mM Tris溶液であり、約0.1%(w/v)のEDTAおよびアプロチニンを(約10KIU $\cdot$ ml<sup>-1</sup>の濃度で)含む。

30

## 【0025】

好ましくは、低張液での該インキュベーションの工程は、温度が徐々に上昇する2段階の低張液での洗浄を含む。第一の段階は、約12~48時間、典型的には約24時間、室温未満だが凍結を上回る温度、例えば約4でのインキュベーションであり、第二段階のインキュベーションは、ほぼ同じ期間にわたり、室温を上回る温度、例えば約37であって、第三段階(超音波処理が行われる実施形態では工程(iv)、省略される場合は工程(iii))を、陰イオン性界面活性剤をさらに含む低張液中で該組織をインキュベーションすることによって行う。該陰イオン性界面活性剤でのこの第三の洗浄工程は、1~3日、好ましくは約48時間にわたる、該第二の洗浄を上回るが煮沸は下回る温度、例えば約55でのインキュベーションを含む。

40

## 【0026】

本明細書で先に記載されたインキュベーション工程において上記で特定されるインキュベーションの温度および期間は、本発明の方法について適切なプロトコルを例示するものであり、本発明の範囲を限定する意図ではない。

## 【0027】

好ましくは、該陰イオン性界面活性剤はドデシル硫酸ナトリウム(SDS)である。好ましくは、これは0.03~0.3%(v/v)の範囲の濃度での該低張性洗浄用液中に存在し、さらに好ましくは約0.15%(v/v)で存在する。

## 【0028】

好ましくは、超音波処理が行われる場合には工程(iii)および(iv)の3段階の

50

インキュベーション工程を、超音波処理が省略される場合には工程 ( i i ) および ( i i i ) を最低 3 サイクル繰り返す。

【 0 0 2 9 】

好ましくは、本発明の 1 実施形態では、超音波処理が行われる場合は工程 ( v ) の後に、陰イオン性界面活性剤を含む低張液又は含まない低張液での洗浄の工程の超音波処理が省略される場合、工程 ( i v ) の後、この方法はさらに緩衝液中で組織の洗浄する工程を包含する。

【 0 0 3 0 】

好ましくは、該緩衝液は P B S である。該洗浄プロセスは、40 ~ 60 の温度で、理想的には約 55 で 1、2 または 3 時間の間の反復されるインキュベーションを含んでもよい。この工程は好ましくはさらに 1、2 または 3 回反復される。

10

【 0 0 3 1 】

好ましくは、この方法は、1 つ以上のヌクレアーゼ酵素を含む溶液でのインキュベーション ( 超音波工程が使用される場合、工程 ( v ) または工程 ( v i ) ) を包含する。

【 0 0 3 2 】

該ヌクレアーゼ酵素を用いて、石灰化の部位として機能することが示されている任意の残りの核物質を消化する。

【 0 0 3 3 】

典型的であるが非限定的なヌクレアーゼインキュベート溶液は 50 mM の T r i s 溶液 ( p H 7 . 5 )、10 mM の M g C l <sub>2</sub>、ウシ血清アルブミン ( 50 μ g / m l ) であつて、R N a s e ( 1 U · 1 m l <sup>-1</sup> ) および D N a s e ( 50 U · m l <sup>-1</sup> ) を含む。

20

【 0 0 3 4 】

組織は好ましくは、穏やかに攪拌しながら、ヌクレアーゼ溶液とともに典型的には約 37 で、約 2、3 または 4 時間にわたってインキュベートされる。

【 0 0 3 5 】

ヌクレアーゼ溶液とのインキュベーション後、次いで該組織を好ましくはさらに約 12 ~ 48 時間、典型的には 24 時間、30 ~ 50 で、典型的には約 37 で、高張液中でインキュベートする。

【 0 0 3 6 】

好ましくは該高張液は、T r i s 溶液 ( 0 . 05 M ) p H 7 . 6 に 1 . 5 M の N a C l および E D T A ( 0 . 1 % w / v ) を加えたものである。

30

【 0 0 3 7 】

好ましくは、該組織は次に、P B S およびキレート剤を含む緩衝液中で 12 ~ 24 時間洗浄される。

【 0 0 3 8 】

好ましくは、該キレート剤は、0 . 1 % の濃度 ( w / v ) の E D T A である。

【 0 0 3 9 】

好ましくは、本発明の方法の最終工程の酸化剤は、過酢酸としても公知であつて、通常は P A A と略されるペルオキシ酢酸 ( C <sub>2</sub> H <sub>4</sub> O <sub>3</sub> ) である。

【 0 0 4 0 】

好ましくは、P A A の濃度は 0 . 01 ~ 0 . 5 % ( v / v ) の範囲であつて、さらに好ましくは約 0 . 1 % P A A ( v / v ) である。

