

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第4014645号
(P4014645)

(45) 発行日 平成19年11月28日(2007.11.28)

(24) 登録日 平成19年9月21日(2007.9.21)

| | |
|-------------------------|----------------|
| (51) Int. Cl. | F I |
| C 1 2 M 3/00 (2006.01) | C 1 2 M 3/00 A |
| C 1 2 M 3/04 (2006.01) | C 1 2 M 3/04 Z |
| C 1 2 N 5/06 (2006.01) | C 1 2 N 5/00 E |
| C 1 2 N 11/02 (2006.01) | C 1 2 N 11/02 |

請求項の数 31 (全 12 頁)

| | | | |
|---------------|------------------------------|-----------|--|
| (21) 出願番号 | 特願平10-523827 | (73) 特許権者 | ティージェイ スミス アンド ネフュー リミテッド |
| (86) (22) 出願日 | 平成9年11月18日(1997.11.18) | | イギリス国 ハル エイチユー3 2ビー エヌ ヘスル ロード 101 |
| (65) 公表番号 | 特表2001-504697(P2001-504697A) | (74) 代理人 | 弁理士 野河 信太郎 |
| (43) 公表日 | 平成13年4月10日(2001.4.10) | | |
| (86) 国際出願番号 | PCT/US1997/021088 | (72) 発明者 | セリクター, ドロール アメリカ合衆国、ジョージア 30339 、アトランタ、ペイセス ステーション リッジ 3181 |
| (87) 国際公開番号 | W01998/022573 | (72) 発明者 | ダンケルマン, ヌーシン アメリカ合衆国、カリフォルニア 921 31、サンディエゴ、メイサ マデラ コ ート 11518 |
| (87) 国際公開日 | 平成10年5月28日(1998.5.28) | | |
| 審査請求日 | 平成16年10月28日(2004.10.28) | | |
| (31) 優先権主張番号 | 08/753,104 | | |
| (32) 優先日 | 平成8年11月20日(1996.11.20) | | |
| (33) 優先権主張国 | 米国(US) | | |

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 軟骨細胞への剪断流れ応力の印加

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

グロース・チャンバと、軟骨を生成し得る細胞の接着のための基質と、この基質に接着した細胞に約1～約100ダイン/cm²の剪断流れ応力をもたらすために液体培地と基質との間の相対運動を与えるための手段とを備えてなる軟骨生成用バイオリアクタ。

【請求項2】

約1～約50ダイン/cm²の剪断流れ応力を加えるための手段をさらに備えている請求項1記載のバイオリアクタ。

【請求項3】

剪断流れ応力を加えるための前記手段が、貯蔵器と、ポンプと、前記グロース・チャンバ、前記貯蔵器及び前記ポンプを相互接続するための管類とを備え、前記ポンプによって与えられた駆動力に応じて、前記貯蔵器から前記グロース・チャンバを通り再び前記貯蔵器へ戻る液体増殖培地の連続流を生じさせるようにされている請求項1記載のバイオリアクタ。

【請求項4】

前記基質が、足場である請求項1記載のバイオリアクタ。

【請求項5】

前記足場が、生体吸収性のものである請求項1記載のバイオリアクタ。

【請求項6】

前記基質が、前記細胞の増殖を単層で支持する非多孔性面である請求項1記載のバイオリ

10

20

アクタ。

【請求項 7】

前記非多孔性面が、回転可能なドラムの表面である請求項 6 記載のバイオリアクタ。

【請求項 8】

前記非多孔性面が、回転可能なディスクの表面である請求項 6 記載のバイオリアクタ。

【請求項 9】

前記非多孔性面が、静止プレートである請求項 6 記載のバイオリアクタ。

【請求項 10】

(a) 細胞接着のための基質を備えたグロス・チャンバを用意するステップと、

(b) その基質を液体増殖培地で被覆するステップと、

(c) 軟骨を生成し得る細胞を前記培地に接種

するステップと、

(d) 前記細胞を前記基質に接着させるステップと、

(e) 前記細胞に約 1 ~ 約 100 ダイン / cm^2 の剪断流れ応力をもたらすために、液体増殖培地と基質に接着した細胞との間に相対運動を加えてそれを維持し、それによって剪断流

れ応力の加えられた細胞を生成するステップと、

(f) 前記剪断流れ応力の加えられた細胞を、軟骨を生成させるのに十分な時間だけ培養するステップとを備えている 軟骨生成方法。

【請求項 11】

前記剪断流れ応力が、約 1 ~ 約 50 ダイン / cm^2 である請求項 10 記載の方法。

【請求項 12】

前記基質が、足場である請求項 10 記載の方法。

【請求項 13】

前記足場が、生体吸収性のものである請求項 10 記載の方法。

【請求項 14】

前記基質が、前記細胞の増殖を単層で支持する非多孔性面である請求項 10 記載の方法。

【請求項 15】

前記非多孔性面が、回転可能なドラムの表面である請求項 10 記載の方法。

【請求項 16】

前記非多孔性面が、回転可能なディスクの表面である請求項 10 記載の方法。

【請求項 17】

前記非多孔性面が、静止プレートである請求項 10 記載の方法。

【請求項 18】

前記剪断流れ応力の加えられた細胞が、

(a) 軟骨細胞の表現型の増進した維持を表し、かつ

(b) II 型コラーゲンの I 型コラーゲンに対する増大した比を含む細胞外マトリックスを生成する請求項 10 記載の方法。

【請求項 19】

(a) 細胞接着のための基質を備えたグロス・チャンバを用意するステップと、

(b) その基質を液体増殖培地で被覆するステップと、

(c) 前記培地に哺乳類幹細胞を接種するステップと、

(d) 前記細胞を前記基質に接着させるステップと、

(e) 前記幹細胞に約 1 ~ 約 100 ダイン / cm^2 の剪断流れ応力をもたらすために、液体増殖培地と基質に接着した細胞との間に相対運動を加えてそれを維持し、それによって剪断流れ応力の加えられた幹細胞を生成するステップと、

