

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局



(43) 国際公開日
2005 年 4 月 21 日 (21.04.2005)

PCT

(10) 国際公開番号
WO 2005/035014 A1

(51) 国際特許分類⁷: A61L 27/00, A61K 48/00

(21) 国際出願番号: PCT/JP2004/015673

(22) 国際出願日: 2004 年 10 月 15 日 (15.10.2004)

(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 2003-355505
2003 年 10 月 15 日 (15.10.2003) JP

(71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 独立行政法人科学技術振興機構 (JAPAN SCIENCE AND TECHNOLOGY AGENCY) [JP/JP]; 〒3320012 埼玉県川口市本町四丁目 1 番 8 号 Saitama (JP). 独

立行政法人産業技術総合研究所 (NATIONAL INSTITUTE OF ADVANCED INDUSTRIAL SCIENCE AND TECHNOLOGY) [JP/JP]; 〒1008921 東京都千代田区霞が関一丁目 3 番 1 号 Tokyo (JP).

(72) 発明者; および

(75) 発明者/出願人 (米国についてののみ): 小島 弘子 (KO-JIMA, Hiroko) [JP/JP]; 〒3050031 茨城県つくば市吾妻 3-18-3 ルミエール吾妻101 Ibaraki (JP). 植村 寿公 (UE-MURA, Toshimasa) [JP/JP]; 〒3058566 茨城県つくば市東1-1-1 中央第 6 独立行政法人産業技術総合研究所内 Ibaraki (JP).

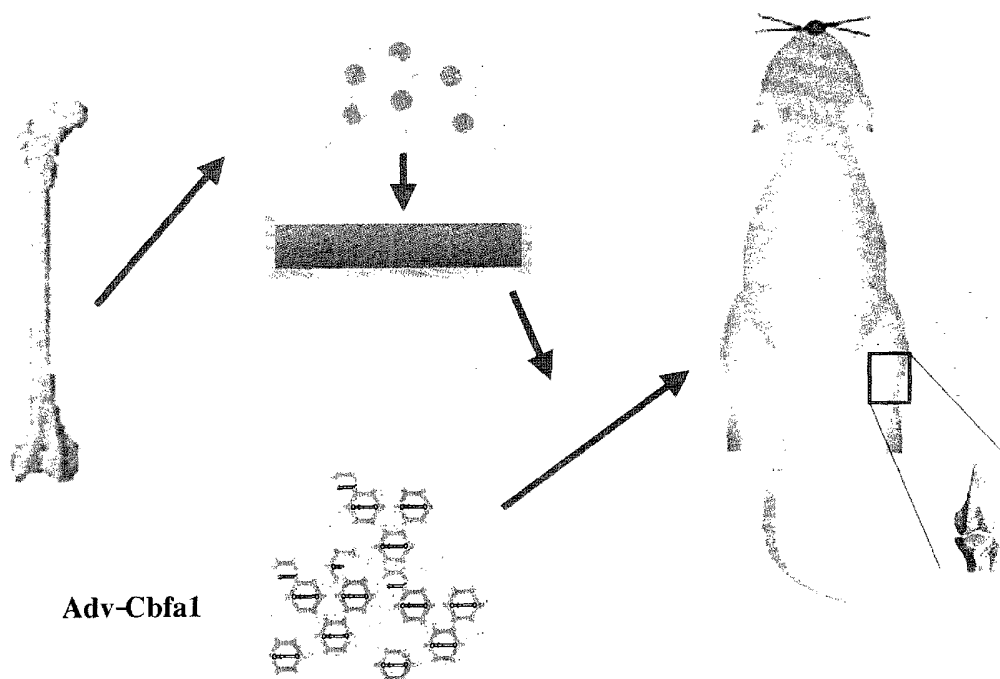
(74) 代理人: 平木 祐輔, 外 (HIRAKI, Yusuke et al.); 〒1050001 東京都港区虎ノ門 4 丁目 3 番 20 号 神谷町 MT ビル 19 階 Tokyo (JP).

(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, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR,

[続葉有]

(54) Title: IMPLANT FOR REGENERATING BONE OR CARTILAGE WITH THE USE OF TRANSCRIPTIONAL FACTOR

(54) 発明の名称: 転写因子を利用した骨・軟骨再生用インプラント



(57) Abstract: An implant whereby a virus vector having a transcriptional factor gene integrated therein is sustainedly released *in vivo* and the activity of the transcriptional factor is continuously expressed, thereby allowing favorable regeneration of a bone or a cartilage.

(57) 要約: 本発明は、転写因子の遺伝子を組み込んだウイルスベクターを生体内で徐放させ、転写因子活性を持続的に発現させることにより、良好な骨・軟骨再生を可能にするインプラントに関する。

WO 2005/035014 A1



BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NA, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL, 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

- (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,

2文字コード及び他の略語については、定期発行される各PCTガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語のガイダンスノート」を参照。

明 細 書

転写因子を利用した骨・軟骨再生用インプラント

5 技 術 分 野

本発明は、転写因子を利用したインプラントに関する。より詳しくは、転写因子の遺伝子を組み込んだウイルスベクターを生体内で徐放させ、転写因子活性を持続的に発現させることにより、良好な骨・軟骨再生を可能にするインプラントに関する。

10

背 景 技 術

骨は再生能力の限られた組織であり、その修復には自家骨の再移植や人工インプラントによる置換・補充が必要となる。しかし、自家骨の使用は患者の負担が大きく、その採取量にも限界がある。また、人工インプラントには、生体骨に匹敵するだけの強度や機械的特性、生体適合性が期待できないという問題がある。

15

これに対し、生体から取り出した自己の細胞を *in vitro* で培養・組織化して限りなく生体に近い組織を再構築し、これを再び生体内に戻すという再生医療の研究が進められている。この研究が実現すれば、それは損傷組織に対する最も理想的な治療方法となる。

20

再生医療においては、生体外で細胞をより早く目的の組織に増殖・分化させること、また移植組織を速やかに欠損部に融合・組織化させることが、重要な問題となる。これを解決する方法として、細胞の分化誘導をつかさどるサイトカイン(液性因子)を直接細胞に導入するいくつかの技術が知られている。たとえば、 $TGF-\beta 1$ を含浸させたコラーゲンスポンジ上で

25

骨髄細胞等を培養する技術（特開 2001-316285 号）、b F G F を含有するコ
ラーゲン-軟骨細胞複合体による軟骨組織再生治療材（特開平 8-3199 号）
等が公知である。しかし、増殖因子そのものを細胞に添加する方法では、
添加した増殖因子が速やかに拡散してしまうため、増殖因子活性の十分な
5 持続が望めないという問題がある。一方、リポフェクション法により増殖
因子の遺伝子を細胞に導入する方法も試みられているが、この方法は樹立
細胞株ではある程度の成功をおさめても、初代培養細胞に対しては殆ど 0
に近い導入効率しか得られていない。

最近、骨芽細胞の分化には転写因子、特に runt 型及び
10 Helix-Loop-Helix (HLH) 型の転写因子が重要な意味を持つことが、多くの研
究者により明らかにされてきた。例えば runt 型転写因子としては、
Pebp2alphaA (Pebp2 α A) /Cbfa1、HLH 型転写因子としては、Scleraxis、Id-1、
I-mfa 等が骨芽細胞分化に重要な意味を持つことが報告されている
(Komori, T. et al., (1997) Cell 89, p755-764; Acampora, D. et
15 al., (1999) Development 126, p3795-3809; Tribioli, C. et al., (1999)
Development 126, p5699-5711; Satokata, I. et al., (2000) Nature Genet.
24, p391-395; Cserjesi, P. et al., (1995) Development 121, p1099-1110;
Ng, L. J. et al., (1997) Dev. Biol. 183, p108-121)。

そして、発明者らは、この転写因子 (Cbfa1) 遺伝子を導入した骨芽細胞
20 を β -TCP 等の生分解性材料を足場として培養、組織化し (H. Kojima,
T. Uemura, (2002) Molecular Biology of the Cell, Vol.13 supplement,
p543a; Toshimasa Uemura, Hiroko Kojima, (2002) Tissue Engineering,
Vol. 8, No. 6, p1129)、生体に移植することで、良好な骨・軟骨組織再生が
可能になることを報告している（国際公開第 03/011343 号）。この方法は、
25 効率の良い骨・軟骨再生を可能にするという点においては非常に優れた技

術である。しかし、患者体内からの細胞の単離、生体外での組織構築、生体内への再移植という工程は、現実の臨床適用においては決して容易ではない。

5 発明の開示

本発明は、整形外科領域及び歯科領域における、より簡便かつ安全な骨・軟骨再生の手段を提供することを目的とする。

本発明者らは上記課題を解決するために鋭意検討し、 β -TCPやハイドロキシアパタイト等の生体適合性材料を用いて生体内で転写因子の遺伝子導入用ウイルスベクターを徐放させる方法を見出した。そして、この方法によれば、低濃度のウイルスベクターでも転写因子の遺伝子を導入した細胞を移植する方法と同等の骨・軟骨再生が可能になることを実証し、本発明を完成させた。

すなわち、本発明は骨・軟骨誘導性転写因子の遺伝子を導入したアデノウイルスベクター又はレトロウイルスベクターを含む生体適合性材料からなる骨・軟骨再生用インプラントに関する。

本発明のインプラントにおいて、骨・軟骨誘導性転写因子としては、例えば、Cbfa1、Dlx-5、Bapx1、Msx2、Scleraxis 及び Sox-9 から選ばれる1種又は2種以上を利用することができる。なかでも、Cbfa1が好ましい。

また、本発明のインプラントにおいて、生体適合性材料としては、例えば、ハイドロキシアパタイト、 α -TCP、 β -TCP、コラーゲン、ポリ乳酸、ヒアルロン酸、及びポリグリコール酸、ならびにこれらの2種以上で構成される複合体から選ばれるいずれかを利用することができる。なかでも、 β -TCPが好ましい。

