

(12) 特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局

(43) 国際公開日
2013 年 11 月 28 日(28.11.2013)



(10) 国際公開番号

WO 2013/176131 A1

- (51) 国際特許分類:
C12M 3/00 (2006.01) *C12N 5/0735* (2010.01)
A61F 2/06 (2013.01) *C12N 5/0775* (2010.01)
C12N 5/071 (2010.01) *C12N 5/10* (2006.01)
- (21) 国際出願番号: PCT/JP2013/064082
- (22) 国際出願日: 2013 年 5 月 21 日(21.05.2013)
- (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 2012-116780 2012 年 5 月 22 日(22.05.2012) JP
- (71) 出願人: 独立行政法人国立循環器病研究センター(NATIONAL CEREBRAL AND CARDIOVASCULAR CENTER) [JP/JP]; 〒5658565 大阪府吹田市藤白台五丁目 7 番 1 号 Osaka (JP).
- (72) 発明者: 中山 泰秀(NAKAYAMA, Yasuhide); 〒5658565 大阪府吹田市藤白台五丁目 7 番 1 号 独立行政法人国立循環器病研究センター内 Osaka (JP). 岩井 良輔(IWAI, Ryosuke); 〒5658565

大阪府吹田市藤白台五丁目 7 番 1 号 独立行政法人国立循環器病研究センター内 Osaka (JP). 大家 智憲(OIE, Tomonori); 〒5658565 大阪府吹田市藤白台五丁目 7 番 1 号 独立行政法人国立循環器病研究センター内 Osaka (JP).

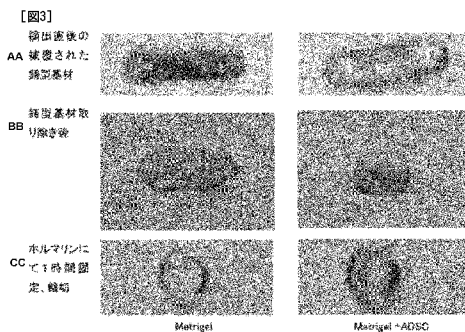
(74) 代理人: 鮫島 睦, 外(SAMEJIMA, Mutsumi et al.); 〒5300017 大阪府大阪市北区角田町 8 番 1 号 梅田阪急ビルオフィスタワー青山特許事務所 Osaka (JP).

(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, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

[続葉有]

(54) Title: TEMPLATE BASE FOR USE IN PRODUCTION OF ARTIFICIAL TISSUE BODY FOR TRANSPLANTATION

(54) 発明の名称: 移植用人工組織体製造のための鋳型基材



AA Covered template base immediately after being surgically removed
BB After removal of template base
CC Fixed with formalin for 1 hour and then sliced

(57) Abstract: Provided are: a method for forming a tissue body for transplantation which comprises a biological tissue containing a desired cell or a cell having a function similar to that of the desired cell; and a template base for use in the production of an artificial tissue body for transplantation, which can be used in the method. Provided is a template base for use in the production of an artificial tissue body for transplantation, which can carry thereon a desired cell, a cell that can become an alternative for the desired cell or a cell that can be differentiated into the desired cell in such a manner that the cell can be exuded out of the surface of the base. The template base can be used for producing an artificial tissue body for transplantation, wherein the production of the artificial tissue body is carried out by placing the template base, on which a desired cell, a cell that can become an alternative for the desired cell or a cell that can be differentiated into the desired cell has been carried, under the environment in which a biological tissue is present so that the template base can be covered with the biological tissue containing the desired cell or a cell having a function similar to that of the desired cell, and then removing the template base from the resultant product.

(57) 要約:

[続葉有]



(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, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), ヨーロッパ (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, 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 (条約第 21 条(3))

所望の細胞もしくは所望の細胞に類似の機能を有する細胞を含む生体組織からなる移植用組織体を形成させるための方法、並びに当該方法に用いられる移植用人工組織体製造用鑄型基材を提供する。所望の細胞、所望の細胞の代替となる細胞もしくは所望の細胞へ分化する能力を有する細胞を基材表面から外部へ侵出可能なように担持し得る鑄型基材であって、所望の細胞、所望の細胞の代替となる細胞もしくは所望の細胞へ分化する能力を有する細胞を担持させた該鑄型基材を生体組織の存在する環境下に置くことによって、該鑄型基材を該所望の細胞もしくは所望の細胞と類似の機能を有する細胞を含む生体由来組織にて被覆させ、次いで該鑄型基材を取り除くことによって移植用人工組織体を製造するために用いられる、移植用人工組織体製造用鑄型基材を提供する。

明 細 書

発明の名称：移植用人工組織体製造のための鋳型基材

技術分野

[0001] 本発明は、移植用人工組織体製造用鋳型基材に関する。

背景技術

[0002] 病気や事故で失われた細胞、組織、器官を、人工素材や細胞により再び蘇らせる再生医療の研究が数多くなされている。通常、身体には自己防衛機能があり、体内の浅い位置にトゲ等の異物が侵入した場合には体外へ押し出そうとするが、体内の深い位置に異物が侵入した場合にはその周りに繊維芽細胞が集まってきて、主に繊維芽細胞とコラーゲンからなる結合組織体のカプセルを形成し異物を覆うことにより、体内において隔離することが知られている。後者のような自己防衛反応を利用して、生体内において生体由来組織体を形成させ、これを移植に用いる生体内組織形成技術が提案されている（非特許文献１）。

[0003] 生体内組織形成技術により、人工材料を全く含まない移植用の組織体を形成することが可能である。またかかる技術においては、体内をバイオリアクターとして用いるため、従来の組織工学に必須であった煩雑な細胞操作を必要とせず、安全、簡便に、そして低コストで組織体を製造することができる。さらに、移植を受ける者本人の体内にて組織を形成させる場合には、移植される組織は自家組織であり、移植後の生体適合における免疫上の問題、感染症等の問題を排除することもできる。

[0004] より生体組織に近い、あるいは移植のために有用な組織体を得るために鋳型となる基材については種々の検討が為されている。例えば特許文献１には、棒状構造体の表面に螺旋状溝を形成し、この棒状構造体を生体内に埋入することにより、棒状構造体の表面に膜状の結合組織体を形成し、結合組織体の機械的強度を増加させる点が開示されている。

[0005] 特許文献２には、棒状構造部材の外周に沿って外郭部材を螺旋形に形成し

、これを生体に埋入して、棒状構造部材の外縁に結合組織体を形成する点が開示されている。結合組織体が外郭部材と棒状構造部材の表面との間に侵入し、結合組織体の内面形状が棒状構造部材の表面と同様の平滑面に形成される。結合組織体が、外郭部材を包埋する厚さに形成される。

[0006] 特許文献3には、棒状構造部材の表面に外郭部材を形成し、これを結合組織形成用基材とする点が開示されている。この基材を生体内に埋入することにより、基材表面に膜状の組織体を形成する。外郭部材の材料として、生体適合性に優れるが組織体やその構成成分に侵襲されにくい材料を使用することにより、外郭部材は組織体と癒着し結合組織体の機械的強度が増加されるとともに外郭部材の内面に組織体やその構成成分が露出しない人工血管が得られる。

[0007] 特許文献4には、基材を生体内に埋入して結合組織体を形成させる際に光照射をすることによって、より生体に近い組織体を得る方法が開示されている。

[0008] また、管状や膜状の単純な形状の組織体のみならず、複雑な形状を有する鋳型基材についての開発も行われている。特許文献5および非特許文献2には、バルサルバ洞の形状を有する張り出し部位と三葉弁を有する弁付き人工血管を得るための芯基材を開示する。