40

【 0 0 4 1 】

好ましくは、この方法はさらに、漸減する温度で P B S 中での多段階のインキュベーション洗浄を包含する。この最終段階の洗浄のための典型的なプロトコールは、35 ~ 50、理想的には 45 での 12 ~ 48 時間、典型的には 24 時間の P B S での第一の洗浄、30 ~ 40 で、理想的には 37 で同様の期間の間の第二のインキュベーション洗浄、および 0 ~ 10 および理想的には 4 での同様の期間の最終インキュベーション洗浄である。

【 0 0 4 2 】

50

好ましくは、該多段階のインキュベーション洗浄は、さらに1回、2回、3回、4回、5回、6回、7回または8回反復される。

【0043】

本発明の方法の説明全体にわたって、言及される期間、温度および濃度は、例としてのみ与えられ、本発明の範囲を限定すると意図されないことが理解される。

【0044】

好ましくは、この方法はさらに、引き続き使用のための該調製された組織を保存する工程を包含する。

【0045】

このような工程は例えば、凍結保存または低温保存によって示される。

10

【0046】

本発明のさらなる態様によれば、本発明の方法によって生成される移植生成物が提供される。

【0047】

本発明のなおさらなる態様によれば、移植組織としての使用のための、本発明の方法によって入手可能な半月板組織が提供される。

【0048】

本発明のなおさらなる態様によれば、移植組織としての、本発明の方法によって入手可能な半月板組織の使用が提供される。

【0049】

20

好ましくは、本発明によって生成される生成物は、該半月板組織の該中央領域における細胞の非存在(100%)または実質的な非存在(90%)によって特徴付けられ得る。

【0050】

本発明の方法は、線維軟骨細胞などの細胞を実質的に欠いている半月板組織を調製することができる手段を提供する。

【0051】

好ましくは、本発明によって生成される生成物は、0~20ng/mgの間のゲノムDNA(gDNA)含量によって、さらに好ましくは0~10ng/mgのgDNA含量、さらに好ましくは0~5ng/mgのgDNA含量によって特徴づけることができる。

【0052】

30

したがって、本発明の生成物は、線維軟骨細胞などの細胞を実質的に欠き、gDNA含量があっても無視できるものであり、それ自体が引き続き移植のために最も適切な物質である。

【0053】

本発明の方法および生成物は有利にも、脱細胞化の改良された方法のおかげでホストによる拒絶のリスクが最少である、該ホストと真に生体適合性である天然の半月板組織を提供すると考えられる。

【0054】

本発明の方法は、半月板の外側および中央の領域ならびに特に微小血管の周囲の領域および中央に位置する該組織内の深部における、脱細胞化に対して問題となる領域から半月板組織を脱細胞化するために首尾よく使用されている。

40

【0055】

本発明のなおさらなる態様によれば、本明細書において先に記載された該溶液を備え、任意選択的にその使用のための1セットの書面の説明書を備えるキットが提供される。

【0056】

本発明のなおさらなる態様によれば、本発明の第一の態様の方法に従って脱細胞化されたドナー半月板組織を調製する工程と、該損傷または欠損のある半月板を該脱細胞化された半月板と置き換える工程とを含む、半月板移植を要する個体の処置の方法が提供される。

【0057】

50

本発明はここで、以下の図面を参照して単なる例として記載される。

【図面の簡単な説明】

【0058】

【図1】本発明の方法に従う工程手順による典型的な工程のフローダイヤグラムを示す。

【図2】種々のプロトコルを用いる脱細胞化後のブタ内側半月板のDNA含量および組織像を示す。図2Aは新鮮な半月板を示し、図2Bは基礎的な脱細胞化手順後の半月板を示す。図2Cは、脱細胞化および超音波処理後の該半月板を示し、図2Dは、55での脱細胞化および超音波処理後の半月板を示し、図2Eは、55での脱細胞化、超音波処理および凍結融解の後の該半月板を示す。図2Fは、55での脱細胞化(2回)、超音波処理および凍結融解の後の該半月板を示す。図2Gは55での脱細胞化(3~4回)、超音波処理、凍結融解およびPAA処理の後の該半月板を示す。

10

【図3A】新鮮なブタの半月板由来のある範囲の組織像を示す。

【図3B】本発明の方法に従う脱細胞化後の同等の領域由来の組織像を示す。

【図4】新鮮な半月板組織および脱細胞化した半月板組織の生化学的データを示す。

【図5】新鮮な半月板組織および脱細胞化した半月板組織における -ゲルの免疫ペルオキシダーゼ染色を示す。

【発明を実施するための形態】

【0059】

[材料および方法]

[半月板組織の調製]

ブタの半月板は、動物の屠殺の24時間内に地方の食肉処理場から入手した。その半月板は、膝の被膜を穏やかに切除することによって膝関節から切開し、その後に前十字靭帯および後十字靭帯の両方を切断して該半月板を露出した。次いで、半月板角付着に対して垂直に切開して、該半月板を解放した。次いで、該被膜および該半月板付着から余計な組織をハサミで取り除いた。次いで半月板を取り出して、PBS(Oxoid)中で洗浄して、過剰な血液を除去した。次いでサンプルを、将来使用するためにPBSで湿らせた濾紙上に-40で保管した。