本発明によれば、生体内で骨・軟骨再生を促す転写因子活性が長期的に

発現され、損傷を受けた骨・軟骨の良好な再生が可能になる。

以下、本発明について詳細に説明する。

本発明は、骨・軟骨誘導性転写因子の遺伝子を組み込んだウイルスベクターを含む生体適合性材料からなるインプラントに関する。該インプラントは、歯槽骨再生や大腿骨再生など、歯科領域及び整形外科領域における骨・軟骨再生に用いられる。

1. 転写因子

本発明に用いられる転写因子は、未分化の細胞を骨及び／又は軟骨に分化誘導する、骨・軟骨誘導性の転写因子であり、例えば Cbfa1、Dlx-5、Bapx1、Msx2、Scleraxis、Sox-9 が挙げられる。Cbfa1 は 1993 年京都大学の小川らによってクローニングされ、大阪大学の小守らにより間葉系幹細胞から骨芽細胞に分化誘導するのに必要不可欠であることが確認された転写因子である (Komori, T. et al., (1997) Cell 89, 755-764)。この Cbfa1 には 2 つのアイソフォーム、til-1 と pebp2 α A が存在する。Dlx-5 は、Drosophila distalless (Dll) 遺伝子の相同遺伝子で、軟骨骨膜や内膜の骨化に関わる転写因子である (Acampora, D. et al., (1999) Development 126, 3795-3809)。Bapx1 は、Drosophila bagpipe homeobox 遺伝子の相同遺伝子で、特に脊髄における間葉系幹細胞から軟骨細胞への分化に関わっており、Cbfa1 遺伝子の調節遺伝子の 1 つと考えられている (Tribioli, C. et al., (1999) Development 126, 5699-5711)。Msx2 は、Drosophila muscle segment homeobox (Msh) 遺伝子の相同遺伝子で頭蓋骨の骨化に関わっており、Cbfa1 遺伝子の調節遺伝子の 1 つと考えられている (Satokata, I. et al., (2000) Nature Genet. 24, 391-395)。Scleraxis は、間葉系幹細胞から軟骨細胞や結合組織への分化誘導に関わる転写因子である (Cserjesi, P. et al., (1995) Development 121, 1099-1110)。Sox-9 は、軟骨で発現してお

り、type II Collagen 等の軟骨分化に関わる遺伝子の発現調節をしている
(Ng, L. J. et al., (1997) Dev. Biol. 183, 108-121)。

本発明で用いられる転写因子の由来は特に限定されないが、移植の対象
となる哺乳動物に由来する転写因子を用いることが好ましい。したがって、
5 ヒトを対象とした骨・軟骨再生においては、ヒト由来の転写因子を用いる
ことが好ましく、マウスを対象とした骨・軟骨再生においては、マウス由
来の転写因子を用いることが好ましい。

本明細書中において、前記 Cbfa1、Dlx-5、Bapx1、Msx2、Scleraxis、Sox-9
等の骨・軟骨誘導性転写因子には、そのすべてのオーソログを含むものと
10 する。ここで「オーソログ (Ortholog)」とはオーソログ遺伝子
(orthologous gene) のことであり、進化的に同じ起源をもち構造と機能が
類似した異なる種の遺伝子を意味する。これらの遺伝子の塩基配列は既
に公知であり、GenBank 等の公共データベースよりその情報を入手するこ
とができる。例えば、マウス骨芽細胞由来 Cbfa1 遺伝子の塩基配列は、
15 Accession No. AF010284、AF005936 等として GenBank に登録されている。
また、ヒト Cbfa1 の塩基配列は、Accession No. AH005498、NM004348、L40992
等として、GenBank に登録されている。その他、ヒト Dlx-5 は Accession No.
AK023493 として、ヒト Bapx1 は Accession No. NM_001189 として、ヒト Msx2
は Accession No. D31771 として、ヒト Scleraxis は Accession No. BK000280
20 として、ヒト Sox-9 は Accession No. Z46629 として、それぞれ GenBank
に登録されている。

本発明で用いられる骨・軟骨誘導性転写因子の遺伝子は、上記配列情報
を利用して常法により調製することができる。すなわち、骨芽細胞から全
RNA 又は mRNA を抽出し、公知の配列を基に作製したプライマーを用
25 いて、PCR 法により目的とする転写因子の cDNA を増幅する。

2. ウイルスベクターの作製

前記アデノウイルス又はレトロウイルスベクターは、周知の方法に基づいて調製することができる。例えばアデノウイルスベクターは、Miyakeらの方法 (Miyake, S. et al, Proc. Natl. Acad. Sci. 93:1320-1324, (1993)) に基づいて調製することができる。ベクターはまた、市販のキット、例えば Adenovirus Cre/loxP Kit (宝酒造社製) 等を用いて作製してもよい。このキットは、P1 ファージの Cre リコンビナーゼとその認識配列である loxP を用いた発現制御系 (Kanegae Y. et. al., 1995 Nucl. Acids Res. 23, 3816) による組換えアデノウイルスベクター作製用キットで、目的の転写因子遺伝子を組み込んだ組換えアデノウイルスベクターを簡便に作製することができる。なお、アデノウイルス感染の moi (multiplicity of infection) は、10 以上、好ましくは 50~200、より好ましくは 100 前後 (80~120 程度) である。

3. 生体適合性材料

本発明で用いられる生体適合性材料とは、生体内に適用可能な材料であれば特に限定されず、例えば、ハイドロキシアパタイト、 α -TCP、 β -TCP、コラーゲン、ポリ乳酸、ヒアルロン酸、及びポリグリコール酸等を挙げることができる。これらの材料は1種類であってもよいし、あるいは2種以上を組み合わせた複合体であってもよい。

前記生体適合性材料は、ウイルスベクターの吸着が可能なように、有効吸着表面積が大きい多孔性 (または微粒子の集合体) であることが望ましい。なお、本明細書中において「多孔 (性)」とは、気孔率が少なくとも 30 % 以上であることを意味するものとする。本発明の生体適合性材料において気孔の大きさは特に限定されないが、直径 50 μ m ~ 500 μ m 程度であることが好ましい。一方、骨のような硬組織用インプラントでは、初

期強度も重要となる。セラミックス多孔体ではハイドロキシアパタイトや β -TCPは強度が高く、本発明の生体適合性材料として好ましい。さらに、生体適合性材料は骨再生後に生体内で分解吸収されることがより好ましい。

5 β -TCPはある程度の強度を有する生分解性セラミックス多孔体という点で、本発明にかかる生体適合性材料として特に好ましい。多孔性 β -TCPの圧縮強度は3 MPa程度で、生体骨（海綿骨で7 MPa程度）よりは弱いものの、臨床使用には十分な強度といえる。さらに、 β -TCPは生体内で徐々に分解してカルシウムイオンとリン酸イオンを放
10 出し、骨芽細胞によるハイドロキシアパタイト合成が容易な環境を実現する。すなわち、 β -TCPから放出されたカルシウムイオンとリン酸イオンを利用して、周囲の骨芽細胞によるハイドロキシアパタイト合成が可能になる。合成されたハイドロキシアパタイトは骨の構成成分として、やがて硬い骨へと置換していく。実際、本発明のように転写因子の遺伝子を導
15 入したウイルスベクターを吸着させ、周囲が骨をつくるのに適した環境であれば、 β -TCPの分解部位にハイドロキシアパタイトを主成分とした新生骨が容易に構成される。つまり、 β -TCPはウィルスデリバリーの担体や骨形成の足場としてだけでなく、それ自体が骨新生を積極的に促進させる機能を有する。

20 4. 生体適合性材料へのベクターの組み込み

生体適合性材料へのベクターの組み込み方法は特に限定されないが、できる限り均一に組み込まれることが好ましい。ベクターは前記生体適合性材料に化学的に結合されていてもよいし、単に物理的に吸着されているだけでもよい。例えば、 β -TCPの場合であれば、ベクターを含む溶液（培
25 地）に浸漬させることにより、 β -TCP中にベクターを均一に吸着させ

ることができる。必要であれば、ベクターを含む溶液が生体適合性材料内に十分いきわたるよう、適宜減圧してもよい。例えば、 $1 \times 10^8 \sim 10^9$ pfu/ml の濃度のウイルスベクター液を血清の含有されていない適当な溶媒（例えば、生理食塩水等）又は培地で希釈し、そこに生体適合性材料からなるブロックを浸漬する。100～150 mmHg に減圧してブロック内を脱気し、ブロック内にウイルスベクター液を十分浸透させる。

ベクターを吸着させた生体適合性材料は、好ましくは数時間以内に生体内に移植する。本発明の生体適合性材料は、生体内に埋入あるいは注入されると、骨再生に必要とされる期間にわたり、徐々に転写因子の遺伝子を導入したウイルスベクターを放出する。かくして、良好な骨再生が可能となる。

5. その他

本発明のインプラントの形態及び形状は、特に限定されず、スポンジ、メッシュ、不織布状成形物、ディスク状、フィルム状、棒状、粒子状、及びペースト状等、任意の形態及び形状を用いることができる。また、本発明のインプラントは他の材料と混合して用いても良い。例えば、ウイルスを吸着させた β -TCP の顆粒をハイドロキシアパタイトの顆粒と混合して骨補填剤として使用することができる。こうした形態や形状は、インプラントの目的に応じて適宜選択すればよい。

本発明のインプラントは、その目的と効果を損なわない範囲において、骨・軟骨組織及び足場材料のほか、適宜他の成分を含んでもよい。そのような成分としては、例えば、塩基性線維芽細胞増殖因子 (bFGF)、血小板分化増殖因子 (PDGF)、インスリン、インスリン様増殖因子 (IGF)、肝細胞増殖因子 (HGF)、グリア誘導神経栄養因子 (GDNF)、神経栄養因子 (NF)、ホルモン、サイトカイン、骨形成因子 (BMP)、トランスフォーミング増殖