[0009] 生体組織はその組織に特有の細胞にて構成されている。例えば血管はその内表面が血管内皮細胞に覆われており、この血管内皮細胞が、血栓の形成を妨げる働きを担っている。一方、上記非特許文献1に記載の方法で得られる組織体は、主に結合組織体、即ち繊維芽細胞とコラーゲンマトリックスから形成される。かかる人工血管を生体へ移植した場合、移植後に生体環境に応じた自己組織が徐々に構築されるものの、移植直後は表面にコラーゲン繊維や細胞が露出しているため血栓形成の問題がある。血栓形成を防止するために、移植前にアルガトロバン、ヒルジン、ヘパリンなどの抗血栓物質でコーティングする等の処理が行われている。

[0010] 患者由来の角膜上皮細胞や口腔粘膜上皮細胞を培養してシート状にし、こ

れを人工角膜として角膜移植に用いることは既に臨床にて行われている（特許文献6、非特許文献3および4）。

先行技術文献

特許文献

- [0011] 特許文献1：特開2007-312821号公報
特許文献2：特開2008-237896号公報
特許文献3：特開2010-094476号公報
特許文献4：特開2012-20031号公報
特許文献5：特開2011-25002号公報
特許文献6：特許4392855号公報

非特許文献

- [0012] 非特許文献1：循環器病研究の進歩 Vol. XXX No.1 2009
非特許文献2：Yamanami et al., Circulation 2010;122;S100-S106
非特許文献3：人工臓器38巻3号2009年168-172頁
非特許文献4：Nishida et al., N Engl J Med 351;12; 2004; 1187-1196

発明の概要

発明が解決しようとする課題

- [0013] 本発明は生体内組織形成技術において、所望の細胞もしくは所望の細胞に類似の機能を有する細胞を含む生体組織からなる移植用組織体を形成させるための方法、並びに当該方法に用いられる移植用人工組織体製造用鋳型基材を提供することを目的とする。

課題を解決するための手段

- [0014] 本発明は、所望の細胞、所望の細胞の代替となる細胞もしくは所望の細胞へ分化する能力を有する細胞を基材表面から外部へ侵出可能なように保持させ得る鋳型基材であって、所望の細胞、所望の細胞の代替となる細胞もしくは所望の細胞へ分化する能力を有する細胞を保持させた該鋳型基材を生体組織の存在する環境下に置くことによって、該鋳型基材を該所望の細胞もしくは

は所望の細胞に類似の機能を有する細胞を含む生体由来組織にて被覆させ、次いで被覆された鋳型基材より鋳型基材を取り除くことによって移植用人工組織体を製造するために用いられる、移植用人工組織体製造用鋳型基材を提供する。

[0015] 本発明はまた、

(1) 上記鋳型基材へ、所望の細胞、所望の細胞の代替となる細胞もしくは所望の細胞へ分化する能力を有する細胞を保持させる工程、

(2) 細胞を保持させた鋳型基材を、生体組織材料の存在する環境下に置く工程、

(3) 生体組織材料の存在する環境から、生体組織で被覆された鋳型基材を取り出す工程、

(4) 生体組織で被覆された鋳型基材から、鋳型基材を取り除く工程を含む移植用人工組織体製造方法を提供する。

発明の効果

[0016] 本発明により、所望の細胞もしくは所望の細胞類似した機能を有する細胞を含む移植用組織体、例えば血管内皮細胞と平滑筋細胞を含む人工血管を提供することができる。本発明により、生体組織に近い細胞にて構成される移植用人工組織体を得ることができる。本発明により得られる移植用組織体は移植後速やかに所望の機能を発揮することができ、例えば人工血管の場合には血栓形成の危険性が低い、優れた移植用人工組織体を得ることができる。

図面の簡単な説明

[0017] [図1]実施例1にて用いた脂肪由来間質細胞の写真。

[図2]実施例に用いた中空鋳型基材（多孔性円筒型基材）。

[図3]実施例1にて得られた組織体の写真。

[図4]実施例1にて得られた組織体の膜厚を示すグラフ。

[図5]実施例1にて得られた組織体の断面、並びに該組織体の切片の写真。

[図6]実施例2にて得られた組織体の弾性率を示すグラフ。

[図7]実施例2にて得られた組織体の切片の写真。

[図8]実施例3にて用いたビーグル犬口腔粘膜上皮細胞の写真。

[図9]実施例3にて得られた管状組織体の切片の写真。

[図10]実施例4および5にて用いた中空鋳型基材の写真。

[図11]図10の中空鋳型基材へ血管片を封入した状態を示す写真（実施例4）。

[図12]実施例4にて得られた組織体の切片の写真。

[図13]図10の中空鋳型基材へ口腔粘膜組織を封入した状態を示す写真（実施例5）。

[図14]実施例5にて得られた組織体の切片の写真。

発明を実施するための形態

[0018] 本発明の鋳型基材は細胞を、基材表面から外部へ侵出可能なように保持させることができるよう形成されている。細胞は、鋳型基材中に分散包埋あるいは固定して保持させることができる。かかる態様においては、鋳型基材としては三次元細胞培養用足場材等の、細胞を保持可能でありかつ、一定の形状を保つことのできる材料が例示される。

[0019] 別の態様としては、細胞が基材表面から外部へ侵出可能な通路を有する中空鋳型基材であって、該中空鋳型基材の中空部分へ細胞を封入して用いられるものが例示される。

[0020] 中空鋳型基材の材料は、目的とする移植用組織体を形成させるための鋳型基材として所望の形状に成形でき、生体に埋入した際に大きく変形することが無い強度（硬度）を有しており、生体内で容易に分解されず、滅菌可能であり、生体を刺激する溶出物が無いまたは少ないものであれば特に限定されるものではない。

[0021] 好ましいものとしては、アクリル樹脂、オレフィン樹脂、スチレン樹脂、ポリエステル樹脂、ポリアミド樹脂、塩化ビニル樹脂、シリコン樹脂、フッ素樹脂、エポキシ樹脂、ポリカーボネート樹脂、ポリエチレン樹脂、ポリウレタン樹脂、ガラス、金属（チタン、プラチナ、ステンレス、及びSUS（ステンレス鋼（Stainless steel））等）等が挙げられる。材質は1種類に限

定される訳では無く、2種以上を組み合わせる用いることができる。

[0022] 一定の強度を有する点ではアクリル樹脂等が好ましく、製造が容易である点では、シリコン樹脂が好ましい。また、鑄型基材の形状が太さの均一な柱状等の単純な形状であって、形成された人工組織体の一部を切開すれば容易に鑄型基材を抜き出すことのできるものである場合には樹脂の硬度に特段の制限はない。形成される人工組織体の一部より鑄型基材を抜き出すのが困難な形状である場合には、鑄型基材の材料としては抜き出す際に押しつぶせるような柔らかな樹脂が好適に用いられる。また、基材を取り出しやすいよう、複数のパーツから基材を適宜組み合わせる用いて所望の形状の人工組織体を得てもよい。

[0023] 中空鑄型基材は、内部に保持した細胞が外側へ侵出できるよう外部との通路が設けられている。通路は限定的ではなく、例えば孔であってもスリットであってもよい。孔の形状やサイズ、スリットの長さや幅、並びにそれらの数は細胞が通過できるものであれば特に限定されるものではなく、内部に封入する細胞、あるいは内部へ細胞を封入する際の態様に応じて、適宜定めればよい。

[0024] 例えば中空基材へ孔を形成する場合には、孔の径は細胞が通過可能な口径 $10\mu\text{m}$ 以上であればよく、例えば 0.01mm 以上、加工の容易性から直径 0.1mm 以上の孔を有する中空基材が例示される。孔の口径の上限は特に限定的ではなく担持させた細胞が一気に流出するものでなければよい。中空鑄型基材中に支持基材、例えばマトリゲル（商標）などの市販のゲル状細胞支持基材等を封入して用いる場合は、例えば孔は例えば 5mm 程度まで、好ましくは 1mm 程度までの大きさであってもよい。