20

【0060】

[組織/組織像調製物]

組織標本(n=3)を10%(v/v)の中性の緩衝ホルマリン中に48時間固定し、次いで脱水してパラフィンワックスに包埋した。6μmの厚みの連続切片をとって10切片中1つ用いた。標準的なヘマトキシリンおよびエオシン(H&E)(Bios Europe Ltd., Skelmersdale, UK)染色を用いて、組織構造を評価した。核酸はHoechst色素を用いて染色した(ビス-ベンズイミドH33258五水和物、Molecular Probe、ユージーン、オレゴン州)。 -Gelのモノクローナル抗体はAlexis biochemicals、サンディエゴ、米国から入手した。

30

【0061】

[超音波処理]

組織サンプル(2cm幅)を、Southern Syringes Ltd.から購入した4-0プロレーン縫合(prolene sutures)を用いてアルミニウムガーゼに対して縫合した。これを、氷上で保持した氷冷PBSを充てんした250mlのガラスビーカーの中に入れた。種々の超音波の形態(高強度超音波プロセッサー、600ワット、モデル601、Progen Scientific、メクスバラ、サウスヨークシャー州)を、あらゆる処理の後に変化されている該PBSを用いて直接プローブ下に該組織サンプルを置くことによって、該組織サンプルに適用した。完了の際、該組織を取り出して、残りの脱細胞化手順に供した。該パルス形態は、PBSを変更し、繰り返す前に10分間、1秒オン、1秒オフであった。

40

【0062】

[半月板の圧入(indentation)]

50

圧入装置を用いて、新鮮なブタ半月板および脱細胞化されたブタ半月板の負荷時の変形を分析した。リグは、シャフトから構成され、該シャフトは、該シャフトの移動をモニタリングするための線形可変差動変圧器 (LVDT) に対して一端および他方の端で接続された、取り外し可能な 3 mm の円柱状の剛直な平坦な圧子を有する。重量を該 LVDT の下において、該シャフトの動きを手動の解放機構によって開始した。該 LVDT は、ステップの高さおよび得られた較正係数を用いて較正した。該 LVDT は、0.001 インチの解像度を有した。該シャフトの速度は、油入りダッシュポットによって制御した。6 mm の直径のカッターを用いてサンプル (n = 3) を最初に切断して、円柱形状のプラグを取り出した。3 mm を測定した切片をもとのプラグの中心から取り出した。サンプルを、両面粘着テープ (3M、Loughborough、英国) およびシアノアクリレート接着剤の液滴を用いてサンプルホルダーの基部に固定した。約 2 N のロードを粘性のダッシュポットを通じて適用した。サンプルを PBS に浸した。試験を 1 時間行った。該 LVDT によって、結果を電圧に対する時間のフォーマットで作成することが可能になった。データは、Lab View 8 (National Instruments、オースティン、米国) を用いて、較正係数を適用して得られ、結果を時間対変形 (mm) に変換した。

10

## 【0063】

## [ヒドロキシプロリンアッセイ]

ヒドロキシプロリンアッセイを行う前に、サンプル (n = 3) を一定重量まで凍結乾燥して、その後に 6 M の塩酸 (HCl) を用いて 4 時間、120 °C でのインキュベーションによって加水分解し、水酸化ナトリウム (NaOH) を用いて中和した。採用した手順は、Edwards および O'Brien が記載した方法に基づいた [29]。標準的な較正溶液を、トランス-4-ヒドロキシ-L-プロリン (Sigma) を用いて作成した。試験溶液 (50 µl) を平底 96 のウェルプレートのウェルに添加して、ここに 100 µl の酸化溶液 (クロロミン T 水和物、Sigma) を添加し、穏やかに攪拌しながら 5 分間おいた。次いで Ehrlich (エールリッヒ) 試薬 (100 µl) を各々のウェルに添加した。次いでそのプレートをカバーして、水浴中において 60 °C で 45 分間インキュベートし、その後に吸光度を 570 nm で読んだ。次いで、ヒドロキシプロリンの濃度を、ヒドロキシプロリン標準曲線から補間によって決定した。

20

## 【0064】

## [硫酸化糖アッセイ]

硫酸化糖アッセイを行う前に、サンプル (n = 3) を一定の重量まで凍結乾燥し、その後パパイン緩衝液 (pH 6.0 の PBS 中の、1 mg · ml<sup>-1</sup> パパイン、Sigma であり、5 mM のシステイン-HCl、Sigma、および 5 mM の Na<sub>2</sub>EDTA、VWR を含む) 中において 60 °C で 48 時間、組織を酵素消化した。その方法は Fardale et al. から採用した [30]。要するに、標準の較正溶液は、硫酸コンドロイチン (Sigma) から作成した。標準または試験溶液 (40 µl) を 250 µl の 1, 9-ジメチレンブルー溶液に、平底の 96 ウェルプレートのウェル中に添加した。次いでその吸光度を 1 分後に 525 nm で読んだ。次いで、グリコサミノグリカン (GAG) に相当する硫酸化糖の得られた濃度を、該標準曲線からの補間によって決定した。