(f) 前記剪断流れ応力の加えられた幹細胞を、軟骨細胞に分化させるのに十分な時間だけ培養するステップとを備えている

幹細胞の軟骨細胞への分化誘発方法。

【請求項 20】

前記剪断流れ応力が、約 1 ～ 約 5 0 ダイン / cm^2 である請求項19記載の方法。

【請求項 2 1】

(a) 細胞接着のための基質を備えたグロス・チャンバを用意するステップと、
 (b) その基質を液体増殖培地で被覆するステップと、
 (c) 前記培地に、軟骨細胞または軟骨幹細胞以外の哺乳類細胞を接種するステップと、
 (d) 前記細胞を前記基質に接着させるステップと、
 (e) 前記細胞に約 1 ～ 約 1 0 0 ダイン / cm^2 の剪断流れ応力をもたらすために、液体増殖培地と基質に接着した細胞との間に相対運動を加えてそれを維持し、それによって剪断流れ応力の加えられた細胞を生成するステップと、
 (f) 前記剪断流れ応力の加えられた細胞を、軟骨細胞に完全分化させるのに十分な時間だけ培養するステップとを備えている
 培養細胞の軟骨細胞への完全分化誘発方法。

10

【請求項 2 2】

前記剪断流れ応力が、約 1 ～ 約 5 0 ダイン / cm^2 である請求項21記載の方法。

【請求項 2 3】

分化された前記哺乳類細胞が、繊維芽細胞及び筋細胞から構成される群から選ばれる請求項21記載の方法。

【請求項 2 4】

細胞が、軟骨細胞、軟骨幹細胞、間葉系幹細胞、及び軟骨細胞の表現型へ完全分化する細胞から構成される群から選ばれる請求項 1 記載のバイオリアクタ。

20

【請求項 2 5】

骨格が、生体に影響を及ぼさないものである請求項 4 記載のバイオリアクタ。

【請求項 2 6】

足場が、生分解性のものである請求項25記載のバイオリアクタ。

【請求項 2 7】

足場が、非生分解性のものである請求項25記載のバイオリアクタ。

【請求項 2 8】

細胞が、軟骨細胞、軟骨幹細胞、間葉系幹細胞、及び軟骨細胞の表現型へ完全分化する細胞から構成される群から選ばれる請求項10記載の方法。

【請求項 2 9】

足場が、生体に影響を及ぼさないものである請求項12記載の方法。

30

【請求項 3 0】

足場が、生分解性のものである請求項29記載の方法。

【請求項 3 1】

足場が、非生分解性のものである請求項29記載の方法。

【発明の詳細な説明】

発明の分野

この発明は哺乳類組織の培養及び人工軟骨に関するものである。

発明の背景

軟骨は関節が滑らかに動くのを可能にする。軟骨は基本的に、軟骨細胞として知られる高度に分化した細胞からなり、濃密な細胞外マトリックス (E C M) により囲まれている。人工軟骨の場合は、組織は主に、型コラーゲン、プロテオグリカン及び水から生成されている。完全に成長した軟骨は、外傷または退行性関節症による損傷に対する再生能力及び修復能力に限界がある。損傷した軟骨を組織培養で増殖した軟骨で置き換えるための外科的処置が発達してきた。組織培養された軟骨を生成させるときに用いる目的で、バイオリアクタが、例えば軟骨細胞などの培養細胞の増殖のために用いられている。

40

発明の概要

われわれは、培養した軟骨細胞が剪断流れ応力下では整列しないことを発見した。われわれはまた、培養した軟骨細胞に剪断流れ応力を印加することにより、軟骨細胞表現型の維持が增強されることを発見した。これは軟骨細胞中に増加したII型コラーゲンの沈着によ

50

り反映される。

これらの発見に基づいて、この発明は人工軟骨を生成するためのバイオリアクタを特徴とする。このバイオリアクタは、培養した哺乳類細胞を収容するためのグロース・チャンバと、細胞を接着させるための基質と、剪断流れ応力を印加するための手段とを含んでいる。バイオリアクタは、剪断流れ応力を約 $1 \sim 100$ ダイン / cm^2 の強さで印加するが、好ましくは約 $1 \sim 50$ ダイン / cm^2 の強さで印加することができる。この発明のいくつかの実施態様では、貯蔵器、ポンプ、相互接続用管類等を用いて剪断流れ応力が印加される。これらの構成要素は、ポンプにより加えられる力に応じて、貯蔵器からグロース・チャンバを通して再び貯蔵器へ戻る液体増殖培地の連続的な流れを起こすように配置される。

10

バイオリアクタ中の基質は、3次元細胞培養物の増殖を支持する足場であってもよい。この足場は生体吸収性のものであってもよい。これに代えて、基質は、単層での培養細胞の増殖を支持する非多孔性の表面であってもよい。非多孔性表面は回転可能なドラム、回転可能なディスクまたは静止プレートの平滑な表面であってもよい。ドラムまたはディスクを使用する場合には、液体培地中におけるドラムまたはディスクの運動、例えば回転などにより、剪断流れ応力が生じる。静止プレートを使用する場合には、ポンプからの駆動力でプレートを通過する液体培地の運動により、剪断流れ応力が生じる。