[0025] 孔の密度としては、例えば $1.5\text{cm} \times 1.5\text{cm}$ の正方形の板状中空基材の表面に $5 \sim 50$ 個 $\times 5 \sim 50$ 個、例えば 15×15 個の孔を空けた鑄型基材が例示される。

[0026] 本発明において、「所望の細胞」とは、人工組織体構成のために必要な細胞を意味する。例えば人工血管や弁付き人工血管等の循環器系組織体を製造

する場合には、所望の細胞としては血管内皮細胞並びに平滑筋細胞が挙げられる。人工角膜を製造する場合には、所望の細胞としては角膜上皮細胞が挙げられる。

[0027] 「所望の細胞の代替となる細胞」とは、所望の細胞と類似の機能を有する細胞であり、例えば血管内皮細胞や角膜上皮細胞等の上皮細胞の代替となる細胞としては口腔粘膜上皮細胞が例示される。口腔粘膜上皮細胞を培養してシート状にし、これを人工角膜として移植に用いることは既に臨床にて行われている（人工臓器 38 巻第 3 号 2009 年 168-172 頁）、Nishida et al., N Engl J Med 351;12; 2004; 1187-1196。

[0028] 「所望の細胞へ分化する能力を有する細胞」としてはかかる能力を有する細胞であれば特に限定されるものではない。体性幹細胞、iPS 細胞および ES 細胞などの分化万能性細胞などが例示される。体性幹細胞の中でも間葉系幹細胞は、脂肪細胞、線維芽細胞、間質細胞、心筋細胞、平滑筋細胞、内皮細胞、上皮細胞、骨芽細胞、軟骨細胞、神経細胞など様々な細胞への分化能を有している観点から所望の細胞へ分化する能力を有する細胞として好適に用いられる。間葉系幹細胞は、哺乳動物の骨髓液、末梢血、臍帯血、脂肪組織などから公知の方法で採取することが出来る。

[0029] 「所望の細胞と類似の機能を有する細胞」とは、所望の細胞の全ての機能と同等あるいは類似の機能を発揮しうるものみならず、移植用人工組織体として望ましい機能が所望の細胞と類似している細胞も含まれる。

[0030] 所望の細胞、所望の細胞の代替となる細胞または所望の細胞へ分化する能力を有する細胞としては、移植対象者より取得された細胞、移植対象者より取得された細胞の培養物、移植対象者の細胞より得られる万能性幹細胞等、移植対象者に由来する細胞を用いることが好ましい。移植対象者以外の者に由来する細胞を用いる場合、当該細胞のドナーは移植対象者と HLA の適合性が高い者であることが必要である。

[0031] 本発明の鋳型基材へ保持させる細胞としては、生体より得られた組織をそのまま、あるいは適当な形状へ加工して用いてもよいし、生体より分離した

組織の全体あるいは部分を分散させたものでもよい。また、生体より得られた組織を分散させて細胞を得、得られた細胞を常套法で処理して目的とする細胞を多く含む分画を用いても、目的とする細胞集団のみを単離したものをを用いてもよい。

[0032] 別の態様においては、上記のようにして生体より得られた細胞を培養した培養細胞を用いてもよい。また、公知の方法にて得られる i P S 細胞や E S 細胞を用いてもよい。

[0033] 一の態様において、所望の細胞、所望の細胞の代替となる細胞または所望の細胞へ分化する能力を有する細胞としては、ペレット状の凝集塊、生体より摘出された組織、培養によって得られた組織、およびこれらを部分的に分散させた状態のものを中空鋳型基材の中空部分へ封入してもよい。

[0034] 別の態様においては、中空鋳型基材の中空部分へ、細胞と細胞支持基材を封入してもよい。細胞は支持基材中に分散包埋されていても、固定されていてもよい。かかる態様に用いられる細胞支持基材としては、市販の三次元細胞培養用基材が用いられ、例えば細胞培養用コラーゲンゲル、B D マトリゲル（商標）、細胞培養用ゼラチン、寒天、ヒアルロン酸ハイドロゲルなどのムコ多糖類が例示される。

[0035] 市販の三次元細胞培養用基材を用いる場合には、添付される説明書に従って該三次元細胞培養用基材中に細胞が埋入、あるいは固定化されたものを中空鋳型基材の中空部分に保持させる。例えば、B D マトリゲル（商標）を用いる場合は、説明書に記載の手順で液状としたマトリゲルと細胞を混合し、これを基材の中空部分へ注入し、しばらく置くことによって、基材の中空部分内部でマトリゲルをゲル化させればよい。

[0036] 市販の細胞培養用基材は、細胞培養に適した環境を提供するものであり、三次元の足場並びに適当な増殖因子を含んでいるものが多い。本発明において、細胞を鋳型基材内へ保持する際に、適当な増殖因子を含む市販の細胞支持基材を採用してもよいし、細胞に応じた増殖因子を添加してもよい。添加する増殖因子としては、例えば人工血管などの循環器系人工組織体を製造す

る場合には血管内皮細胞増殖因子（VEGF）や繊維芽細胞増殖因子（bFGF）などの増殖因子に加えて、血管壁細胞に分化させる目的の分化誘導因子などを添加することが例示される。保持する細胞並びに目的とする組織に応じて増殖因子を適宜選択し、組み合わせて用いればよい。

[0037] 細胞支持基材としてはまた、止血用フィブリン糊のごとき血液由来のゲル状物質を用いてもよく、あるいは細胞支持基材として血液（全血）を用い、細胞と血液を混合して中空基材の中空部へ封入して用いてもよい。血液を用いる場合には、血液と、細胞を混合し、そのまま中空鑄型基材へ注入してしばらく置くと、血液が凝固し、細胞が凝固した血中に分散された形で保持される。血液を用いる場合には、保持される細胞が由来した生体より取得した血液が好適に用いられる。

[0038] 本発明はまた、上記のような中空鑄型基材と、細胞支持基材とを含むキットを提供する。

[0039] 本発明において、鑄型基材の形状は目的とする人工組織体の形状に合うよう設計すればよく、例えば管状組織体を得るためには柱状の、膜状組織体を得るためには板状の形状とするか、柱状の鑄型基材により得られる管状組織を切開して用いればよい。例えば人工血管を製造する場合には、円柱状鑄型基材とし、その外径により血管の太さが決定されることから目的の太さ並びに長さによって直径および長さを設計すればよい。

[0040] また、柱状や膜状等の形状以外にも、所望の生体組織の形状に従って、球状、立方体状、直方体状等の他の形にしてもよい。

[0041] さらに特許文献5に記載のようなバルサルバ洞の形状を有する張り出し部位と三葉弁を有する弁付き人工血管を得るための基材としてもよい。かかる基材は（a）柱状部位、および（b）弁形成部位より構成される。

[0042] さらに別の態様としては、本発明の鑄型基材に体内へ留置するためのステントを被せ、ステントを内包した移植用人工組織体を得てもよい。本態様においては、細胞を保持させた鑄型基材の一部または全体にステントを被せたものを、生体組織の存在する環境下へ置く。ステントとしては、鑄型基材の

表面からの細胞の侵出を妨害しないものであれば従来用いられている材質、形状のものが何れも好適に用いられる。ステントの材質としては、例えば、ニッケルチタン合金、コバルトクロム合金、ステンレス、鉄、チタン、アルミニウム、スズ、亜鉛タングステン合金などが挙げられる。これらのなかでも、ステントとして実績があるニッケルチタン合金またはSUS316L等のステンレスが好ましい。