30

40

## 【0065】

## [gDNA 存在の抽出および分析]

ゲノム DNA (gDNA) は、組織のための DNA 単離キット (Roche Applied Sciences、インディアナポリス、米国) を用いて抽出した。要するに、200 mg の新鮮なブタ半月板組織および脱細胞化ブタ半月板組織を、プロテイナーゼ K 溶液を用いて消化した (n = 3)。この後、RNase 溶液を加えて、サンプル中に存在する RNA を消化した。次いでタンパク質沈殿溶液を添加して、該サンプルを遠心分離した (15,000 g、20 分、20 °C)。次いで、イソプロパノール (0.7 容積、VWR) をペレットに添加して、存在する DNA を回収した。次いで、該単離された DNA ペレットを氷冷 70% (v/v) エタノールで洗浄して、風乾させ、その後に tris-E

50

D T A 緩衝液 ( S i g m a ) 中で再懸濁した。

【 0 0 6 6 】

定量的には、g DNA の存在を E - g a l P o w e r B a s e システム ( I n v i t r o g e n 、 ペーズリー、英国 ) を用いて分析した。乾燥 2 % ( w / v ) アガロース E - ゲル ( I n v i t r o g e n ) をサンプルの添加の前に基部に挿入した。再懸濁したサンプル ( 4  $\mu$  l ) を、ローディング緩衝液 ( 2  $\mu$  l 、 I n v i t r o g e n ) を添加することによって調製して、サンプルのローディングを容易にさせた。次いで、総容積を E - ゲルの個々のレーンにロードし、次いで電気泳動した。1 k b の DNA ラダー ( F e r m e n t a s I n c . 、 S h e r i f f H u t t o n 、 英国 ) を並行して泳動し、単離された DNA のサイズを評価した。臭化エチジウムでの染色によって、K o d a k G e l L o g i c 1 5 0 0 システム ( E a s t m a n K o d a k C o m p a n y 、 八口一、英国 ) での視覚による検査を可能にさせた。DNA は、N a n o d r o p 分光計で 2 6 0 ~ 2 8 0 n m での吸光度を測定することによって定量した ( L a b t e c h I n t . 、 R i n g m e r 、 英国 ) 。

10

【 実施例 1 】

【 0 0 6 7 】

図 1 を参照すると、本発明の方法の 1 実施形態の典型的なフローチャートが示されている。図 1 のプロトコールに関しては、超音波および凍結 / 融解の順序を逆にしてもよいが、本明細書において以下に示されるとおり、超音波処理、凍結 / 融解および P A A での処理の工程は、半月板組織の完全な脱細胞化を果たすのに必須である。

20

【 実施例 2 】

【 0 0 6 8 】

図 2 A ~ G を参照すると、半月板の模式図が、半月板の全体的な断面形状を近似するため直角三角形として示され、細胞密度の指標である細胞の DNA 含量を示す H o e c h s t 染色が示されている。さらに、組織像のスライドが右側に提供される。図 2 A - G は、種々のプロトコールを用いる脱細胞化後のブタの内側半月の DNA 含量および組織像を示す。

【 0 0 6 9 】

図 2 A は、新鮮なブタの内側半月、および該組織全体にわたる細胞の存在を示し、ここで半月板の外側から内側の領域への細胞の DNA 含量または細胞密度の均一な分布がある。

30

【 0 0 7 0 】

図 2 B のブタの内側半月の脱細胞化について、従ったプロトコールは、B o o t h , C e t a l . 「 T i s s u e e n g i n e e r i n g o f c a r d i a c v a l v e p r o s t h e s e s I : D e v e l o p m e n t a n d h i s t l o g i c a l c h a r a c t e r i s a t i o n o f a n a c c e l l u l a r p o r c i n e s c a f f o l d 」、T h e J o u r n a l o f H e a r t V a l v e D i s e a s e 1 1 、 p p . 4 5 7 ~ 4 6 2 ( 2 0 0 2 ) に記載される。このプロセスは、超音波処理も凍結 / 融解も含まないが、室温での SDS インキュベーション工程を使用する。この手順に従った DNA 含量についての結果によって、細胞が半月板末梢領域のみから除去されていること、および細胞が内側の領域には依然として存在することが示される。図 2 C で使用されるプロトコールは、B o o t h e t a l . に記載のプロトコールに超音波工程がさらに加わる。その結果、末梢の細胞は、該内側領域からある程度は一緒に除去されているが、細胞はほとんどの半月板全体に依然として残っていることが示される。図 2 C のプロトコールと同じプロトコールに従うが、脱細胞化陰イオン性界面活性剤 ( S D S ) を上昇した温度 ( 5 5 ) で用いた結果 ( 図 2 D ) によって、細胞は半月板のかなりの割合から完全に除去されているが、密度が減っても半月板の中央には依然として存在していることが示される。図 2 E で従ったプロトコールに関して、これは、5 5 での脱細胞化、超音波処理および凍結 / 融解の後の半月板を示している。この結果によって、細胞は、中央領域全体において低密度で見いだされ、微小血管の周囲に位