因子 (TGF)、血管内皮細胞増殖因子 (VEGF) 等の増殖因子、骨形成タンパク質、St、Mg、Ca 及び CO_3 等の無機塩、クエン酸及びリン脂質等の有機物、薬剤等を挙げることができる。

本発明のインプラントは、骨親和性が高く、生体適用後すみやかに生体
5 骨と一体化し、骨欠損部の再生を可能にする。

図面の簡単な説明

図 1 は、ラット背上皮皮下移植実験の方法を示した模式図である。

図 2 は、ラット背上皮皮下移植実験におけるヘマトキシリン/エオジン染
10 色像（移植後 3 週目、背上皮皮下）を示す写真である。

図 3 は、ラット大腿骨欠損部位移植実験の方法を示す模式図である。

図 4 は、ラット大腿骨欠損部位移植実験におけるヘマトキシリン-エオ
ジン染色像（移植後 2 週目、 β -TCP ブロック）を示す写真である。

図 5 は、ラット大腿骨欠損部位移植実験におけるヘマトキシリン-エオ
15 ジン染色像（移植後 6 週目、 β -TCP ブロック）を示す写真である。

図 6 は、ラット大腿骨欠損部位移植実験におけるヘマトキシリン-エオ
ジン染色像（移植後 3 週目、HA ブロック）を示す写真である。

図 7 は、ラット大腿骨欠損部位移植後の β -TCP ブロックと HA ブロック
のヘマトキシリン-エオジン染色像（移植後 3 週目）を示す写真である。

図 8 は、ラット大腿骨欠損部位移植後のウィルス吸着ブロックとウィル
20 ス感染細胞吸着ブロックのヘマトキシリン-エオジン染色像（移植後 8 週
目、 β -TCP ブロック）を示す写真である。

図 9 は、ラット背上皮皮下移植実験におけるヘマトキシリン-エオジン
染色像（移植後 20 日および 8 週目、OPLA コンポジット）を示す写真であ
25 る。

図10は、ラット背上皮皮下移植実験におけるオステオカルシン免疫染色像（移植後20日目、OPLAコンボジット）を示す写真である。

図11は、ラット大腿骨欠損部位移植実験におけるヘマトキシリン－エオジン染色像（移植後10日および20日目、OPLAコンボジット）を示す写真である。

図12は、ラット大腿骨欠損部位移植実験におけるヘマトキシリン－エオジン染色像（移植後3週目、OPLAコンボジット）を示す写真である。

本明細書は、本願の優先権の基礎である特願2003-355505号の明細書に記載された内容を包含する。

発明を実施するための最良の形態

実施例1：生体適合性材料を担体としたウイルスベクターの徐放研究 (1)
 β -TCP ブロックおよびHA ブロック

15 1. アデノウイルスベクターの作製

マウスの骨芽細胞から単離した Total RNA から AMV reverse transcriptase を用いて cDNA を合成し、これを鋳型として Cbfa1 の cDNA (GenBank Accession No. AF010284：配列番号1) に特異的なプライマーを用いて PCR により cbfa1 cDNA を増幅して得た。

20 sense primer 5'-ATGCTTCATTCGCCTCACAAAC-3' (配列番号2)

antisense primer 5'-TCTGTTTGGCGGCCATATTGA-3' (配列番号3)

Cbfa1 cDNA は TA cloning vector (Invitrogen, pCR II-TOPO) にクローニングして大量調製した。Cbfa1 cDNA を制限酵素の Spe I と EcoR V で切り出し、平滑末端化した後、Adenovirus Cre/loxP kit (宝酒造, 6151) を用いてコスミドベクター pAxCALNLw の Swa I サイトに挿入し、Kit の説明書

に従って組換えアデノウイルスを作製した。作製したウイルスの力価は、約 10^{11} PFU/ml の値を示し、感染効率は非常に高いことが確認された。

2. 骨芽細胞の採取及び培養方法

Rat Bone Marrow Osteoblast (RBM0) は、6 週齢の Fisher ラット (雄) の大腿骨より Maniatopoulos らの方法 (Maniatopoulos, C., Sodek, J., and Melcher, A. H. (1988) *Cell Tissue Res.* 254, 317-330) に従って採取した。細胞は、15% FBS (Sigma, F-9423)、Antibiotic-Antimycotic (GIBCO BRL, 15240-062) 添加 MEM 培地 (nacalai tesque, 214-42) で約 1 週間培養した。その後 2 日間 10 nM Dexamethasone、10mM β -glycerophosphate、5 μ g/ml vitamin C phosphate を添加した上記の培地で培養した。

3. ラット生体内移植実験

3. 1 ラット背上皮皮下移植実験

Cbfa1 と Cre リコンビナーゼ遺伝子の組換えアデノウイルス混合液 (1×10^9 pfu/ml) に β -TCP ブロック (Olympus, 2 mm $\times$ 2 mm $\times$ 2 mm) を 3 時間浸漬した。RBM0 をトリプシン処理して剥がした後、細胞濃度を 100 万個/ml に調整して減圧下 (100mHg) でブロックに吸着した。ラットの背上皮皮下にウイルス吸着ブロックあるいは未処理のブロックを移植した。3 週間後に摘出したブロックをヘマトキシリン/エオジン染色して観察した。図 1 にラット背上皮皮下移植実験の概要を示す。

3. 2 ラット大腿骨欠損部位移植実験

1) Cbfa1 と Cre リコンビナーゼ遺伝子の組換えアデノウイルス混合液 (1×10^9 pfu/ml) に β -TCP ブロック (Olympus, 2 mm $\times$ 2 mm $\times$ 2 mm)、あるいはハイドロキシアパタイト (HA) ブロック (インターポア、2 mm $\times$ 2 mm $\times$ 2 mm) を 3 時間浸漬した。ラットの大腿骨にドリルで 2.5 mm 立方の穴を開けて欠損部位を作製し、そこにブロックを移植した。数週間後に摘出したウ

ウイルス吸着ブロックあるいは未処理のブロックをヘマトキシリン／エオジン染色して観察した。

2) Cbfa1 と Cre リコンビナーゼ遺伝子の組換えアデノウイルス混合液 (1×10^9 pfu/ml) に β -TCP ブロック (Olympus, 2 mm $\times$ 2 mm $\times$ 2 mm)、あるいは
5 はハイドロキシアパタイト (HA) ブロック (インターポア, 2 mm $\times$ 2 mm $\times$ 2 mm) を 3 時間浸漬した。RBM0 をトリプシン処理して剥がした後、細胞濃度を 100 万個/ml に調整して減圧下 (100mHg) でブロックに吸着した。ラットの大腿骨にドリルで 2.5 mm 立方の穴を開けて欠損部位を作製し、そこに
10 ウイルス吸着ブロックあるいは未処理のブロックを移植した。数週間後に摘出したブロックをヘマトキシリン／エオジン染色して観察した。図 3 にラット大腿骨欠損部位移植実験の概要を示す。

4. 組織切片作製、染色法

摘出したブロックを 4% paraformaldehyde, 0.05% glutaraldehyde でマイクロウェーブ固定し、翌日 10% EDTA, 100 mM Tris (pH7.4) 中で約 1 週間脱灰した。脱灰後、エタノールで脱水し、パラフィンに包埋した。5 μ m
15 の厚さの切片を作製し、脱パラフィン後、ヘマトキシリン続いてエオジンで染色した。

結果：

1. ラット背上皮皮下移植実験結果

20 図 2 に、背上皮皮下移植 3 週間後のヘマトキシリン／エオジン染色結果を示す。ウイルス吸着ブロックの方はブロックの中心部分で (図 2 右上、右下) 骨が再生されている様子が観察できた。一方未処理のブロックの方では骨芽細胞様細胞は観察されるが骨化は進行していなかった (図 2 左下)。

2. ラット大腿骨欠損部位移植実験結果

25 1) β -TCP ブロック (移植後 2 週間)

図 4 に、 β -TCP ブロック大腿骨欠損部位移植 2 週間後のヘマトキシリン/エオジン染色結果を示す。Cbfa1 遺伝子組み換えウイルス吸着ブロックの方が、ブロックのポアの溶解が進行しており、ポアの周囲の骨化も進行していることが観察された（図 4 左下、右下）。骨芽細胞を添加した方は添加
5 していないものに比べて、若干ブロックの溶解及び骨化が進んでいるように見えた（図 4 右下）。Cbfa1 遺伝子組み換えウイルスを吸着することで、骨再生を迅速に誘導できることが確認された。

2) β -TCP ブロック（移植後 6 週間）

図 5 に、 β -TCP ブロック大腿骨欠損部位移植 6 週間後のヘマトキシリン
10 /エオジン染色結果を示す。Cbfa1 遺伝子組み換えウイルス吸着ブロックの方がブロックの溶解が進行しており、また骨化の進行も顕著であった。特に皮質骨部位における迅速な骨再生と、骨髓腔における速やかなブロックの消失が観察された（図 5 左下、右下）。骨芽細胞を添加した方が、骨・骨髓再生の進行状況から判断して、Cbfa1 遺伝子の導入効果が若干強く現れ
15 ることが観察できた（図 5 右下）。

3) HA ブロック（移植後 3 週間）

図 6 に、HA ブロック大腿骨欠損部位移植 6 週間後のヘマトキシリン/エオジン染色結果を示す。 β -TCP ブロックに比べて本実験で用いた HA ブロックは、ポアサイズも気孔率も非常に高く、ウイルスの吸着する表面積が
20 小さくなるため、ウイルス吸着の影響が顕著ではない。また HA は生分解性材料ではないため、欠損が修復された後も体内に残存し続けると考えられた。