[0043] 本発明の鋳型基材は、細胞を保持させて生体組織材料の存在する環境下に置くことによって、移植用人工組織体を製造するために用いられる。本発明はまた、本発明の鋳型基材を用いて移植用人工組織体を製造する方法を提供する。

[0044] 本発明の鋳型基材へ保持させる細胞の数は限定的でなく、保持させる細胞の種類、細胞支持基材を用いる、細胞や組織をそのまま用いる等の細胞保持の態様、後述する生体組織材料の存在する環境、所望する人工組織体の構成等に応じて最適化すればよい。

[0045] 生体組織材料の存在する環境下とは、動物の生体内、および生体組織材料、例えば細胞が浮遊する培養液等の人工環境が例示される。

[0046] 動物の生体内にて人工組織体を製造する場合、細胞を保持させた鋳型基材を生体内へ埋入する。埋入する対象は、移植を受ける対象と同種の動物であることが好ましい。また、埋入する対象は移植用人工組織体の移植を受ける対象と同一であっても異なってもよい。移植を受ける対象と異なる対象へ埋入する場合、両者のHLA型が適合している等、移植を受けた際に免疫反応を惹起しにくい対象に埋入することが好ましい。免疫反応惹起が無いことから、移植を受ける対象の体内へ埋入することが好ましい。

[0047] 動物の生体内へ鋳型基材を埋入する場合、埋入する部位としては生体の活動に影響が少ない部位を選ばよく、四肢部、腰部、背部や腹部などの皮下、および腹腔内が例示されるがこれらに限定されない。埋入は適宜麻酔を施し、切開を最小限とし、可能な限り低侵襲な方法にて行うことが好ましい。

[0048] 本発明の鋳型基材を人工環境である生体組織材料の存在する環境下へ置く

場合には、適当な培地中に生体材料、例えば細胞を分散させたものを用いればよい。培地中には組織体形成を促進するための増殖因子等を適宜添加しても良い。培養条件を整え、無菌下で培養を行えばよい。

[0049] 本発明の細胞を保持させた鋳型基材を生体組織材料の存在する環境下に置くことにより、鋳型基材の周囲に組織体のカプセルが形成される。本発明の細胞を保持させた鋳型基材を生体組織材料の存在する環境下へ置く期間は限定的ではなく、生体内に埋入する場合は埋入する動物、その年齢、健康状態、埋入部位等、所望の細胞、所望の細胞の代替となる細胞あるいは所望の細胞に分化しうる細胞の種類、基材のサイズ、目的とする組織体の厚み、目的とする細胞の密度等によって適宜決定すればよい。例えば、哺乳動物の生体内へ本発明の細胞を保持させた鋳型基材を埋入する場合には、1～8週間、好適には2～6週間程度の期間置けばよい。

[0050] 次いで生体組織材料の存在する環境下から、生体組織に覆われた鋳型基材を取り出す。生体内に鋳型基材を埋入した場合であっても、生体組織は生体組織を覆うようにカプセル状に形成され、容易に周囲の組織より剥離して取り出すことができる。次いで鋳型基材の周囲に形成された組織体より、鋳型基材を取り出す。鋳型基材の取り出しは、例えば管状組織であれば一端または両端を切断して基材を抜き出せばよい。鋳型基材が柔らかい樹脂で材料にて形成されている場合には、鋳型基材を押しつぶすようにして抜き出してもよい。

[0051] 従来の鋳型基材により形成される人工組織体は主にコラーゲン、繊維芽細胞などの繊維性の結合組織体により構成され、その他の細胞があまり含まれないが、本発明の基材によれば、所望の細胞または所望の細胞に類似する機能を有する細胞を含む移植用人工組織体が得られる。例えば、鋳型基材へ間葉系幹細胞を基材表面より侵出するように保持させた鋳型基材を生体内へ埋入した場合、得られる組織体はコラーゲン、繊維芽細胞などの結合組織体を主体とするが、基材表面と接する部分が内皮細胞で覆われ、組織体内部には平滑筋細胞が含まれる態様の組織体が形成される。かかる組織体を管状製造

すれば、例えば人工血管として好適に用いられる。

[0052] また、鋳型基材へ口腔粘膜上皮細胞を基材表面より侵出するように保持させた鋳型基材を生体内へ埋入した場合、得られる組織体の基材表面と接する部分は口腔粘膜上皮細胞由来の細胞層が形成され、その外側に繊維芽細胞層が形成される。かかる組織体を膜状に形成することにより、人工角膜として用い得る組織体を得ることができる。かかる人工角膜は角膜上皮と角膜実質を切除した後へ移植する表層または深層角膜移植手術に好適に用いることができる。

[0053] また、本発明の細胞を保持させた鋳型基材を用いた場合、細胞を担持させない以外は同一の基材を用いた場合より、高膜厚の組織体を得ることができる。

[0054] 本発明の細胞を保持させた鋳型基材は最も好適には、得られる人工組織体の移植を受ける対象と同一の対象の体内に埋入して人工組織体を製造する。かかる態様を用いることにより、免疫反応がなく、生体適合性に優れ、移植後に体内で成長でき、細胞の採取や培養、無菌室管理等の必要がないなどの利点を得られる。そして、得られた移植用人工組織体は本人由来の細胞を含んでおり、移植後早期に定着し、機能することが期待される。

[0055] 上記のようにして得られる人工組織体は、適宜トリミングして所望の形状とした後、対象への移植に用いることができる。

以下実施例により本願発明を更に詳細に説明する。

実施例 1

[0056] 皮下から採取した脂肪より脂肪由来間質細胞を分離して、それを基材から侵出させた例

(細胞の分離と培養)

生後10週目のWister Rat (雄、体重300 g) の後肢部皮下から約1 gの脂肪組織を採取し、0.1%のコラゲナーゼタイプI溶液(無血清のDMEM溶液に溶解)に懸濁し、37℃で1時間振とうすることで細胞懸濁液を得た。この細胞懸濁液を37℃、5% CO₂雰囲気下にて1週間培養して、培養皿に接着した繊維芽状の

形態を有する細胞を脂肪由来間質細胞 (Adipose-derived stromal cells: ADSC) として得た (図 1)。脂肪由来間質細胞は、間葉系細胞の一種として知られている細胞である。

[0057] (鋳型基材の作製)

直径 0.5 mm の微細孔を 180 個有するアクリル製の多孔性円筒型基材 (口径: 5 mm, 長さ: 2.4 cm、両端に蓋付き) を、3次元光造形機 (Projet HD3000) を用いて作製した (図 2)。

[0058] (細胞並びに細胞支持基材を充填した鋳型基材の皮下への埋入)

片端に蓋をした先の円筒基材内にマトリゲル (BD, 11715) 中に懸濁した 9.0×10^6 cells/ml の濃度の ADSC の懸濁液を 333 μ l (それぞれ基材あたり 3.0×10^6 cells となる) 流し込んだ後、もう一方の端に蓋をし、37°C のインキュベーター内で 15 分静置することでマトリゲルを完全にゲル化させた。15 分後、上述の ADSC の分離に用いた Wister Rat の後背部皮下結合組織内に作製した間隙に基材を埋入した。また、比較例として ADSC を含まないマトリゲルのみを充填した基材を同様の方法で同一のラットに埋入した。実験は各実験群で 5 匹のラットを用いて行った。

[0059] ここで BD マトリゲル (商標) は、細胞外マトリックスタンパク質に富む Engelbreth Holm Swarn (EHS) マウス肉腫から抽出された可溶性基底膜調製品であり、ラミニン、コラーゲン I V、エンタクチン、ヘパラン硫酸プロテオグリカン を主成分とする、室温にて重合してゲル状となる哺乳類の細胞基底膜と似た生物活性のあるマトリックスとなる製品である。増殖因子として、EGF、PDGF、IGF-1 および TGF β が含まれている。