この発明はまた、人工軟骨の生成方法を提供する。その方法は、(a)細胞の接着のための基質を含んだグロース・チャンバを用意するステップと、(b)その基質を液体培地に浸漬するステップと、(c)その培地に、軟骨細胞、軟骨幹細胞、または軟骨細胞の表現型に完全分化する細胞を接種するステップと、(d)これらの細胞を基質に接着させるステップと、(e)これらの細胞に、約 $1 \sim 100$ ダイン / cm^2 、好ましくは約 $1 \sim 50$ ダイン / cm^2 の剪断流れ応力を加えて、その応力を維持するステップと、(f)剪断流れ応力の加えられた細胞を、人工軟骨を生成させるのに十分な時間だけ培養するステップとを含んでいる。

20

基質は足場であってもよい。また、足場は生体吸収性のものであってもよい。基質はまた、回転可能なドラム、回転可能なディスクまたは静止プレートのような、非多孔性の表面であってもよい。

この方法に基づいて増殖した、剪断流れ応力の加えられた細胞は、軟骨細胞の表現型の維持が増進したことを示す。加えて、これらの細胞は、I型コラーゲンに対するII型コラーゲンの高くなった比率を含んだ細胞外マトリックスを生成する。

30

この発明はさらに、幹細胞の軟骨細胞への分化を誘発する方法を提供する。この幹細胞分化方法は、(a)細胞の接着のための基質を含んだグロース・チャンバを用意するステップと、(b)その基質を液体培地に浸漬するステップと、(c)この培地に哺乳類幹細胞を接種するステップと、(d)この幹細胞を基質に接着させるステップと、(e)幹細胞に、約 $1 \sim 100$ ダイン / cm^2 、好ましくは約 $1 \sim 50$ ダイン / cm^2 の剪断流れ応力を加えて、その応力を維持するステップと、(f)幹細胞を、軟骨細胞に分化するのに十分な時間だけ培養するステップとを含んでいる。

この発明はまた、培養細胞の軟骨細胞への完全分化を誘発させる方法の特徴とする。この完全分化方法は、(a)細胞の接着のための基質を含んだグロース・チャンバを用意するステップと、(b)その基質を液体培地に浸漬するステップと、(c)この媒質に、軟骨細胞または軟骨幹細胞以外の哺乳類細胞を接種するステップと、(d)これらの細胞を基質に接着させるステップと、(e)これらの細胞に、約 $1 \sim 100$ ダイン / cm^2 、好ましくは約 $1 \sim 50$ ダイン / cm^2 の剪断流れ応力を加えて、その応力を維持するステップと、(f)これらの細胞を、軟骨細胞に完全分化するのに十分な時間だけ培養するステップとを備えてなる。

40

この完全分化方法で用いるのに好ましい非軟骨細胞としては、繊維芽細胞及び筋細胞がある。

ここで使用する「生体吸収性」という用語は、細胞培養物の内部または人工軟骨の移植受容者の体内で、生物分解性であることを意味する。

50

ここで使用する「軟骨細胞」という用語は、軟骨の細胞を意味する。軟骨細胞は、例えば関節（またはガラス質）の軟骨、弾性軟骨、及び繊維軟骨などの、さまざまな種類の軟骨の中に見られるものである。

ここで使用する「基質」という用語は、グロース・チャンバ内で培養細胞が固着または接着する支持構造体を意味する。

ここで使用する「足場」という用語は、3次元培養物を生成するように培養哺乳類細胞が接着できる3次元の多孔性の細胞培養に影響を及ぼさない構造体を意味する。この用語をここで使用するとき、足場は一種の基質である。

ここで使用する「剪断流れ応力」という用語は、液体培地と細胞との間の相対運動によって培養細胞に作用する流体起因力を意味する。剪断流れ応力は、静止している細胞に液体を通過させるか、静止した液体に細胞を通過させるか、または液体と細胞とを同時に動かすことによって、生じさせることができる。剪断流れ応力は一般に、 $\text{ダイン} / \text{cm}^2$ に基づいて定量化される。

ここで使用する「幹細胞」という用語は、特定の組織を特徴付ける分化細胞へと成熟する娘細胞を生じる未分化細胞を意味する。

ここで使用する「完全分化」という用語は、筋細胞または繊維芽細胞などの1つの表現型から軟骨細胞などの別の表現型に分化した細胞の変化を意味する。

別に定義しない限り、ここで使用するすべての技術的、科学的な用語は、細胞培養技術の当業者が普通に理解するものと同じの意味を有している。ここに記載する材料及び方法と同様または同等の方法をこの発明の実施または試験において使用することができるが、好ましい方法及び材料は以下に記載される。ここに記載するすべての出版物、特許出願、特許及びその他の文献は、引用によってここに組み入れられる。加えて、材料、方法及び実例は、この発明を説明するためだけのものであって、これに限定されることを意図するものではない。

この発明のその他の利点及び特徴は、詳細な説明及び請求の範囲から明らかになる。

【図面の簡単な説明】

図1は、グロース・チャンバ、ポンプ、培地貯蔵器及び接続用管類を含んだ剪断流れバイオリクタシステムの概略説明図である。

図2は、少なくとも一部が液体培地に浸漬された内部及び外部の同心ドラムを含む剪断流れグロース・チャンバの概略説明図である。

図3は、グロース・チャンバ内で回転するディスクを含む剪断流れグロース・チャンバの概略説明図である。

図4は、グロース・チャンバ内における静止した平行プレートを含む剪断流れグロース・チャンバの概略説明図である。

図5は、それぞれ2週目及び4週目における人工軟骨構成物中のコラーゲン及び硫酸化GAGレベルについてのデータを要約した棒グラフである。白の棒は硫酸化GAGを、黒の棒はコラーゲンを示す。