4) β -TCP ブロックと HA ブロックの比較（移植後 3 週間）

図 7 に、移植後 3 週間で摘出した HA ブロックと β -TCP ブロックの骨再生の様子を比較した結果を示す。HA ブロックに比べて生分解性のセラミッ
25

クス材料である多孔性 β -TCP ブロックの方が、骨・骨髄再生を促進させることがわかった。効果は特に皮質骨部分で顕著に認められる。 β -TCP ブロックの場合、移植後ウイルスが生体内で徐々に拡散されるため、ブロック周囲に存在する骨髄にも影響を与えて骨再生を促すものと考えられた。

5 5) ウィルス吸着ブロックとウィルス感染細胞吸着ブロックの比較（移植後8週間、 β -TCP ブロック）

図8に、移植後8週間で摘出したウィルス吸着ブロックとウィルス感染細胞吸着ブロックの骨再生の様子を比較した結果を示す。ウィルス感染細胞吸着ブロックに比べてウィルス吸着ブロックは、骨髄腔のブロックの溶解、骨髄への置換は若干劣るが、皮質骨部分の骨化の進行は同等、及びそれ以上に早いことが観察された。

考察：

生体適合性材料である多孔性 β -TCP 及びハイドロキシアパタイト (HA) に Cbfa1 の c DNA を組み込んだウイルスベクターを吸着させ、生体内に移植して Cbfa1 遺伝子組み換えウイルスを徐放させることにより、骨・骨髄再生が促進できることが確認された。また、骨・骨髄再生の進行状況から判断して、Cbfa1 遺伝子導入用ウイルスベクターを吸着させた β -TCP ブロックは、Cbfa1 遺伝子を導入した骨芽細胞を吸着させた β -TCP ブロックと同等の骨再生効果を有すると考えられた。

20 HA ブロックは β -TCP ブロックに比べてポアサイズも気孔率も非常に高く、結果的にウイルスが吸着する表面積が小さいと考えられる。そのためウイルス吸着の影響が β -TCP ブロックほど顕著には確認できなかった。しかしながら、HA ブロックの染色像で皮質骨の部分に着目すると、ウイルス吸着担体の方がより良好に骨再生が促進されていることがわかる。 β -TCP
25 とは異なり、HA は生分解性材料ではないため、欠損が修復された後も体内

に残存し続けるという問題はあるものの、本発明のインプラント材料として使用しうることが確認された。

ラットのようなげっ歯類は一般にアデノウイルスに感染しにくいと、ヒトの十倍以上の濃度を使用する必要があるといわれている。例えば、直接体内へ導入する場合、 10^8 から 10^{10} pfu のウイルスを注射するという
5 (Okubo et al., Life Science (2001) vol 70 (3): 325-36, Trudel et al., *Cancer Gene Therapy* (2003), vol 10 (10): 755-763, Hedman et al., *Circulation* (2003), vol 107 (21): 2677-2683)。本実施例では、 10^9 pfu/ml のウイルス液 1 ml に 2 mm 立方のブロックを 10~20 個程度浸漬している
10 ため、体内に導入されるウイルス量は 10^9 pfu よりさらに少ない。また、本発明の方法では、注射等による直接導入と異なり、ウイルスはブロックに吸着されているため、生体内移植後に血流に乗って拡散する可能性も低い。すなわち、本試験により、本発明の方法はより低濃度で効果的な骨軟骨再生を可能にすることが確認された。

15

実施例 2：生体適合性材料を担体としたウイルスベクターの徐放研究 (2)
OPLA コンボジット

1. アデノウイルスベクターの作製

マウスの骨芽細胞から単離した Total RNA から AMV reverse
20 transcriptase を用いて cDNA を合成し、これを鋳型として Cbfa1 の cDNA に特異的なプライマー sense primer 5' -ATGCTTCATTCGCCTCACAAAC-3' (配列番号 2) と antisense primer 5' -TCTGTTTGGCGGCCATATTGA-3' (配列番号 3) を用いて PCR により cbfa1 cDNA (GenBank Accession Number AF010284) を増幅し、シーケンスにより配列を確認した。Cbfa1 cDNA は TA cloning
25 vector (pCR II-TOPO, provided by invitrogen) にクローニングして大量

調製した。Cbfa1 cDNA を制限酵素 Spe I および EcoR V で切り出し、平滑末端化した。

マウス VEGF の cDNA (GenBank Accession Number NM_009505) は、東京工業大学 渡辺氏より供与を受けた。VEGF cDNA を大量調製し、制限酵素の
5 EcoRI で切り出した後、平滑末端化した。Cbfa1 cDNA あるいは VEGF cDNA は Adenovirus Cre/loxP kit (宝酒造, #6151) を用いてコスミドベクター pAxCALNLw の Sma I サイトに挿入し、Kit の説明書に従って組換えアデノウイルス (Adv-Cbfa1) を作製した。作製したウイルスの力価は、それぞれ約 10^{11} PFU/ml、約 2.5×10^9 PFU/ml と、非常に高い感染効率であった。これら
10 のウイルスは E1 領域欠失のため、標的細胞内では増殖することはできず、一過性の性質をもつ。また、目的遺伝子上流にスタッパーをもつため、Cre リコンビナーゼ発現ウイルスと共感染のときのみ遺伝子を発現する。Cre リコンビナーゼ発現アデノウイルス (Adv-cre) はキットに付属されていたものを用いた。

15 2. ラット生体内移植実験

担体として BD 3D OPLA コンポジット (BD Falcon, #354614, $5\text{mm} \times 3\text{mm} \times 0.039\text{cm}^2$) を用い、生体内移植実験を行った。BD 3D OPLA (Open-Cell Poly-lactic Acid) コンポジットは、D、D-L、L ポリ乳酸から合成された合成ポリマーコンポジットで、高密度懸濁細胞の培養に効率的な多面体構造
20 を有している。

2. 1 ラット背上皮皮下移植実験

OPLA コンポジットは、Adv-Cbfa1 と Adv-cre の組換えアデノウイルス混合液 (1×10^9 pfu/ml) に減圧下で脱気しながら 2 分間浸漬し、その後 3 時間以上静置した。ウイルス液を吸着させた OPLA コンポジットはラットの背
25 上皮皮下に移植した。ウイルス吸着 OPLA コンポジットあるいは未処理の

OPLA コンボジットは数週間後に摘出して解析した。

2. 2 ラット大腿骨欠損部位移植実験

骨補填材料として上記 BD 3D OPLA コンボジット (BD Falcon, #354614、
5mm×3mm×0.039cm²) を用いた。滅菌下で四等分した OPLA コンボジットを
5 Cbfa1 (Adv-Cbfa1) あるいは VEGF (Adv-VEGF) と Cre リコンビナーゼ遺伝
子 (Adv-cre) の組換えアデノウィルス混合液 (1×10⁹ pfu/ml) に減圧下
で脱気しながら 2 分間浸漬し、その後 3 時間以上静置した。ラットの大腿
骨に直径 2.5mm、深さ 2mm の穴をドリルで開けて欠損部位を作製し、ウィ
ルス液を吸着させた OPLA コンボジットをそこに移植した。ウィルス吸着
10 OPLA コンボジットあるいは未処理の OPLA コンボジットは数週間後に摘出
して解析した。

3. 組織切片作製、染色法

摘出したコンボジットを 4% paraformaldehyde, 0.05% glutaraldehyde
でマイクロウェーブ固定した後、翌日 10% EDTA, 100 mM Tris (pH7.4) 中
15 で約 1 週間脱灰した。脱灰後、エタノールで脱水し、レモゾールで透徹し、
パラフィンに包埋した。5μm の厚さで切片を作製し、脱パラフィン後、ヘ
マトキシリン続いてエオジンで染色した。サンプルは光学顕微鏡 (IX-70,
Olympus, Tokyo, Japan) で観察し、CCD カメラ (CoolSNAP cf, ROPER
Scientific) により取り込んだデジタルイメージは MetaMorph software で
20 解析した。

免疫染色については、5μm の厚さで切片を作製し、脱パラフィン後、
Proteinase K solution (DakoCytomation, Inc., Glostrup, Denmark) で 5
分間処理し、続いて Peroxidase Blocking Reagent (DakoCytomation) で処
理した。切片を Blocking reagent (Roche, Basel, Switzerland) で非特異
25 的蛋白質の吸着をブロッキングし、一次抗体の mouse monoclonal

anti-osteocalcin antibody (Zymed Laboratories Inc., San Francisco, CA) と一晚、4℃でインキュベートした。二次抗体の Horseradish peroxidase conjugated secondary antibody (Amersham Bioscience, Piscataway, NJ) を加えて一時間インキュベートし、DAKO Liquid DAB substrate-chromogen (DakoCytomation) を用いて発色させた。その後、ヘマトキシリンで核染色した。サンプルは光学顕微鏡 (IX-70, Olympus, Tokyo, Japan) で観察し、CCD カメラ (CoolSNAP cf, ROPER Scientific) により取り込んだデジタルイメージは MetaMorph software で解析した。

結果：

10 1. ラット背上皮皮下移植実験結果

図 9 に、ヘマトキシリン-エオジン染色像の観察結果（移植後 20 日および 8 週目）を示す。Adv-Cbfa1 ウィルス吸着コンポジットの方は骨が再生されている様子が観察できる（写真右側、矢印）。一方コントロールのコンポジットの方は、皮下の脂肪等の細胞が浸潤してきている様子は観察されるが骨化は進行していない（写真左側、*印）。

図 10 に、オステオカルシン免疫染色像の観察結果（移植後 20 日目）を示す。オステオカルシンはポアの表面に接着している細胞で強く発現しており、石灰化が生じている部位でも観察された。オステオカルシンの局在は石灰化が生じており、骨が再生されていることを示している（写真、矢印）。