[0060] (基材の摘出と組織観察)

埋入から 2 週間後、細胞に覆われた基材を皮下から摘出した。摘出された被覆基材の写真、管状の被覆組織体より基材を剥離して得た組織体の写真を図 3 に示す。また、ホルマリンにて 1 時間固定した後、中央辺りで輪切りにして壁厚の測定を行った。

[0061] ADSC 包埋マトリゲルを充填した基材を被覆する組織体の壁厚 (883 ± 122 μ

m) は、マトリゲルのみを充填した基材を被覆する組織体 ($137 \pm 31 \mu\text{m}$) の約6倍を示し、多孔性円筒基材からADSCを徐放することで高膜厚な組織が形成されることが分かった (図4)。

[0062] (組織学的分析)

得られた管状組織体を、4%パラホルムアルデヒドを含有するPBSに浸漬し一晩固定後、凍結し、凍結切片作製機 (クライオスタット) を用いて薄切片 (厚さ $8 \mu\text{m}$) を作製した。薄切片を風乾し、1%ウシ血清アルブミン (Sigma) を含有するPBSで1時間インキュベートした後、内皮細胞はIsolectin B4-FITC conjugate (1:200, Sigma) と1時間、平滑筋細胞は一次抗体としてマウス抗ラット α -SMAモノクローナル抗体 (1:100, Abcam) と1時間、二次抗体としてFITC標識抗マウスIgG抗体 (1:100, Santacruz) と1時間反応させることで染色した。観察結果を図5に示す。

[0063] マトリゲルのみを充填した基材から得られた管状組織体には内皮細胞および平滑筋細胞はほとんど認められなかったが、ADSC包埋マトリゲルを充填した基材から得られた管状組織体には内腔面にそって配向するように内皮細胞が、中間層付近に平滑筋細胞の存在が確認された (図5)。多孔性基材を用いてADSCを徐放することで血管構成細胞である内皮細胞および平滑筋細胞を有する管状組織体を得られた。

実施例 2

[0064] 皮下から採取した脂肪より脂肪由来血管構成細胞群を分離して、それを基材から侵出させた例

(細胞の分離)

ビーグル犬 (雌、体重10 kg) の腹部皮下から約3 gの脂肪組織を採取し、0.1%のコラゲナーゼタイプI溶液 (無血清のDMEM溶液に溶解) に懸濁し、37°Cで1時間振とうすることで脂肪組織を消化した。この消化液を1000 rpm、室温で5分間遠心し遠心管の底に沈降した細胞塊を脂肪由来血管構成細胞群 (Stromal Vessel Fraction: SVF) として得た。SVFは血管内皮細胞、平滑筋細胞に加え間葉系幹細胞を含む細胞群として知られる。

[0065] (鋳型基材の作製)

実施例1と同様の3次元光造形機を用いて直径0.5 mmの微細孔を324個有するアクリル製の多孔性円筒型基材(口径: 3 mm, 長さ: 4 cm)を作製した。

[0066] (細胞並びに細胞支持基材を充填した鋳型基材の皮下への埋入)

片端に蓋をした先の円筒基材内にマトリゲル(BD, 11715)中に懸濁したSVFの懸濁液を300 μ l流し込んだ後(基材あたり脂肪組織約1 gから得られたSVFを充填した)、もう一方の端に蓋をし37℃のインキュベーター内で15分静置することでマトリゲルを完全にゲル化させた。15分後、上述のSVFの分離に用いたビーグル犬の胸部左側の皮下結合組織内に作製した間隙に基材を埋入した。ここで、SVFを含まないネガティブコントロールとしてマトリゲルのみを充填した基材を同様の方法で同一のビーグル犬に埋入した。実験は一匹のビーグル犬を用いて行った。

[0067] (基材の摘出と組織観察)

埋入から2週間後、基材を皮下から摘出した。管状の被覆組織体を基材から剥離した後、組織の弾性率を短軸押し込み試験機(Yamaden)を用いて測定した。結果を図6に示す。SVF包埋マトリゲルを充填した基材を被覆する組織体の弾性率(2185 ± 384 kPa)はマトリゲルを充填した基材を被覆する組織体(1022 ± 178 kPa)の約2倍を示し、多孔性円筒基材からSVFを徐放することで高強度の組織体が形成されることが分かった。

[0068] (組織学的分析)

得られた管状組織体を4%パラホルムアルデヒドを含有するPBSに浸漬し一晚固定後、凍結し、凍結切片作製機(クライオスタット)を用いて薄切片(厚さ 8 μ m)を作製した。薄切片を風乾し、1%ウシ血清アルブミン(Sigma)を含有するPBSで1時間インキュベートした後、内皮細胞はIsolectin B4-FITC conjugate (1:200, Sigma)と1時間、平滑筋細胞は一次抗体としてマウス抗イヌ α -SMAモノクローナル抗体(1:100, Abcam)と1時間、二次抗体としてFITC標識抗マウスIgG抗体(1:100, Santacruz)と1時間反応させることで染色した。細胞核は、1 μ g/mlのDAPI(Roche)で染色した。観察結果を図7に

示す。

マトリゲルのみを充填した基材から得られた管状組織体には内皮細胞および平滑筋細胞はほとんど認められなかったが、SVF包埋マトリゲルを充填した基材から得られた管状組織体には内腔面にそって配向するように内皮細胞が、中間層付近に平滑筋細胞の存在が確認された（図7）。多孔性基材を用いてADSCを徐放することで血管構成細胞である内皮細胞および平滑筋細胞を有する管状組織体を得られることが分かった。

実施例 3

[0069] 口腔内から採取した口腔粘膜組織から口腔粘膜上皮細胞を分離して、それを基材から侵出させた例

（細胞の分離）

ビーグル犬（雌、体重10 kg）の口蓋から約0.5 gの口腔粘膜組織を採取し、0.5%のディスパーゼⅠ溶液（無血清のDMEM溶液に溶解）に懸濁し、37℃で1時間振とう後、1000 rpmで5分間遠心して遠心管の底に組織消化物を沈降させた。これを0.05%のトリプシン-EDTA溶液に再懸濁しさらに37℃で15分間振とうすることで細胞懸濁液を得た。この細胞懸濁液を37℃、5% CO₂雰囲気下にて3週間培養して、培養皿に接着した敷石状の形態を有する細胞を口腔粘膜上皮細胞（Oral Mucosal Epithelial Cells：OMECS）として得た（図8）。

[0070] （鋳型基材の作製）

実施例1と同様の3次元光造形機を用いて直径0.5 mmの微細孔を342個有するアクリル製の多孔性円筒型基材（口径：5 mm，長さ：3 cm）を作製した。

[0071] （細胞並びに細胞支持基材を充填した鋳型基材の皮下への埋入）

片端に蓋をした先の円筒基材内にマトリゲル（BD，11715）中に懸濁した 5.26×10^6 cells/mlの濃度のOMECS懸濁液を380 μ l流し込んだ後（基材あたり 2.0×10^6 cellsとなる）、もう一方の端に蓋をし37℃のインキュベーター内で15分静置することでマトリゲルを完全にゲル化させた。15分後、上述のOMECSの分離に用いたビーグル犬の胸部左側の皮下結合組織内に作製した間隙に基材を埋入した。実験は一匹のビーグル犬を用いて行った。

[0072] (基材の摘出と組織観察)

埋入から2週間後、基材を皮下から摘出し、得られた管状組織体を4%パラホルムアルデヒドを含有するPBSに浸漬し一晩固定、メタノールで脱水しパラフィンに包埋した後、ミクロトームを用いて薄切片（厚さ約10 μm ）を作製した。ヘマトキシリン・エオシン（HE）染色した薄切片の観察結果を図9に示す。