図6は、それぞれ2週目及び4週目における人工軟骨構成物中のコラーゲン及び硫酸化GAGレベルと、天然軟骨中のコラーゲン及び硫酸化GAGレベルとについてのデータを要約した棒グラフである。白の棒は硫酸化GAGを、黒の棒はコラーゲンを示す。

詳細な説明

この発明は、人工軟骨生成に使用される哺乳類細胞培養物に剪断流れ応力を印加するための装置及び方法を提供する。

剪断流れ応力を3次元または単層の軟骨細胞培養物に加えることで、軟骨細胞により生成されるII型コラーゲンのI型コラーゲンに対する比率が好都合に増大する。剪断流れ応力はまた、軟骨細胞の表現型の維持を好都合に増進する。このように、この発明による剪断流れ応力の印加により、3次元または単層の軟骨細胞培養の機能的成果が向上するとともに、単層培養物の有効寿命が増加する。

幹細胞に剪断流れ応力を加えることにより、幹細胞の軟骨細胞への分化が誘発または促進される。幹細胞の軟骨細胞への分化の誘発または促進は、軟骨細胞に関する剪断流れ方法

10

20

30

40

50

において軟骨細胞の代わりに幹細胞を用いることにより達成される。幹細胞の分化により生じる軟骨細胞は、剪断流れ応力下で、人工軟骨が生成されるのに十分な時間だけ培養物中に維持される。

この発明において、剪断流れ応力はまた、分化した細胞の軟骨細胞への完全分化を誘発するために使用することができる。完全分化は、ここに記載した軟骨細胞に関する剪断流れ方法において軟骨細胞以外の分化細胞、例えば筋細胞または繊維芽細胞を代用することにより達成される。分化した細胞は剪断流れ応力に応じて軟骨細胞に完全分化する。完全分化過程から生じる軟骨細胞は、剪断流れ応力下で、人工軟骨が生成されるのに十分な時間だけ培養物中に維持される。

この発明のどのような実施態様によって生成された人工軟骨も、損傷または欠損した軟骨を置き換えるために、慣用の医療処置に基づいて外科移植に使用することができる。典型的には、人工軟骨は膝や肘などのヒトの関節の修復に使用される。

この発明の装置及び方法において、剪断流れ応力はさまざまな手段で培養細胞に印加することができる。例えば、液体増殖培地に浸漬された回転ドラムまたは回転ディスクの表面上で軟骨細胞の単層を培養することにより、剪断流れ応力を印加してもよい。これに代えて、液体増殖培地がポンプで運ばれて通過する静止プレート上で軟骨細胞の単層を増殖させることにより、剪断流れ応力を印加してもよい。液体増殖培地がポンプで運ばれて通過するチャンバ内で培養を行うことにより、3次元軟骨細胞培養物に剪断流れ応力を印加することもできる。

軟骨細胞に印加される剪断流れ応力の大きさは、ドラムまたはディスクの回転速度または液体培地のポンプ流量を調整することにより制御される。この発明において、軟骨細胞またはその他の細胞に印加される剪断流れ応力のレベルは、約1～約100ダイン/cm²である。この剪断流れ応力は好ましくは、約1～約50ダイン/cm²である。剪断流れ応力は

数式(1): 剪断流れ応力 = $6 \mu Q / b h^2$ ダイン/cm²

により計算される。

式中:

μ は流体の粘度 (N s e c / m²)

Q は流量 (m l / 分)

b はチャンバ幅 (c m)

h はチャンバ高 (c m)

を表す。

培養軟骨細胞

培養軟骨細胞は、単層または3次元培養のいずれで培養されていても、基質に固着つまり接着させることが好ましい。バイオリアクタにおける単層支持表面または3次元足場には、軟骨細胞、幹細胞、または完全分化に適した分化細胞が接種される。人工軟骨は、例えば、RPMI 1640、フィッシャー、アイスコブまたはマッコイ等の従来の哺乳類組織培養培地の中で軟骨細胞を増殖させることにより生成することができる。これらの培地は、当該技術において公知であり、市販されているものである。典型的には、細胞は、5% CO₂の補足された空気中において37℃で培養される。これらの条件下では、接種に使用した細胞型と培養条件とによって異なるが、約7～56日間で、軟骨細胞単層または3次元軟骨マトリックスが生成される。

リアクターの表面または3次元マトリックスに接種するために、分離した軟骨細胞を使用してもよい。また、幹細胞または完全分化に適した細胞を接種の際に使用してもよい。

この発明における培養への接種に使用する細胞は、適切ないかなる方法によっても分離することができる。軟骨細胞の分離には種々の出発材料及び方法が知られている。一般には、ニューヨークのエー・アール・リス インコーポレイテッド社の発行になる、フレッシュニーによる「動物細胞の培養。基礎技術のマニュアル」第2版, pp137-168 (1987)を参照のこと。軟骨細胞分離のための出発材料の例としては、哺乳類の膝関節または胸郭が挙げられる。