40

50

置する細胞数が多いことが示される。図 2 F について、55 での脱細胞化（2 回）、超音波処理および凍結 / 融解に従ったプロトコールでは、極めて少数の細胞しか残っておらずその細胞が溶解され、該半月板の該中央内にランダムに位置する限りにおいて、結果はさらによい。図 1 の 55 での脱細胞化（3 回）、超音波処理、凍結 / 融解および PAA 処理で示された本発明の方法を使用する図 2 G の結果を参照すれば、細胞の完全な除去が見られる。Hoescht 染色によって、完全な細胞除去に起因する DNA の完全な欠失が示される。

【0071】

種々の脱細胞化プロトコールから得られた結果は、試験された不完全なプロトコールのいずれを用いても、他の先行技術の方法を用いても不可能である、完全な脱細胞化が、本発明の方法を用いて達成され得るということを示す。

10

【実施例 3】

【0072】

図 3 A を参照すると、新鮮なブタ内側半月板内の細胞分布が示されている。半月板の断面積は直角三角形を近似し（図 2 A ~ 2 G を参照のこと）、脱細胞化に対する問題の領域が該半月板の外側および中央の領域、特に中央に位置する組織内の微小血管深部の周囲を含むことが示される。実施例 2 A ~ 2 E に示されるとおり、本発明に従う不完全な方法を用いて脱細胞化され得る領域は、上方および下方の末梢の半月板および内部半月板であった。図 3 B を参照すると、本発明の方法によって脱細胞化されたブタ内側半月と同等の部分が示され、ここでは問題のある外側および中央の領域を含む半月板は完全に細胞を欠き、言い換えれば、半月板は完全に脱細胞化されて、ホストへの移植に適切な組織が得られる。

20

【実施例 4】

【0073】

図 4 は、本発明の方法に従って脱細胞化されている新鮮な半月板および脱細胞化半月板の両方について時間に対する変形のグラフを示す。このデータは、圧入を用いる生体力学試験の図を提供する。この結果、脱細胞化された半月板が新鮮な組織に比較して同様の圧縮の生体力学特性を有し、したがって釣り合いのとれた物理的特性を有し、かつホストへの移植に適切であることが示される。

【実施例 5】

【0074】

異種の Gal 1 - 3 Gal 1 - 4 GlcNac - R すなわち - Gal エピトープは、異種移植において超急性の拒絶反応を担うことが公知である。組織工学（再生医療）では、残存 - Gal エピトープはヒトで重度の炎症を誘発し得、移植片の不全をもたらし得る。図 5 A は、新鮮なブタ内側半月板におけるモノクローナルの抗 Gal 抗体を用いる - Gal エピトープの存在についての陽性の免疫ペルオキシダーゼ染色を示す。本発明の方法に従って脱細胞化された半月板と比較した場合、図 5 B は、陰性染色によるエピトープの非存在を示す。これらの結果は、本発明の方法によって調製された該半月板が - Gal エピトープ欠損であり、したがって、ヒトのホストへの移植に適切であることを示す。

30

40

【実施例 6】

【0075】

新鮮ブタ半月板組織の乾燥重量 1 mg あたりのヒドロキシプロリンの濃度は  $143.3 (\pm 23.29) \mu\text{g} \cdot \text{mg}^{-1}$  であった。脱細胞化の後、ヒドロキシプロリンの濃度は  $123.96 (\pm 36.3) \mu\text{g} \cdot \text{mg}^{-1}$  であることが見出された。脱細胞化組織に比較して新鮮な組織のヒドロキシプロリン含量には有意差はなかった（ANOVA、 $p > 0.05$ ）。

【実施例 7】

【0076】

新鮮なブタ半月板組織の乾燥重量 1 mg あたりの硫酸化糖の濃度は  $30.3 (\pm 3.9$

50

)  $\mu\text{g} \cdot \text{mg}^{-1}$  であった。脱細胞化後、硫酸化糖の濃度は  $12.3 (\pm 1.6) \mu\text{g} \cdot \text{mg}^{-1}$  であることが見出され、このことは  $59.4\%$  の損失を示している。脱細胞化組織に比較した場合、新鮮組織の硫酸化糖含量には有意差があり (ANOVA、 $p < 0.05$ )、このことはGAGの損失を示している。