[0073] 得られた管状組織体の内腔表面に約50 μm の厚みの上皮細胞からなる層構造が認められた（図9）。多孔性基材を用いてOMECsを徐放することでコラーゲンと繊維芽細胞を主成分とする組織体の表面に上皮細胞層を導入できることが分かった。こうして得られた組織体は、既に臨床にて効果の確認されている口腔粘膜上皮細胞由来の細胞シートと同様、人工角膜として好適に用いられる。

実施例 4

[0074] 血管組織をそのまま鋳型基材に保持させて、血管細胞を侵出させた例
(組織の採取と加工)

ビーグル犬（雌、体重10 kg）の総頸動脈血管（長さ約1 cm）を採取し、これを長軸方向に切開し約1 cm×1 cmのシート状の血管片とした。

[0075] (鋳型基材の作製)

実施例1と同様の3次元光造形機を用いて、底面に口径約0.5 mmの微細孔を縦横に15個×15個、計225個有する正方形凹型基材（凹部分、1.5 cm×1.5 cm）およびその蓋となる正方形凸型基材（凸部分1.5 cm×1.5 cm）を作製した。凹凸の基材を組み合わせて、中空の鋳型基材となる。図10に作製した鋳型基材の写真を示す。

[0076] (組織を保持させた鋳型基材の皮下への埋入)

正方形凹型基材の中に先のシート状に加工した血管片を内腔表面（表面に内皮細胞層がある）が基材底面の微細孔に接する方向で入れ、その上から凸型基材をはめ込んだ（図11）。この基材をビーグル犬の胸部左側の皮下結合組織内に作製した間隙に埋入した。実験は一匹のビーグル犬を用いて行った

。

[0077] (基材の摘出と組織観察)

埋入から2週間後、基材を皮下から摘出し、得られた組織体を4%パラホルムアルデヒドを含有するPBSに浸漬し一晩固定後、凍結し、凍結切片作製機（クライオスタット）を用いて薄切片（厚さ8 μm ）を作製した。薄切片を風乾し、1%ウシ血清アルブミン（Sigma）を含有するPBSで1時間インキュベートした後、内皮細胞をIsolectin B4-FITC conjugate (1:200, Sigma) と1時間反応させることで染色した。一方で、薄切片をHE染色することで細胞を可視化した。

[0078] 得られた組織体は極めて高膜厚（膜厚：約2 mm）で、凹型基材との接触面側から多数の新生血管（図12、白矢印）を有する高細胞密度の層（内層、約0.5～1 mm）、およびその外側にコラーゲンが密で細胞成分が比較的少ない層（外層、約0.5～1 mm）の2層構造を有していた。また、コラーゲンを主成分とする外層には内皮細胞はほとんど認められなかったが、多数の新生血管と細胞成分に富む内層には内皮細胞が高密度に存在することが内皮細胞染色によって確認された。これは基材に挟み込んだ血管片由来の内皮細胞と思われる。多孔性の凹型基材と凸型基材の間に血管組織片を挟み込むことで従来のコラーゲンと繊維芽細胞を主成分とする組織体に多数の新生血管と内皮細胞を有する層を導入できることが分かった。

実施例 5

[0079] 口腔粘膜組織をそのまま基材に保持させて侵出させた例

(組織の採取)

ビーグル犬（雌、体重10 kg）の口蓋から口腔粘膜組織（約5 mm×5 mm）を採取した。

[0080] (組織を保持させた鋳型基材の皮下への埋入)

鋳型基材として実施例4で作製したものと同一形状、サイズの基材を用いた。正方形凹型基材の中に先の口腔粘膜組織片を表面の上皮細胞層が基材底面の微細孔に接するように入れ、その上から凸型基材をはめ込んだ（図13）。

この基材をビーグル犬の胸部左側の皮下結合組織内に作製した間隙に埋入した。実験は一匹のビーグル犬を用いて行った。

[0081] (基材の摘出と組織観察)

埋入から2週間後、基材を皮下から摘出し、得られた管状組織体を4%パラホルムアルデヒドを含有するPBSに浸漬し一晩固定、メタノールで脱水しパラフィンに包埋した後、ミクロトームを用いて薄切片（厚さ約10 μm ）を作製した。HE染色した薄切片の観察結果を図14に示す。

得られた組織体の表面（凹型基材との接触面）に約50 μm の厚みの上皮細胞からなる層構造が認められた（図14）。多孔性の凹型基材と凸型基材の間に口腔粘膜組織片を挟み込むことでコラーゲンと繊維芽細胞を主成分とする組織体の表面に口腔粘膜組織由来の上皮細胞層を導入できることが分かった。こうして得られた組織体は、既に臨床にて効果の確認されている口腔粘膜上皮細胞由来の細胞シートと同様、人工角膜として好適に用いられる。

請求の範囲

- [請求項1] 所望の細胞、所望の細胞の代替となる細胞もしくは所望の細胞へ分化する能力を有する細胞を基材表面から外部へ侵出可能なように担持し得る鋳型基材であって、所望の細胞、所望の細胞の代替となる細胞もしくは所望の細胞へ分化する能力を有する細胞を担持させた該鋳型基材を生体組織の存在する環境下に置くことによって、該鋳型基材を該所望の細胞もしくは所望の細胞と類似の機能を有する細胞を含む生体由来組織にて被覆させ、次いで該鋳型基材を取り除くことによって移植用人工組織体を製造するために用いられる、移植用人工組織体製造用鋳型基材。
- [請求項2] 生体組織の存在する環境が、哺乳動物の生体内である、請求項1記載の鋳型基材。
- [請求項3] 哺乳動物が、移植用人工組織体を移植する対象である、請求項2記載の鋳型基材。
- [請求項4] 所望の細胞が上皮細胞を含む、請求項1～3いずれかに記載の鋳型基材。
- [請求項5] 所望の細胞へ分化し得る細胞が、間葉系幹細胞、iPS細胞、ES細胞からなる群から選択される、請求項1～3何れかに記載の鋳型基材。
- [請求項6] 所望の細胞、所望の細胞の代替となる細胞もしくは所望の細胞へ分化する能力を有する細胞が、該移植用人工組織体を移植する対象より取得された細胞、あるいは該細胞より誘導された細胞である、請求項1～5何れかに記載の鋳型基材。
- [請求項7] 柱状である、請求項1～6何れかに記載の鋳型基材。
- [請求項8] 板状である、請求項1～6何れかに記載の鋳型基材。
- [請求項9] (a) 柱状部位、および
(b) 弁形成部位、
を有し、移植用人工組織体が弁付人工血管である、請求項1～6いず