10

20

30

40

50

出発材料が、軟骨細胞が本質的に存在する唯一の細胞型である組織、例えば関節の軟骨である場合には、細胞は、従来のコラゲナーゼ消化及び組織培養法により直接得てもよい。これに代えて、細胞は、出発材料中に存在する他の細胞型から分離してもよい。軟骨細胞分離の公知の方法の1つとして、プラスチック製組織培養容器へのディファレンシャル・アドヒージョンが挙げられる。2番目の方法では、軟骨細胞の表面マーカーに結合する抗体で組織培養皿を被覆し、その後、多相細胞集団から選択的に軟骨細胞を結合させるために使用してもよい。3番目の方法では、軟骨を分離するために軟骨細胞特異抗体を用いた蛍光発色セルソーティング(FACS)が用いられる。4番目の方法では、フィコールなどの密度勾配遠心法により、軟骨細胞はその浮遊密度に基づいて分離される。

分化のための幹細胞または完全分化に適した分化細胞が分離できる組織としては、胎盤、臍帯、骨髄、皮膚、筋肉、骨膜または軟骨膜が挙げられる。従来の方法を用いた外植片培養及び/または周辺マトリックスの酵素による消化により、これらの組織から細胞を分離することができる。

人工軟骨構造体が所望の大きさ及び組成になるまで増殖すると、このシステム内に冷凍保存流体を導入してもよい。冷凍保存流体は、後で使用するために人工軟骨構造体を冷凍する。哺乳類組織培養材料のための冷凍保存の方法及び材料は当業者にとって公知である。

バイオリアクタ流動システム

この発明のいくつかの実施態様では、図1に示すように、循環流システム16をグロース・チャンバ11とともに使用する。循環流システム16は培地貯蔵器9、ポンプ10、グロース・チャンバ11及び管類12を有する。

滅菌した液体容器であればどのようなものでも、貯蔵器9として適合させることができる。好ましい貯蔵器の1つは滅菌バッグである。適切な滅菌バッグはGibco/BRLなどより市販されている。この発明のいくつかの実施態様において、上部貯蔵器をバイオリアクタの上流部に配置し、下部貯蔵器をバイオリアクタの下流部に配置し、ポンプにより下部貯蔵器から上部貯蔵器へ液体培地が戻される。

貯蔵器9は、システム中の液体への滅菌ガスの直接供給源を提供するために、滅菌フィルタを含んでいてもよい。また、貯蔵器9は例えば、システムへの滅菌ガスの拡散による間接的な供給源を提供するために、シリコンまたはテフロン製の気体透過性の管類または膜を含んでいてもよい。1つまたはそれ以上のバルブ及び流量計をシステム中に含んでいることが好ましい。

ポンプ10は、滅菌状態で液体を貯蔵器9からグロース・チャンバ11に移動させてそれを戻すように構成される。典型的には、ポンプ10は、システム中の流速及び流圧の両方を制御する。ポンプ10は蠕動ポンプを用いることができる。これに代えて、交替圧力源を有する弾性囊を用いることができる。外部圧力を変化させることにより、その囊の膨張及び収縮が生じる。システム中での滅菌した液体の単方向性運動を実現するために1対の逆止弁を使用してもよい。

システム中で滅菌した液体を循環させる接続管類12は、ステンレス鋼製パイプまたは耐久性医療用プラスチック管類であってもよい。これに代えて、管類12はシリコン等の気体透過性材料からなるものでもよい。

3次元培養

哺乳類細胞の3次元培養の方法及び材料は当業者に公知である。例えば、米国特許第5,266,480号公報を参照のこと。典型的には足場は、バイオリアクタ中のグロース・チャンバ内で3次元培養物を支持するために使用される。足場は、培養した哺乳類細胞が侵入し接着しまたは固着することのできるいずれの多孔性の組織培養に影響を及ぼさない材料からなってもよい。そのような材料としては、ナイロン(ポリアミド類)、ダクロン(ポリエステル類)、ポリスチレン、ポリプロピレン、ポリアクリレート類、ポリ塩化ビニル、ポリテトラフルオロエチレン(テフロン)、ニトロセルロース及び木綿が挙げられる。足場は、ポリグリコール酸、腸線縫合材料またはゼラチンのような生体吸収性または生分解性材料からなるものであることが好ましい。一般に、足場の形状は重要ではない。

10

20

30

40

50

軟骨細胞を足場に接種する前に、任意に間質細胞を足場に接種して間質マトリックスを生成させてもよい。その後に間質マトリックスに軟骨細胞を接種する。間質細胞は繊維芽細胞を含んでいてもよい。間質細胞はまた、他の細胞型を含んでいてもよい。

3次元培養は、図1に概略的に示すような循環流システム16において使用することができる。剪断流れ応力は、3次元培養物を含んだグローブ・チャンバにポンプで送られる液体培地の運動によって、軟骨細胞に印加される。足場及び接着した細胞は静止していることが好ましい。アポロ型及びジェミニI型の2つのバイオリアクタにより得られたデータから、人工軟骨を生成するために使用される3次元培養物中での軟骨細胞の能力が、流速の増加、すなわち剪断応力の増加により向上することがわかる。

アポロ型バイオリアクタ

関節軟骨は、骨格の成熟したニュージーランドシロウサギの大腿/脛骨関節から、屠殺後4時間以内に無菌で採取した。軟骨細胞はダンケルマンらがBiotech.Bioengineering 46:299-305 (1995)に記載したように、コラゲナーゼ消化により分離した。軟骨細胞はその後、培地(ウシの胎児の血清10%、L-グルタミン2mM、非必須アミノ酸2mM、プロリン50mg/mL、ピルビン酸ナトリウム1mM、及びゲンタマイシン35mg/mLを含有するDMEM)により、2継代にわたって培養した。