【実施例 8】

【0077】

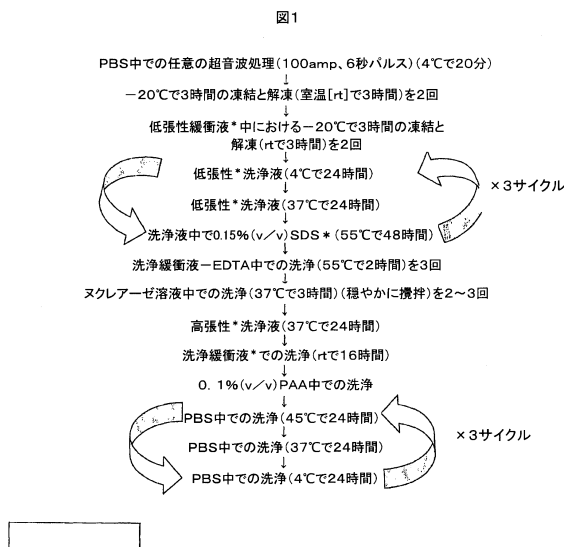
脱細胞化半月板組織サンプルを処理して、ゲノムDNA (gDNA) を抽出し、ロードして、アガロースゲル上で電気泳動し、新鮮な半月板組織 (ほぼ  $10,000$  塩基対の明確なバンドを示した) と比較してgDNAがないことを確認した (図示しない)。結果を、分光光度計を用いて定量的に確認し、ここで  $260 \sim 280 \text{ nm}$  の間の吸光度のピークが、新鮮な組織サンプルについてみられ、このことはgDNAの存在を示している。このピークは  $40 (\pm 9.7) \text{ ng} \cdot \text{mg}^{-1}$  に相当した。  $2 (\pm 0.5) \text{ ng} \cdot \text{mg}^{-1}$  に対応する脱細胞化組織について小さいピークも記録された。

10

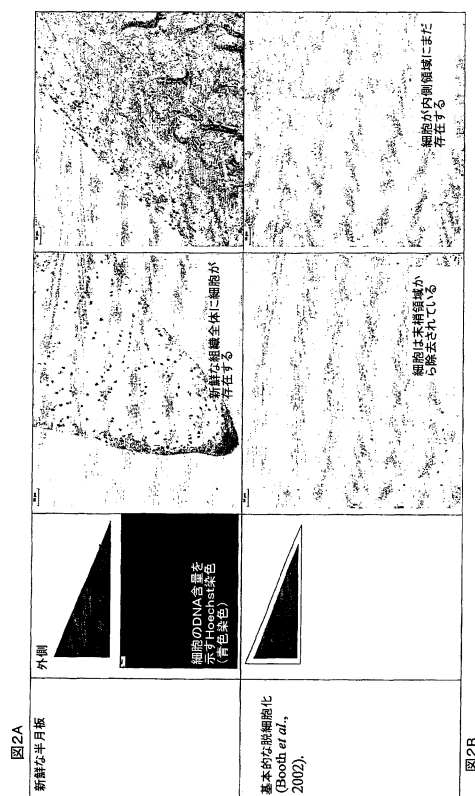
【0078】

結論として、本発明の方法は、完全に脱細胞化されかつ免疫学的に不活性なブタまたはヒトのドナー半月板組織であって、その物理的特性を保持している半月板組織を提供することが可能であることを示す。このような半月板は、ホストへの引き続き移植に用いられ得、これによって健全な半月板のものと同じ強度および機能的な能力を提供しながら、移植拒絶の確率を回避または最小化する。