れかに記載の鋳型基材。

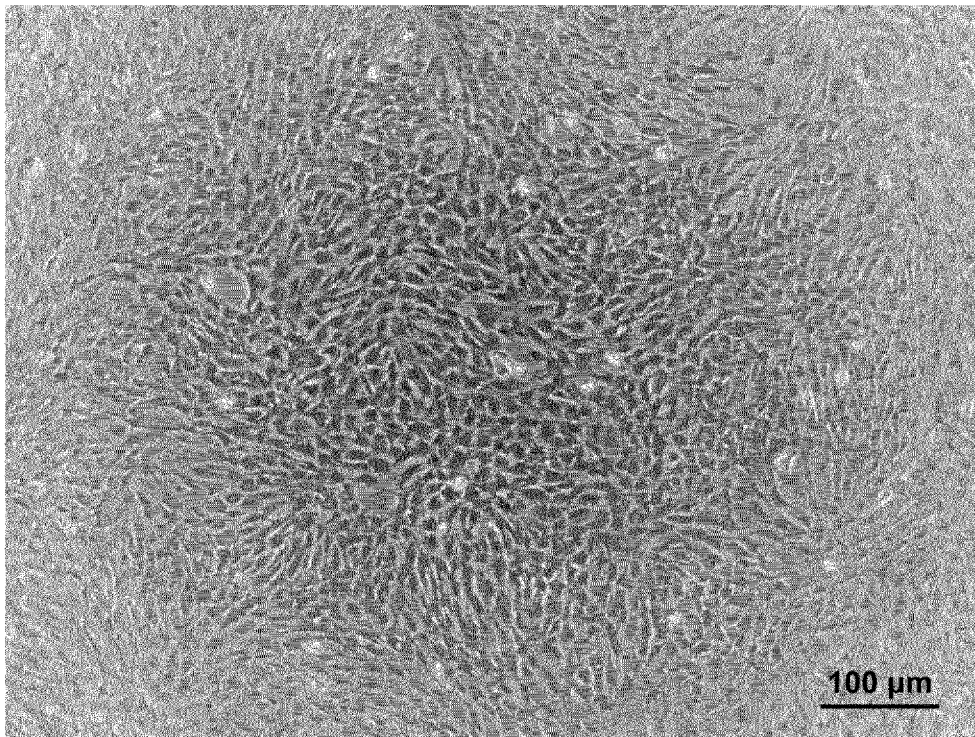
[請求項10] 鋳型基材が、中空部分へ所望の細胞、所望の細胞の代替となる細胞もしくは所望の細胞へ分化しうる細胞を封入して用いられる中空の基材であり、該中空部分へ封入された細胞が基材表面より侵出可能な通路を有している請求項1～9何れかに記載の鋳型基材。

[請求項11] 中空部分へ細胞並びに細胞支持基材を封入して用いられる、請求項10記載の鋳型基材。

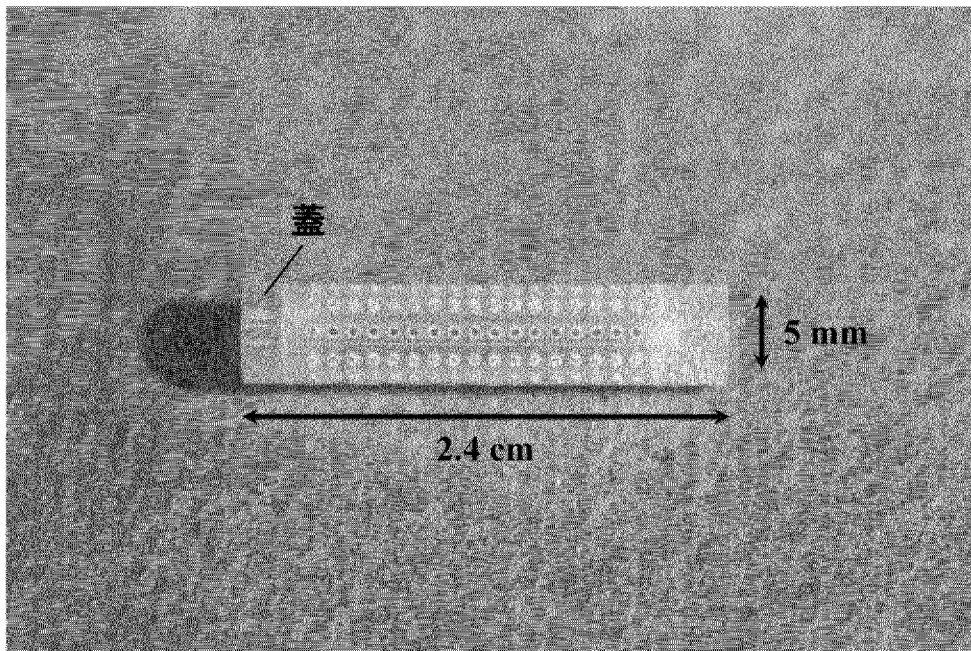
[請求項12] (1) 請求項11記載の中空鋳型基材、および
(2) 細胞支持基材
を含む、移植用人工組織体製造用キット。

[請求項13] (1) 請求項1～10いずれかに記載の鋳型基材へ、所望の細胞、所望の細胞の代替となる細胞もしくは所望の細胞へ分化する能力を有する細胞を保持させる工程、
(2) 細胞を保持させた鋳型基材を、生体組織材料の存在する環境下に置く工程、
(3) 生体組織材料の存在する環境から、生体組織で被覆された鋳型基材を取り出す工程、
(4) 生体組織で被覆された鋳型基材から、鋳型基材を取り出す工程を含む移植用人工組織体製造方法。

[図1]

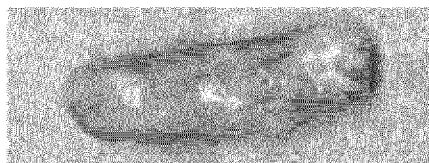
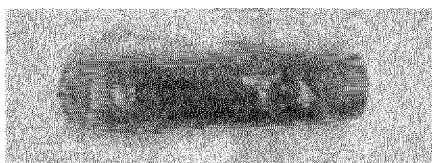


[図2]

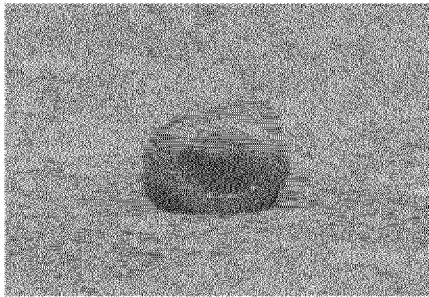
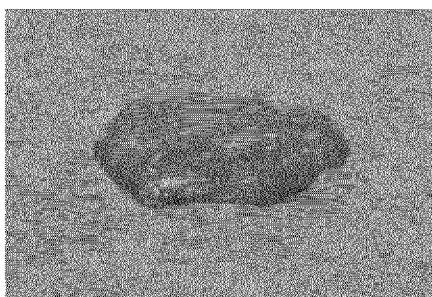


[図3]

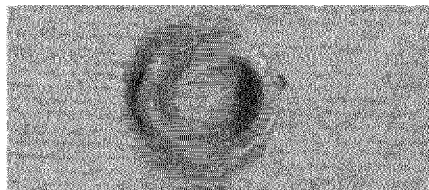
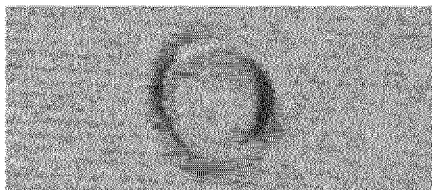
摘出直後の
被覆された
鋳型基材