射出成形したポリカーボネート製バイオリアクタ(内容量1.2mL)を気体透過性シリコン及びバイオプレレン製の管類を用いて組み立て、電子ビーム照射(2.5Mrad)で滅菌した。ポリグリコール酸(PGA)メッシュ(52mg/cc、熱メッキなし、厚さ1.9mm、直径1cm、多孔度97%の空隙率)を酸化エチレンガスで滅菌し、使用するまで窒素下で保存した。滅菌したPGAメッシュは予め37℃で培地に一晚浸し、滅菌したバイオリアクタシステムに入れた。

メッシュは、各バイオリアクタシステム(5つの連結バイオリアクタ)を、培地35mL中に 3.0×10^6 個の細胞の細胞懸濁液を含む培地バッグに取り付ける再循環植付技術を用いて植え付けた。このシステムをポンプ(Cole-Parmer)に接続して、培地の流速を0.2mL/分とし、37℃の加湿インキュベータに入れた。植え付け後、構成体はアスコルベート(50µg/mL)を含有する培地を用いて、流速0.05mL/分で培養した。一晚インキュベートした後に、流速を0.2mL/分に上昇させ、週ごとに流速を0.2mL/分だけ上昇させた。流動方向は一週間当たりで5日、変えた。

2週間または4週間の培養の後に、ファーンデールらがBiochem. Biophys. Acta 883:173-177 (1986)に記載したように、ジメチルメチレンブルー結合により軟骨構成体を全硫酸化グリコサミノグリカン(GAGs)について分析した。全コラーゲンはウースナーら(Arch. Biochem. Biophys. 93:440-447 (1961))が記載したように、ヒドロキシプロリン定量により分析した。別々の試料を取り出し、10%緩衝ホルマリンで固定し、パラフィンに埋め込んだ。硫酸化グリコサミノグリカン(GAGs)の量及び分布とコラーゲンの型とを評価するため、5ミクロンの試料切片をサフラニンオーまたはコラーゲン抗体(Southern Biotech, Birmingham, AL)でそれぞれ染色した。

流体力学条件下における2~4週間培養の間には、軟骨構成体上でのコラーゲン及び硫酸化GAGのレベルおよびパーセンテージの顕著な増加($p < 0.05$)が確認された(図5及び図6)。4週目では、濃度は、成長したウサギの関節軟骨のものとそれほど違わなかった(図6)。2~4週間培養の間でコラーゲンレベルは増加したが、4週目ではコラーゲン含有量はウサギの関節軟骨よりもまだ低かった。流体力学的に培養した構成体と比較して、静止状態で同じ時間維持した培養物中のコラーゲン及び硫酸化GAGの量は少なかった。

組織学的に、流体力学条件下で培養した構成体に沈着した硫酸化GAGパターンは、天然のウサギの関節軟骨のものと同様であったが、静止状態で培養した構成体の場合は非均一で、構成体の中心は硫酸化GAGがほとんどなかった。II型コラーゲンは免疫染色した構成体中に存在し、天然のウサギの関節軟骨に見られるものと同様の分布を示した。流体力学的に培養した構成体では空隙が大部分の細胞を取り巻いていたが、静止状態の構成体では見られなかった。

10

20

30

40

50

ジェミニⅠ型バイオリアクタ

大規模なバイオリアクタを用いた実験においても同様の結果が得られた。ウサギの軟骨細胞を 3.0×10^6 細胞 / システム で植え付け、流速を一定の 0.05 ml / 分 で、または 0.05 ml / 分 から 0.8 ml / 分 に徐々に増加させながら培養した。流速を増加させながら培養した細胞は高いマトリックス沈着を示した。流速を増加させながら増殖させた培養体では、グリコサミノグリカン (GAG) レベルは 25% から 50% であったが、低流速 (0.05 ml / 分) で培養した比較細胞では GAG レベルは約 3% であった。流速を増加させながら増殖させた培養体ではコラーゲンレベルは 12% から 20% であったが、低流速 (0.05 ml / 分) で培養した比較細胞ではコラーゲンレベルは約 5% であった。

単層培養

軟骨細胞の単層において剪断流れ応力を生じさせるために、バイオリアクタはさまざまな形態に形成することができる。これにより軟骨細胞の表現型が誘発されて維持される。

図 2 は同心ドラム 1, 2 を含む剪断流れグロス・チャンバ 3 を概略的に示す。ドラム 1, 2 のどちらかまたは両方の表面は、細胞を接着させる基質となる。ドラムのうちの 1 つが回転しているとき、もう 1 つのドラムは静止していてもよい。または両方のドラムが回転してもよい。どちらの構成においても、ドラム 1, 2 は少なくとも部分的に液体増殖培地 15 中に浸されている。ドラムに固着した細胞と液体増殖培地 15 との間での相対運動により、剪断流れ応力が生じる。

細胞に印加する流れ応力の大きさは、ドラムの回転速度を前記数式 (1) に従って調整することにより調整できる。ドラム 1, 2 の間隔 13 は数式 (1) におけるパラメータ (h) である。ドラムの回転速度は、剪断流れ応力が好ましくは約 $1 \sim 100 \text{ ダイン / cm}^2$ 、より好ましくは約 $1 \sim 50 \text{ ダイン / cm}^2$ になるように選択される。ドラムは速度可変型電動モータによって回転されることが好ましい。2 つのドラムの最適間隔は、ドラムの大きさや材料などの種々の要因により異なる。最適なドラム構造の決定は当業者の範囲内にある。剪断流れ応力はドラムの回転により生じるため、任意に液体貯蔵器及びポンプを伴う連続的な流れの構成にしてもよい。