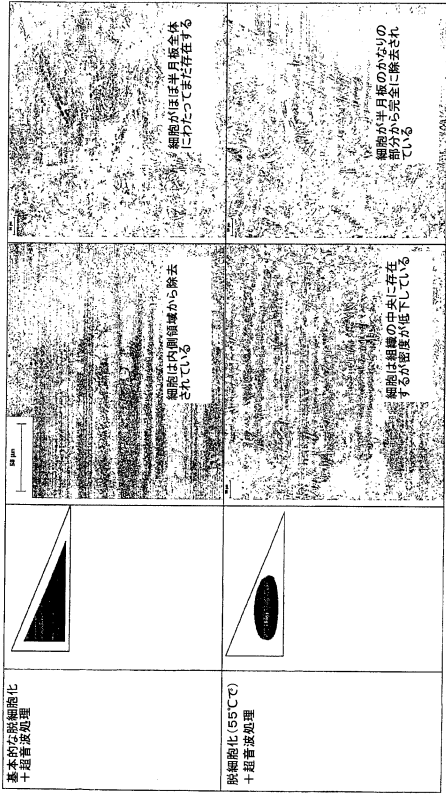
【図 1】



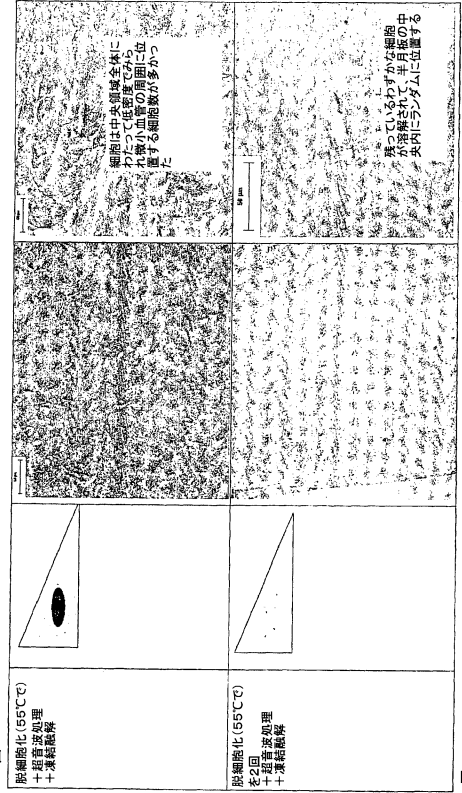
【図 2 A . 2 B】



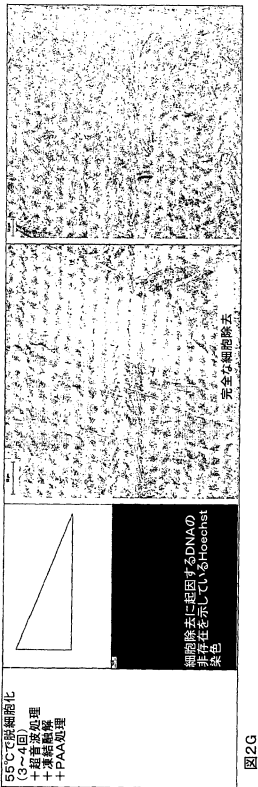
【 図 2 C . 2 D 】



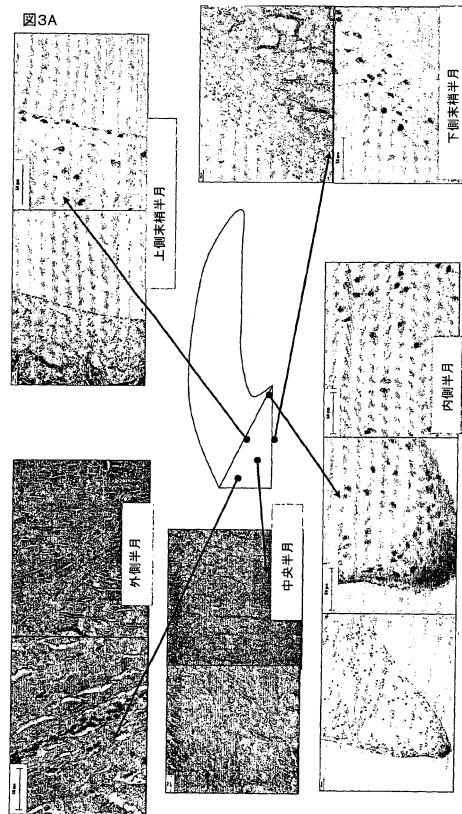
【 図 2 E . 2 F 】



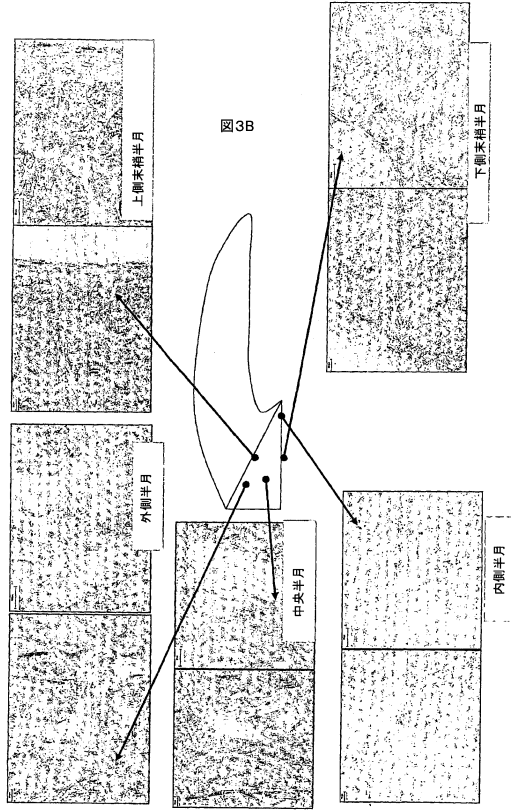
【 図 2 G 】



【 図 3 A 】



【 図 3 B 】



【 図 4 】

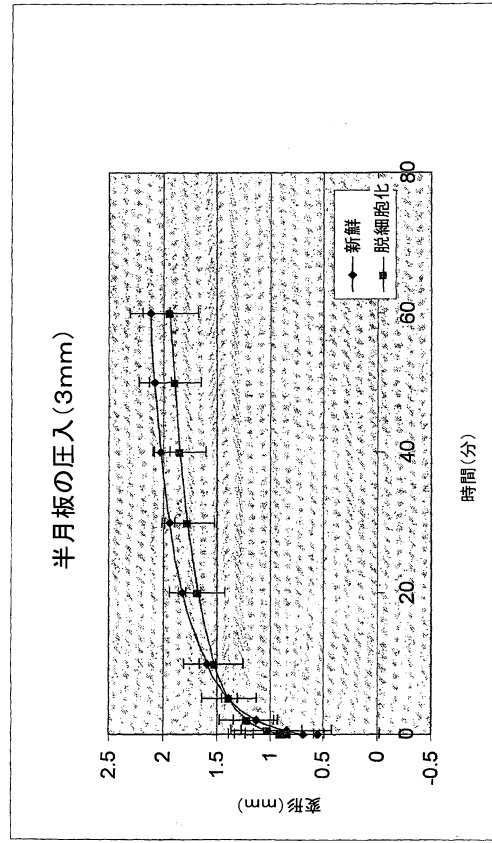


図4

【 図 5 】

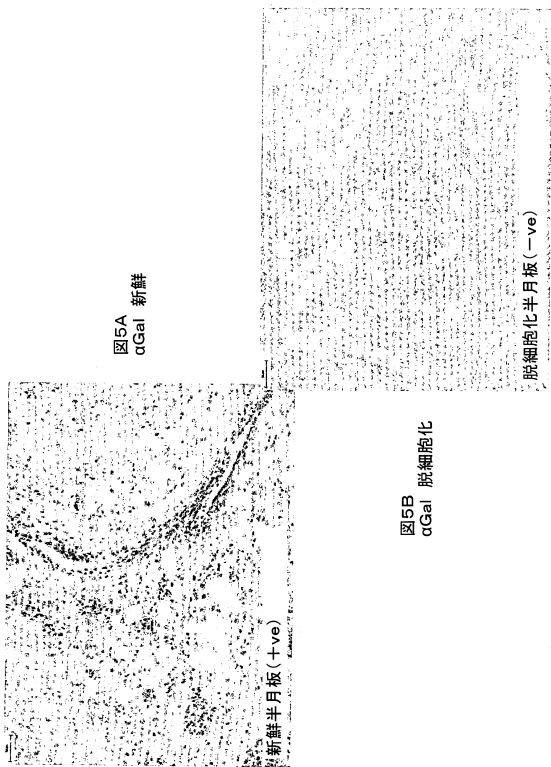


図5A  
αGal 新鮮

図5B  
αGal 脱細胞化

## フロントページの続き

- (72)発明者 インガム, アイリーン  
イギリス国、エルエス2 9ジェイティー リーズ, ユニヴァーシティ・オヴ・リーズ, インステ  
イテュート・オヴ・モレキュラー・アンド・セルラー・バイオロジー, ファカルティ・オヴ・バイ  
オロジカル・サイエンス
- (72)発明者 フィッシャー, ジョン  
イギリス国、エルエス2 9ジェイティー リーズ, ユニヴァーシティ・オヴ・リーズ, インステ  
イテュート・オヴ・モレキュラー・アンド・セルラー・バイオロジー, ファカルティ・オヴ・バイ  
オロジカル・サイエンス
- (72)発明者 ステイブルトン, トーマス  