20 2. ラット大腿骨欠損部位移植実験結果

図 11 に、ヘマトキシリン-エオジン染色像の観察結果（移植後 10 日および 20 日目）を示す。Adv-Cbfa1 ウィルス吸着コンポジットの方が、皮質骨の部分の骨再生が進行しており、皮質骨の欠損部位の大きさが小さくなってきている様子が観察された（写真上段）。また移植後 20 日目のサンプ

ルでは、移植したコンポジットの溶解および順調な骨再生が観察され、さらに移植したコンポジットと皮質骨の融合が観察できた(写真下段、右側)。一方、ウィルスを吸着していないコンポジット(コントロール)では、移植後 10 日目では骨再生がほとんど観察されず、20 日目でもコンポジットと皮質骨との融合も顕著ではない。これらの結果は、Adv-Cbfa1 ウィルス吸着コンポジットでは、移植期間中に生体内で Adv-Cbfa1 が徐々に溶け出して周囲の細胞に働きかけ、活性化することにより迅速な骨再生を誘導できることを示唆する。

図 1 2 に、ヘマトキシリン-エオジン染色像の観察結果(移植後 3 週目)を示す。Adv-Cbfa1 ウィルスおよび Adv-VEGF ウィルス吸着コンポジットでは、移植したコンポジットの溶解が顕著であり、コンポジット内部の骨再生が進行している様子が観察された(写真下段)。特に、皮質骨部位における迅速な骨再生、および移植したコンポジットと皮質骨の融合が観察された(写真下段)。

以上より、本発明の方法は OPLA コンポジットを徐放性担体として用いた場合にも、効果的な骨軟骨再生を可能にすることが確認された。

本明細書中で引用した全ての刊行物、特許及び特許出願をそのまま参考として本明細書中にとり入れるものとする。

産業上の利用の可能性

本発明によれば、より安全かつ簡便な骨・軟骨再生が可能となる。本発明のインプラントは、歯科領域あるいは整形外科領域における安全かつ簡便な骨・軟骨再生手段として利用できる。

配列表フリーテキスト

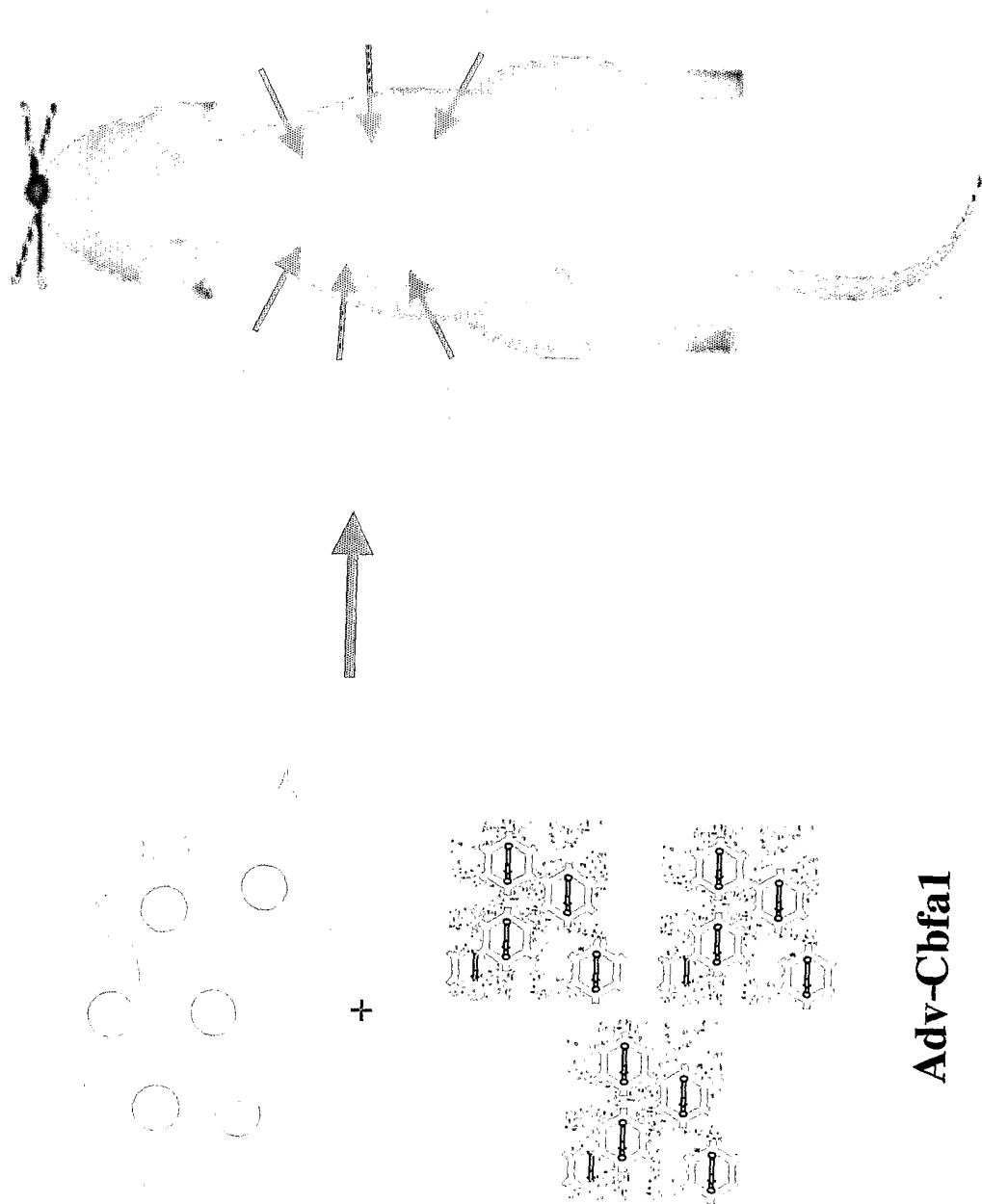
配列番号 2－人工配列の説明：Cbfa1 増幅用センスプライマー

配列番号 3－人工配列の説明：Cbfa1 増幅用アンチセンスプライマー

請 求 の 範 囲

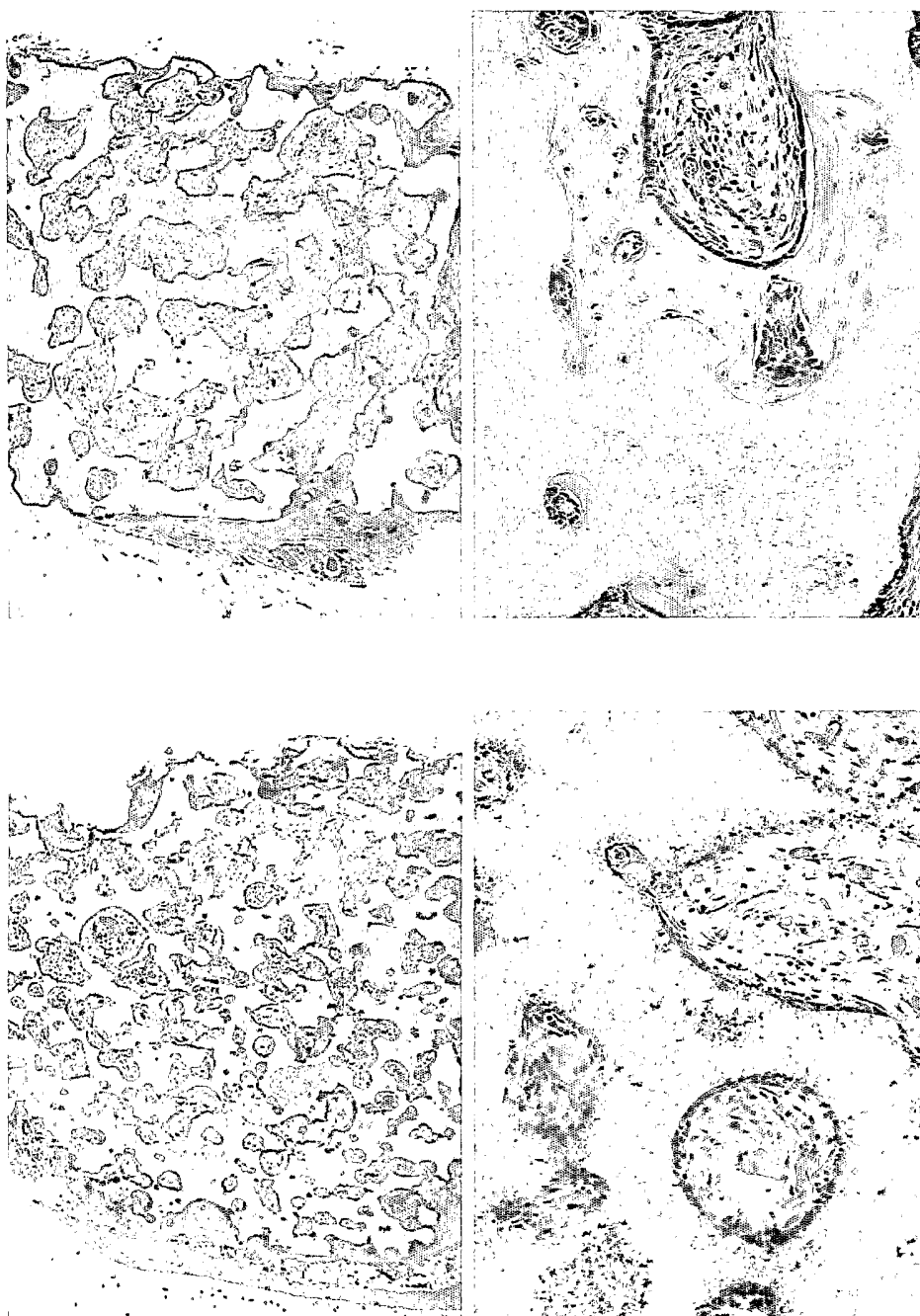
1. 骨・軟骨誘導性転写因子の遺伝子を導入したアデノウイルスベクター又はレトロウイルスベクターを含む生体適合性材料からなるインプラント。
5
2. 骨・軟骨誘導性転写因子が、Cbfa1、Dlx-5、Bapx1、Msx2、Scleraxis 及び Sox-9 からなる群より選ばれる 1 種又は 2 種以上である、請求項 1 に記載のインプラント。
3. 骨・軟骨誘導性転写因子が Cbfa1 である、請求項 1 に記載のインプラント。
10
4. 生体適合性材料が、ハイドロキシアパタイト、 α -TCP、 β -TCP、コラーゲン、ポリ乳酸、ヒアルロン酸、及びポリグリコール酸、ならびにこれらの 2 種以上で構成される複合体からなる群より選ばれるいずれかである、請求項 1～3 項のいずれか 1 項に記載のインプラント。
- 15 5. 生体適合性材料が β -TCP である、請求項 4 に記載のインプラント。