図 3 は回転式ディスク 4 をグロス・チャンバ 5 中に含む剪断流れグロス・チャンバ 5 を概略的に示す。ディスク 4 は、液体培地 15 に浸されており、細胞接着のための基質となる。細胞に印加する流れ応力の大きさは、ディスクの回転を前記数式 (1) に従って調整することにより調整できる。ディスク 4 とグロス・チャンバの壁との間隔 13 は数式 (1) におけるパラメータ (h) である。ディスクの回転速度は、剪断流れ応力が好ましくは約 $1 \sim 100 \text{ ダイン / cm}^2$ 、より好ましくは約 $1 \sim 50 \text{ ダイン / cm}^2$ になるように選択される。細胞の接着及び増殖を支持するために利用できる合計表面積を増加させるために、1 つの回転シャフトに複数のディスクを配置するのは任意である。一般に、ディスクは速度可変型電動モータにより回転する。剪断流れ応力はディスクの回転により生じるため、任意に液体貯蔵器及びポンプを伴う連続的な流れの構成にしてもよい。

回転式ディスク周辺部近傍に位置する細胞は、中心軸近傍に位置する細胞よりも速い速度で移動する。したがって、より大きい剪断流れ応力を受ける。この影響の大きさはディスクの大きさにより異なる。したがって、この発明の回転式ディスクの実施態様では、単一のバイオリアクタ内で剪断流れ応力レベルの連続的な範囲に置かれる細胞の増殖を同時に行うことができる。この特徴は、所定の細胞培地での所定種類の細胞に対する剪断流れ応力レベルの変化による効果を体系的に比較するのに利用できる。

図 4 は、静止した 2 つの平行なプレートまたは壁 6, 7 をグロス・チャンバ 8 内に含む剪断流れグロス・チャンバ 8 を概略的に示す。同じグロス・チャンバ 8 内で一對の静止プレート 6, 7 を使用してもよいし、一對以上で用いてもよい。プレート 6, 7 は静止しているため、剪断流れ応力は、チャンバ 8 内へポンプによって送られる液体培地 15 の運動によってのみ生じる。液体培地 15 は平行プレート 6, 7 を通過し、約 $1 \sim 100 \text{ ダイン / cm}^2$ 、好ましくは約 $1 \sim 50 \text{ ダイン / cm}^2$ の剪断流れ応力を生じさせる。剪断流れ応力は前記数式 (1) に従って液体培地 15 の流速を調整することにより調整できる。静止プレート 6, 7 の間隔 13 は数式 (1) におけるパラメータ (h) である。静止

10

20

30

40

50

プレート 6, 7 は互いに平行であって液体増殖培地 15 の主な流れに対して直角であることが好ましい。

プレート 6, 7 の数を増加させることの利点は、細胞が単層を形成する合計表面積が増加することである。複数のプレートに起こりうる不利な点としては、プレートの数が増えるほどチャンバ 8 内の細胞に対する剪断流れ応力を均一なレベルで維持することが相対的に困難になることである。剪断流れ応力を均一なレベルで維持するための 1 つの方法としては、導入する液体培地 15 a をチャンバ 8 の 1 つの壁に広い範囲で分散させ、排出する液体培地 15 b をチャンバの反対側の壁における同様に広い領域から回収することが挙げられる。

回転ドラム 1, 2、回転ディスク 4 または静止プレート 6, 7 は、組織培養に影響を及ぼさない材料から形成されなければならない。例えばポリスチレン、ポリカーボネート及びステンレス鋼などの種々の組織培養に影響を及ぼさない材料が知られている。グロース・チャンバの壁及び単層支持基質として適当な材料を選定することは当業者の範囲内である。

10

下記の実験において、バイオリアクタ中の液体の流速は予め選択された約 1 ダイン / cm^2 及び約 24 ダイン / cm^2 の剪断流れ応力レベルとなるように調整した。液体培地の粘度 (μ) を $0.0012 \text{ N s e c} / \text{m}^2$ 、チャンバの幅 (b) を 2.5 cm 、チャンバの高さ (h) を 0.025 cm とした。前記数式 (1) により、剪断流れ応力を 1 ダイン / cm^2 とするためには流速 (Q) を $1.3 \text{ ml} / \text{分}$ にすればよいことが計算された。剪断流れ応力を 24 ダイン / cm^2 にするためには流速 (Q) を $31.25 \text{ ml} / \text{分}$ にすればよいことが計算された。

20

軟骨細胞を植え付けるためにプレート ($7.5 \text{ cm} \times 3.75 \text{ cm}$) は大きな組織培養皿から切断した。プレートを 70 % エタノールで処理することにより滅菌し、その後、層流フード中で 1 時間の紫外線処理を行った。その後、プレートをペトリ皿に置き、継代 2 ウサギ軟骨細胞 (passage 2 rabbit chondrocytes) の 1 ml 懸濁液を用いて、プレート当たり約 100,000 個の細胞の濃度で平板培養した。このステップで使用する細胞培養培地はアスコルベイトのない完全培地であった。プレートを培地で被覆して 6 時間放置した。その後、インキュベータに移し、37 °C で 2 日間インキュベートした。培地約 15 ml をさらに加え、プレートを流れループ内に配置した。この段階で細胞は準集密 (subconfluent) であった。

30

このシステム中における低流速で得られた結果と高流速で得られた結果とを比較するために、実験を行った。1 rpm で作動する剪断応力ローラボトル装置中での濃度に匹敵する濃度の軟骨細胞について、1 ダイン / cm^2 の剪断流れ応力を生じさせる低流速を使用した。24 ダイン / cm^2 の剪断流れ応力を生じさせる高流速も比較のため試験した。