イギリス国、エルエス2 9ジェイティー リーズ, ユニヴァーシティ・オヴ・リーズ, インステ  
イテュート・オヴ・モレキュラー・アンド・セルラー・バイオロジー, ファカルティ・オヴ・バイ  
オロジカル・サイエンス
- (72)発明者 イングラム, ジョアン  
イギリス国、エルエス2 9ジェイティー リーズ, ユニヴァーシティ・オヴ・リーズ, インステ  
イテュート・オヴ・モレキュラー・アンド・セルラー・バイオロジー, ファカルティ・オヴ・バイ  
オロジカル・サイエンス

審査官 小森 潔

- (56)参考文献 特表平09-510108(JP,A)  
特開2003-180819(JP,A)  
国際公開第05/089411(WO,A1)  
特表2004-535242(JP,A)  
特表2004-532714(JP,A)  
国際公開第05/063314(WO,A1)  
国際公開第05/063316(WO,A1)  
特表2003-518981(JP,A)  
Journal of Biomedical Materials Research. P  
art A., 2005年, Vol. 75, No. 1, p23-30  
人工臓器, 1988年, Vol. 17, No. 4, p1523-1528

## (58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

A61L 27/00-27/60  
CAplus/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS(STN)  
GenBank/EMBL/DDBJ/GenSeq