図 1



Adv-Cbfa1

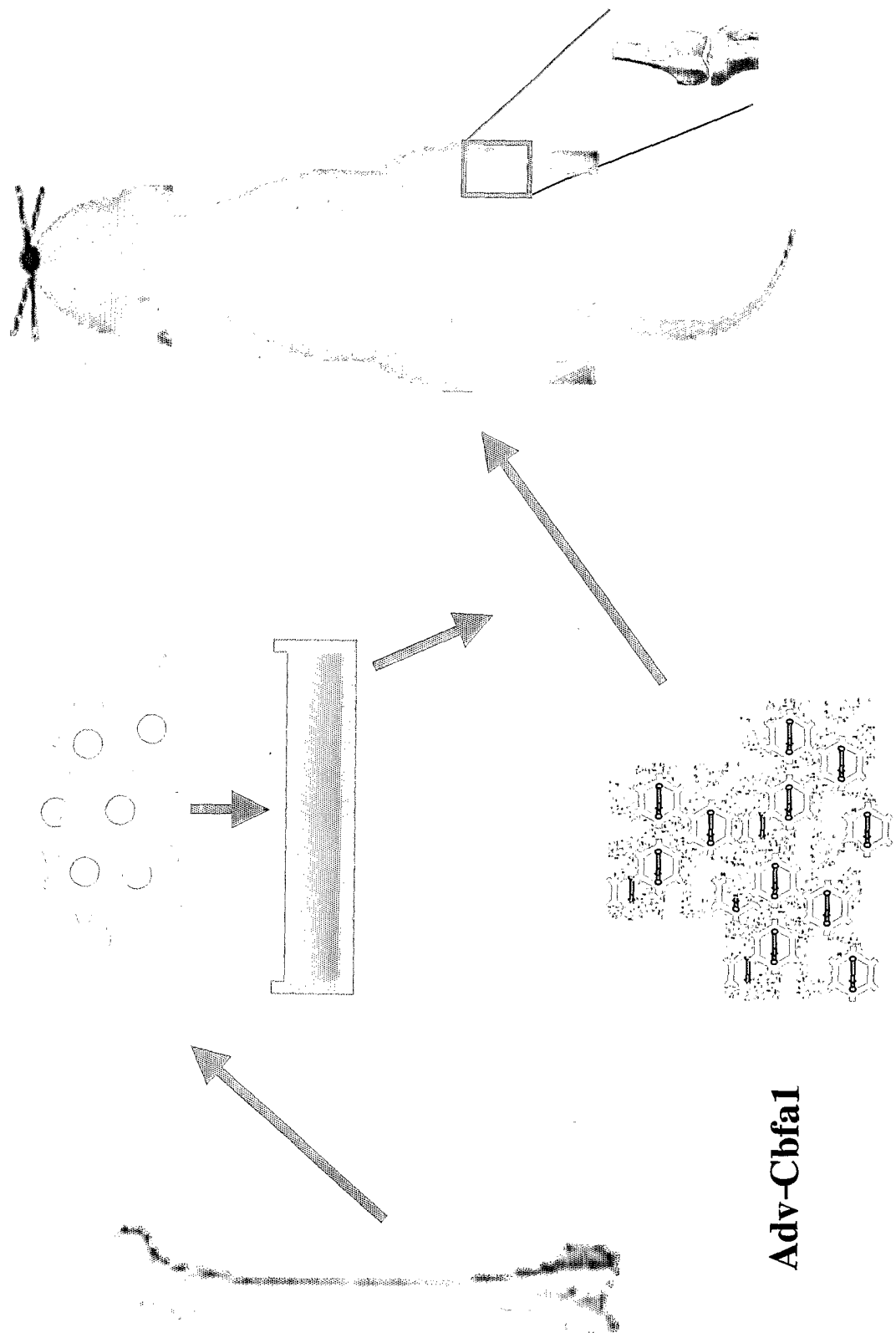
図 2



Adv-Cbfa1

Control

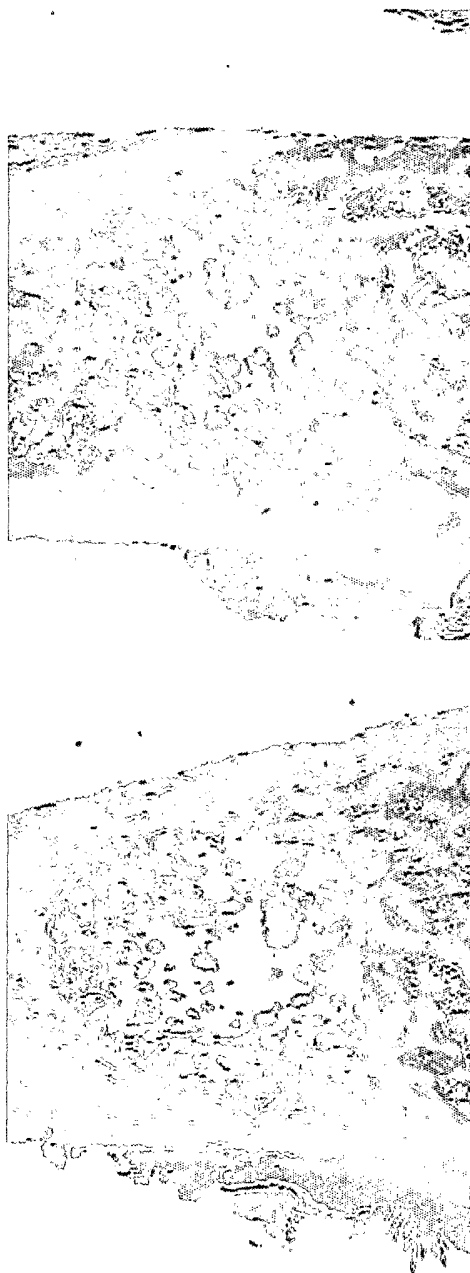
3
X



Adv-Cbfa1

図 4

Control



Adv-Cbfa1



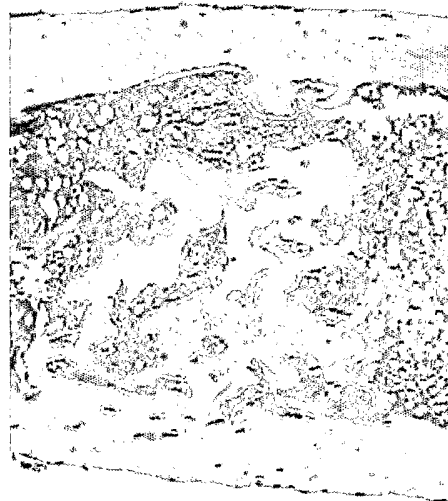
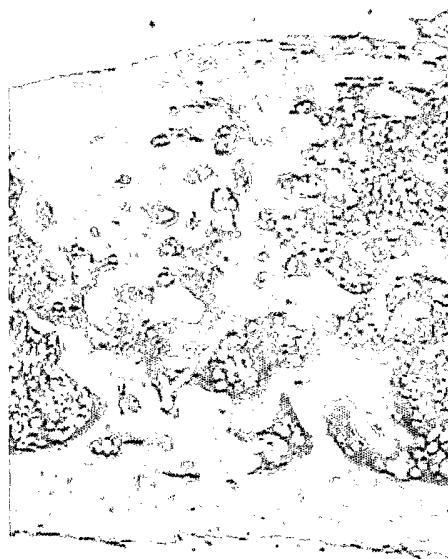
With RBMO