この結果は、軟骨細胞のコラーゲン生成における剪断流れ応力による違いを示す。静止ローラボトルでの結果と比較すると、24 ダイン / cm^2 ではタイプ I コラーゲンの生成が減少した。静止ローラボトルでの結果と比較すると、24 ダイン / cm^2 では II 型コラーゲンの生成が増加した。これらの実験において剪断応力条件下では流動方向への細胞の配向は見られなかった。

その他の実施態様は下記請求項の範囲内である。

40

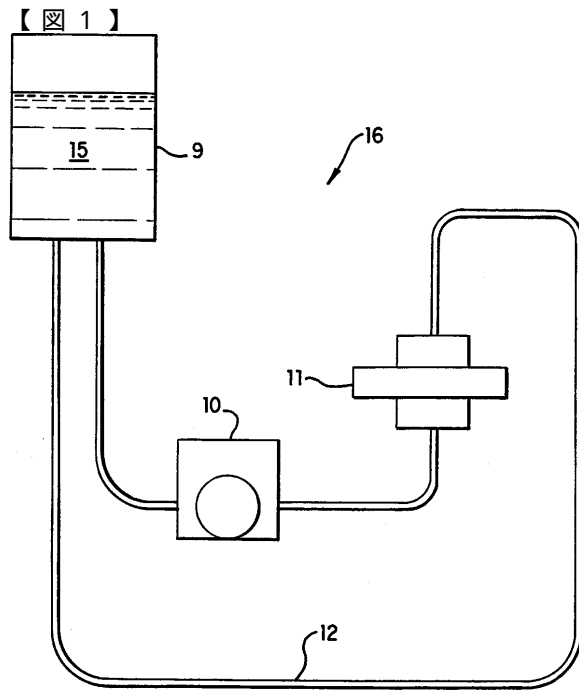


FIG. 1

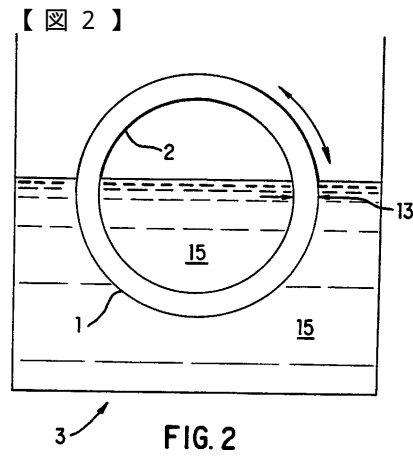


FIG. 2

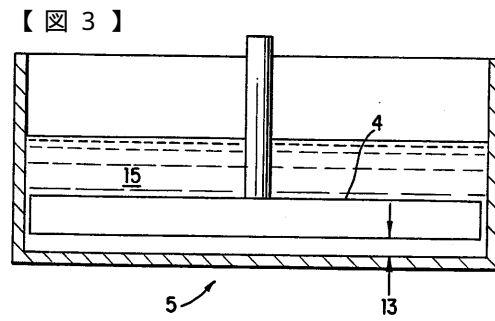


FIG. 3

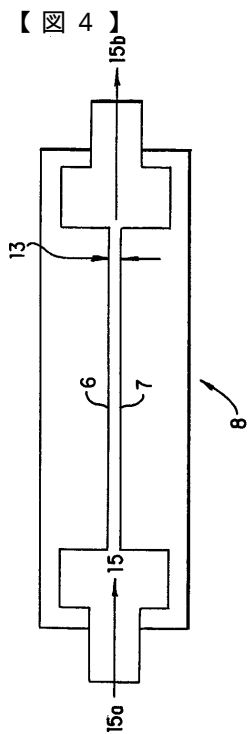


FIG. 4

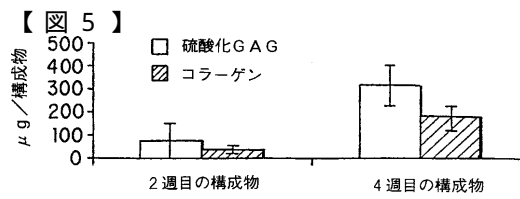


FIG. 5

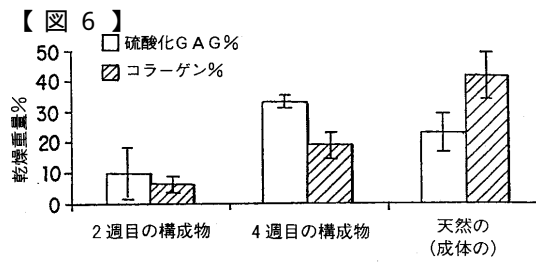


FIG. 6

フロントページの続き

- (72)発明者 ピーターソン, アルビン イー.
アメリカ合衆国、カリフォルニア 91935、ジャムル、スカイライン トラック テラス 1
7620
- (72)発明者 シュライバー, ロンダ イー.
アメリカ合衆国、カリフォルニア 92065、ラモーナ、キャリン コート 25745
- (72)発明者 ウィラビ, ジェイン
アメリカ合衆国、カリフォルニア 92014、デルマー、ノブ アベニュー 13731
- (72)発明者 ノートン, ゲイル ケー.
アメリカ合衆国、カリフォルニア 92014、デルマー、レネータ ドライブ 1280

審査官 斎藤 真由美

- (56)参考文献 特表平08-506506(JP, A)
特開平07-274994(JP, A)

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

C12M 1/00 - 3/10
C12N 1/00 - 9/99
C12Q 1/00 - 70
G01N 33/00 - 98
PubMed, MEDLINE(STN)
BIOSIS/WPI(DIALOG)