Without RBMO

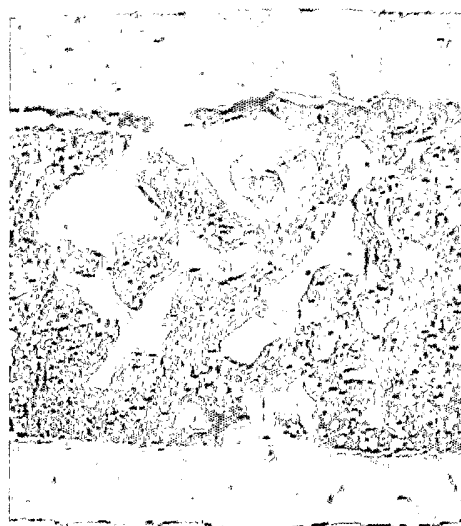
図 5

Control

Adv-Cbfa



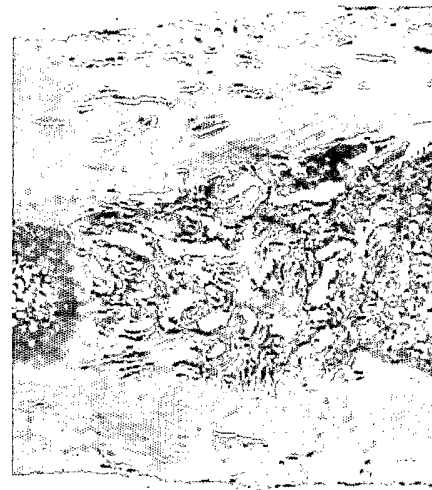
With RBMO



Without RBMO

図 6

Control



With RBMO

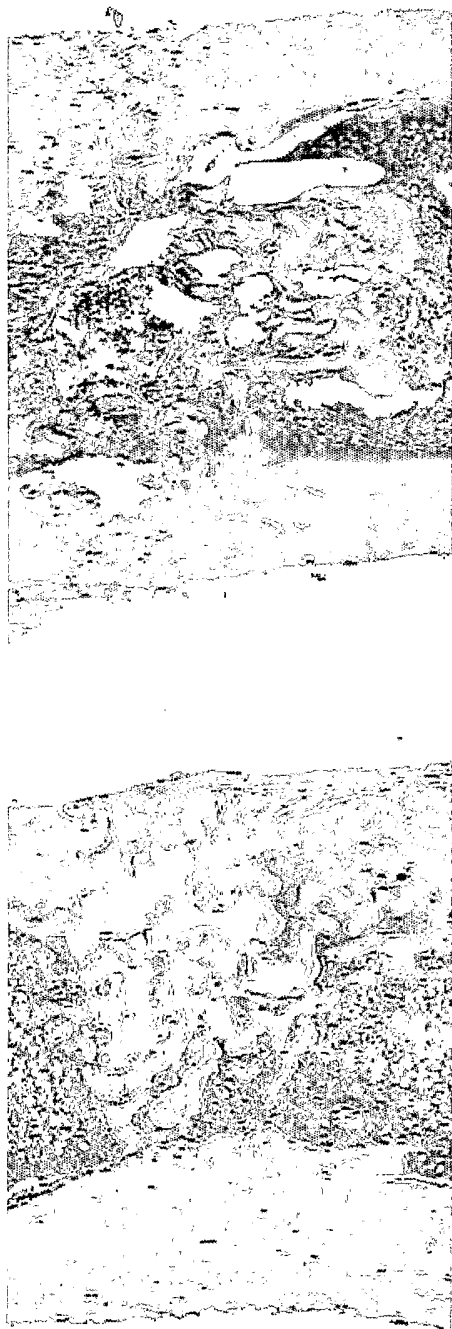


Without RBMO

Adv-Cbfa1

7

Control



Adv-Cbfa



β -TCP block

HA block



8

A

Control



Adv-Cbfa1



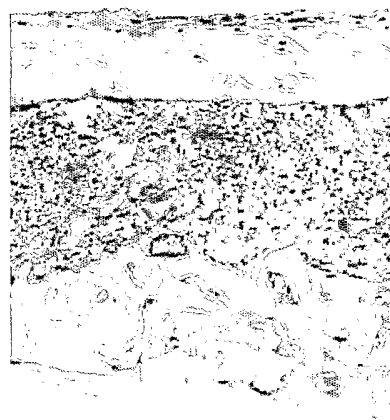
Without RBMO

B

Control



Adv-Cbfa1



With RBMO

9



図 10

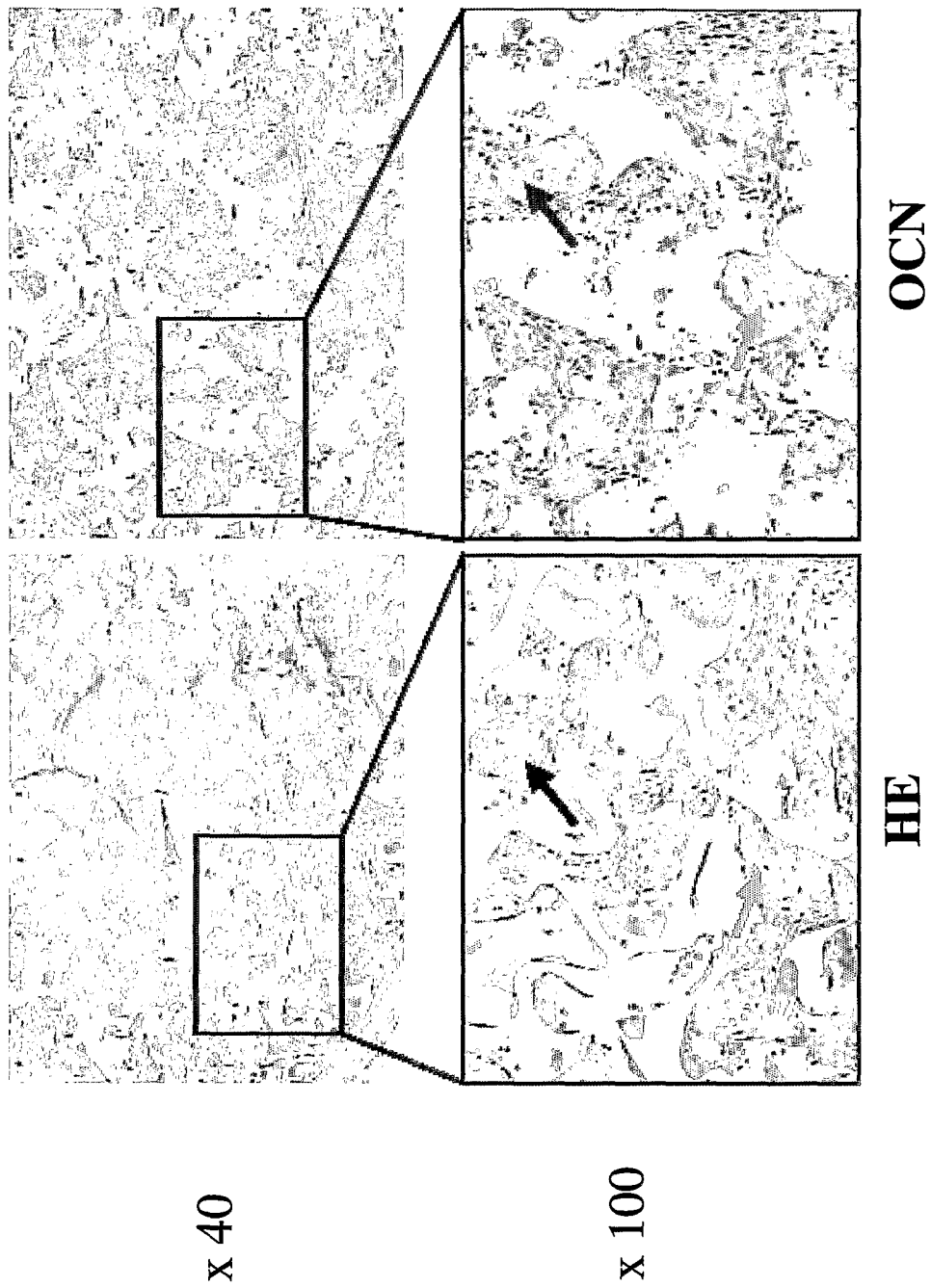


図 1 1

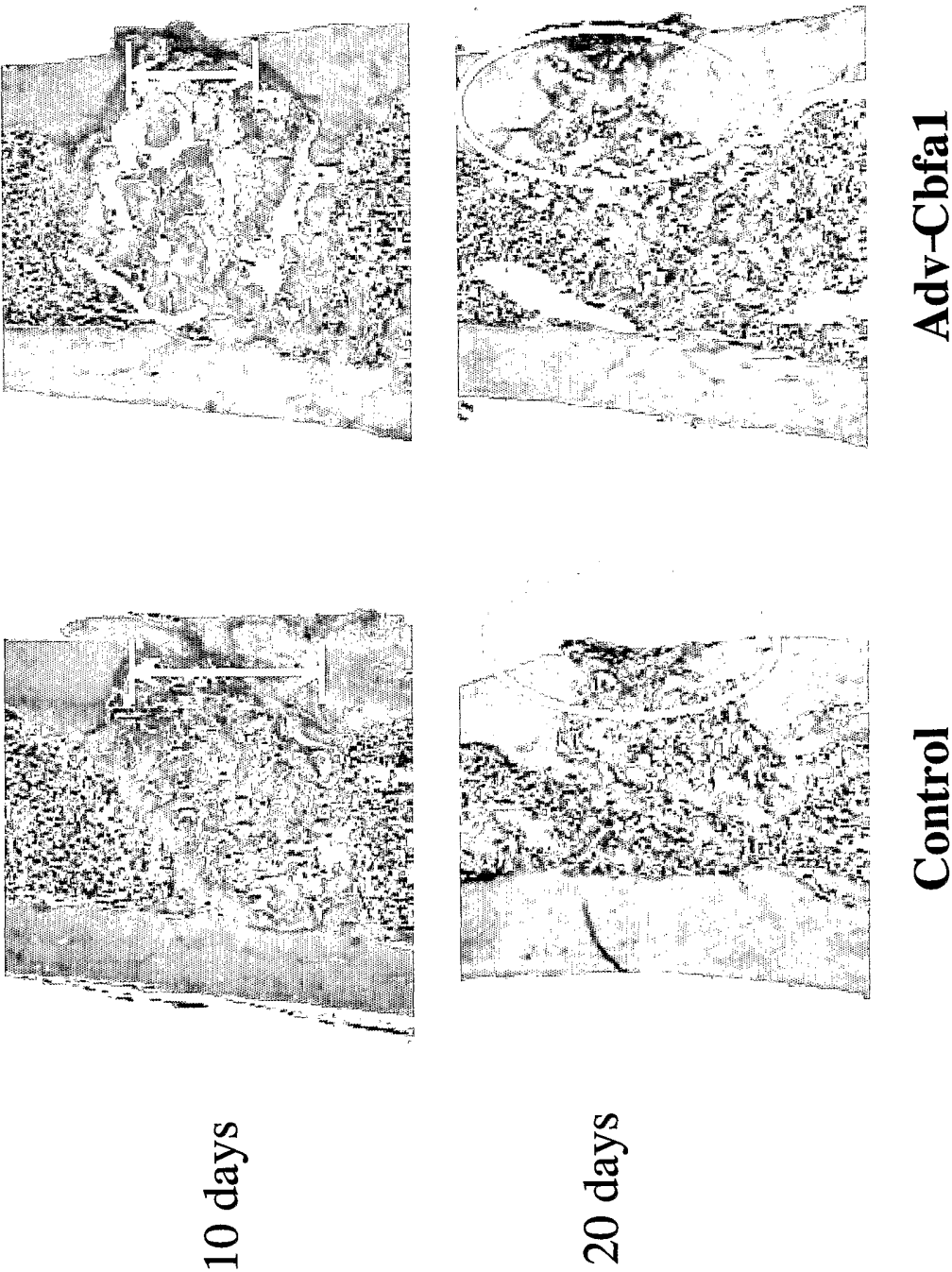
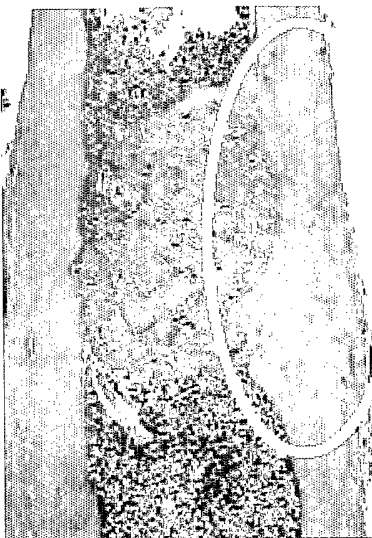


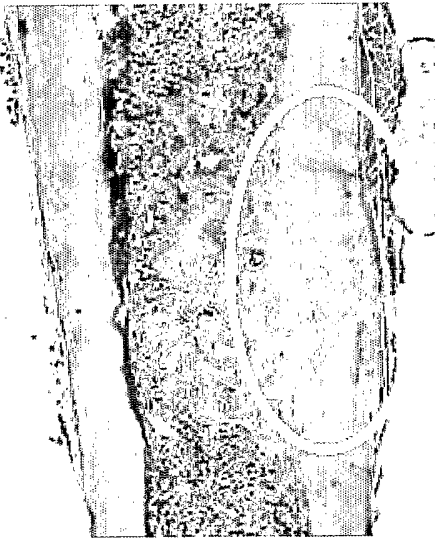
図 12



Control



Adv-Cbfa1



Adv-VEGF

SEQUENCE LISTING

<110> Japan Science and Technology Agency

National Institute of Advanced Industrial Science and Technology

<120> Implant for regeneration of bone/cartilage tissue by using transcription factor

<130> PH-2275-PCT

<150> JP 2003-355505

<151> 2003-10-15

<160> 3

<170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1

<211> 1791

<212> DNA

<213> Mus musculus

<220>

<221> CDS

<400> 1

atgcttcatt cgcctcaca acaaccacag aaccacaagt gcggtgcaaa ctttctccag 60
gaagactgca agaaggtctt ggcgtttaaa tggtaatat ctgcaggtea ctaccagcca 120
ccgagaccaa ccgagtcatt taaggctgca agcagtatatt acaacagagg gcacaagttc 180
tatctggaaa aaaaaggagg gactatggcg tcaaacagcc tcttcagcgc agtgacaccg 240
tgtcagcaaa gcttcttttg ggatccgagc accagccggc gcttcagccc cccctccagc 300

agcctgcagc cccgcaagat gagcgacgtg agccccgttg tggctgcgca gcagcagcaa 360
 cagcagcagc agcagcagca acagcagcag caacaacagc aacagcaaca acagcagcag 420
 cagcagcagc agcaggaggc ggccgcagca gcagcggcgg cagcggcggc ggcagcagcg 480
 gcggcggccg cagtgcctccg attgaggccg ccgcacgaca accgcacat ggtggagatc 540
 atcgcggacc acccggccga actggtccgc accgacagtc ccaacttctt gtgctccgtg 600
 ctgcctctgc actggcggtg caacaagacc ctgcccgttg ctttcaaggt ttagccctc 660
 ggagaggiac cagatgggac tgtggttacc gtcattggccg ggaatgatga gaactactcc 720
 gccgagctcc gaaatgcctc cgctgttatg aaaaaccaag tagccaggtt caacgatctg 780
 agatttgttg gccggagcgg acgaggcaag agtttcacct tgaccataac agtcttcaca 840
 aatctctccc aagtggccac ttaccacaga gctattaaag tgacagtga cggctccccg 900
 gaaccaagaa ggcacagaca gaagcttgat gactctaaac ctagtttgtt ctctgatcgc 960
 ctcatgtatt tagggcgcat tctcatccc agtatgagag taggtgtccc gcctcagaac 1020
 ccacggccct ccctgaactc tgcaccaagt ctttttaac cacaaggaca gattcagatt 1080
 acagatccca ggcaggcaca gtcttcccca ccgtggctct atgaccagtc ttaccctcc 1140
 tatctgagcc agatgacatc cccatccatc cactccacca cggcgctgtc ttccacacgg 1200
 ggcaccgggc tacctgcat cactgacgtg ccaggcgta tttcagatga tgacactgcc 1260
 acctctgact tctgcctctg gccttctct ctcagtaaga agagccaggc aggtgcttca 1320
 gaactgggcc ctttttcaga cccaggcag ttcccaagca tttcatccct cactgagagc 1380
 cgcttctcca acccagaaat gcactacca gccaccttta cctacacccc gccagtcacg 1440
 tcaggcatgt ccctcggcat gtccgccacc actcactacc acacgtacct gccaccaccc 1500
 taccctggct ctcccaaag ccagagtga ccttccaga ccagcagcac tccatatctc 1560
 tactatggta ctctgtcagc atcctatcag ttcccaatgg taccggggg agaccggtct 1620
 ctttccagga tggctccacc atgcaccacc acctcgaatg gcagcacgt attaaatcca 1680
 aatttgccta accagaatga tgggtgtgac gctgacggaa gccacagcag ttccccaact 1740
 gttttgaatt ctagcggcag aatggatgag tctgtttggc ggccatattg a 1791

<210> 2

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer

<400> 2

atgcttcatt cgctcacaac ac

22

<210> 3

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer

<400> 3

tctgtttggc ggccatattg a

21

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2004/015673

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER Int.Cl ⁷ A61L27/00, A61K48/00				
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) Int.Cl ⁷ A61L27/00, A61K48/00				
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched				
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) CA (STN), MEDLINE (STN)				
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT				
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.		
Y	JP 2001-519767 A (The Regents of the University of Michigan), 23 October, 2001 (23.10.01), Full text & WO 97/38729 A1 & AU 710386 B & EP 892644 A1 & CN 1226835 A & KR 2000005376 A	1-5		
Y	JP 3054634 B2 (The Regents of the University of Michigan), 14 April, 2000 (14.04.00), Full text & WO 95/22611 A2 & EP 741785 B1 & US 5763416 A & US 5942496 A & US 5962427 A & AU 698906 B	1-5		
☒ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☐ See patent family annex.				
<table border="0"> <tr> <td> * 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 </td> <td> "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 </td> </tr> </table>			* 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
* 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 12 November, 2004 (12.11.04)		Date of mailing of the international search report 30 November, 2004 (30.11.04)		
Name and mailing address of the ISA/ Japanese Patent Office		Authorized officer		
Facsimile No.		Telephone No.		

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2004/015673

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 03/11343 A1 (National Institute of Advanced Industrial Science and Technology), 13 February, 2003 (13.02.03), Full text & EP 1424082 A1	1-5
A	JP 2002-515731 A (Mount Sinai Hospital Corp.), 28 May, 2002 (28.05.02), Full text & WO 97/17430 A1 & AU 9672746 A & EP 862616 A1 & US 6464729 B1 & US 2002/0111695 A1	1-5
A	JP 7-508988 A (Beilar Collage of Medisin), 05 October, 1995 (05.10.95), Full text & WO 94/01139 A1 & AU 684050 B & EP 653943 A1	1-5

国際調査報告

国際出願番号 PCT/JP2004/015673

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl⁷ A61L 27/00, A61K 48/00

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. Cl⁷ A61L 27/00, A61K 48/00

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

国際調査で使用了電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

CA (STN), MEDLINE (STN)

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
Y	JP 2001-519767 A (ザ リージェンツ オブ ザ ユニバーシティー オブ ミシガン) 2001. 10. 23, 全文 &WO 97/38729 A1 &AU 710386 B &EP 892644 A1 &CN 1226835 A &KR 2000005376 A	1-5
Y	JP 3054634 B2 (ザ リージェンツ オブ ザ ユニ バーシティー オブ ミシガン) 2000. 04. 14, 全文 &WO 95/22611 A2 &EP 741785 B1 &US 5763416 A &US 5942496 A	1-5

☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。☐ 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

の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

12. 11. 2004

国際調査報告の発送日

30.11.2004

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/JP)

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)

八原 由美子

4C 9261

電話番号 03-3581-1101 内線 3451

C (続き) . 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
	&US 5962427 A &AU 698906 B	
Y	WO 03/11343 A1 (独立行政法人産業技術総合研究 所) 2003. 02. 13, 全文 &EP 1424082 A1	1-5
A	JP 2002-515731 A (マウント・サイナイ・ホスピ タル・コーポレーション) 2002. 05. 28, 全文 &WO 97/17430 A1 &AU 9672746 A &EP 862616 A1 &US 6464729 B1 &US 2002/0111695 A1	1-5
A	JP 7-508988 A (ベイラー・カレッジ・オブ・メディ シン) 1995. 10. 05, 全文 &WO 94/01139 A1 &AU 684050 B &EP 653943 A1	1-5