鋳型基材取
り除き後



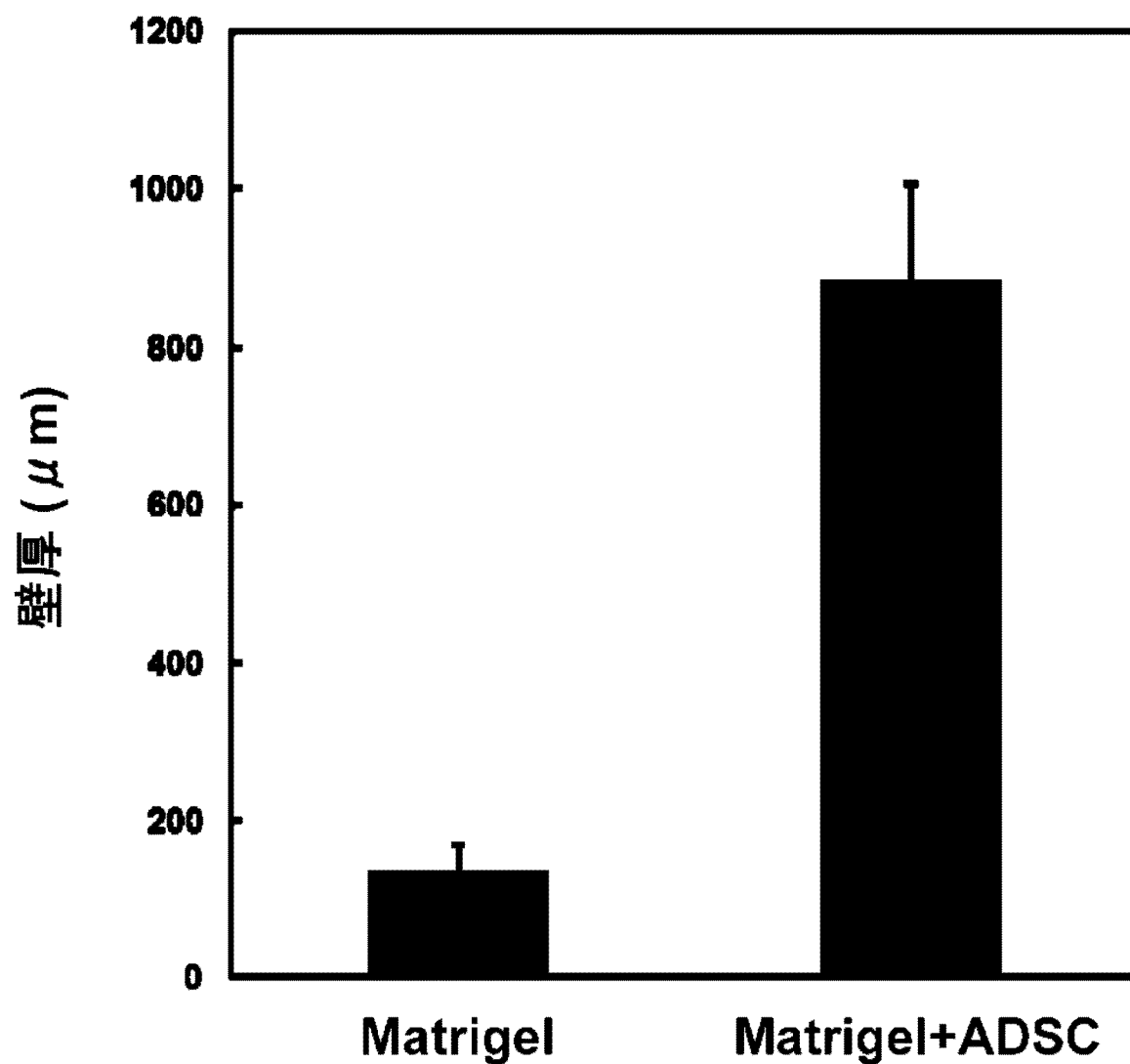
ホルマリンに
て1時間固
定、輪切



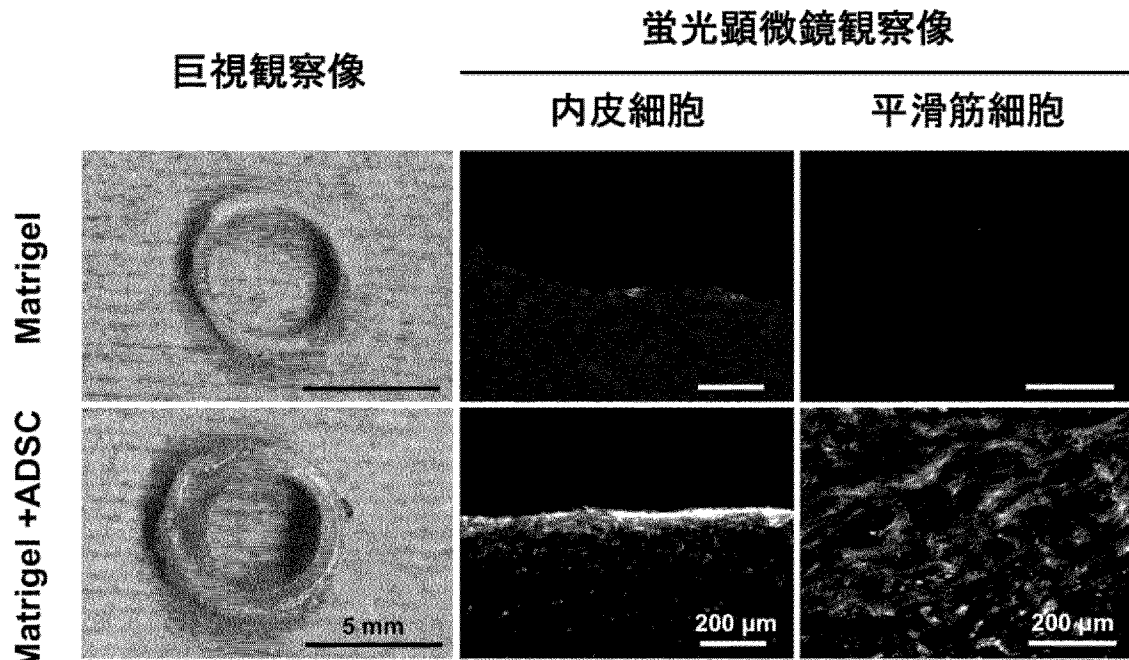
Matrigel

Matrigel +ADSC

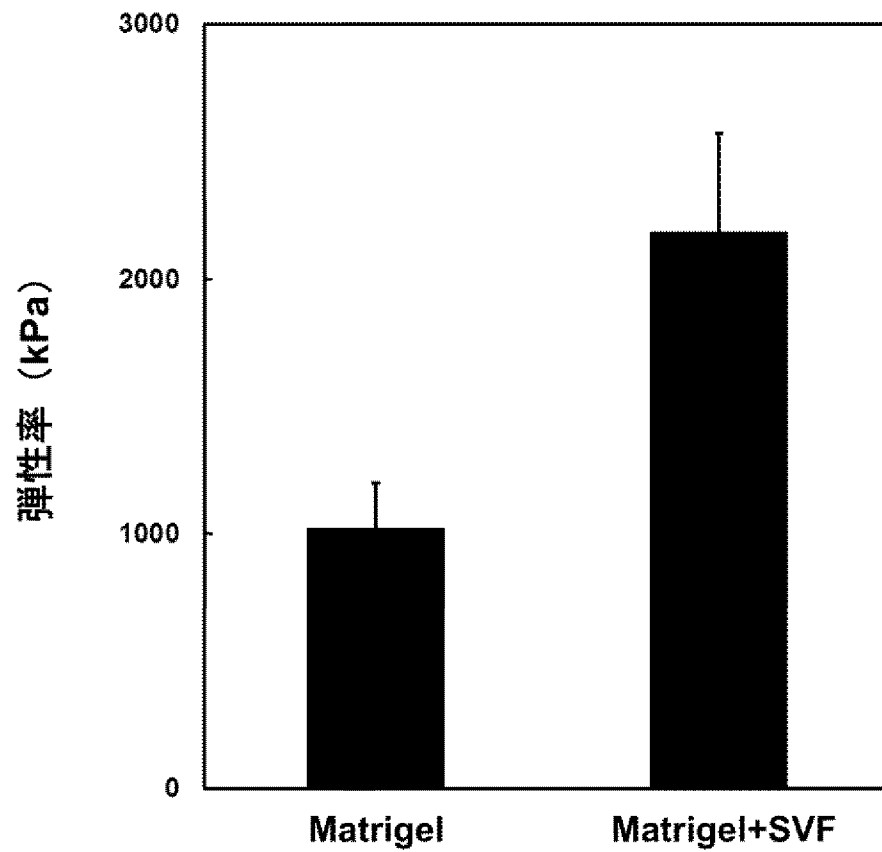
[図4]



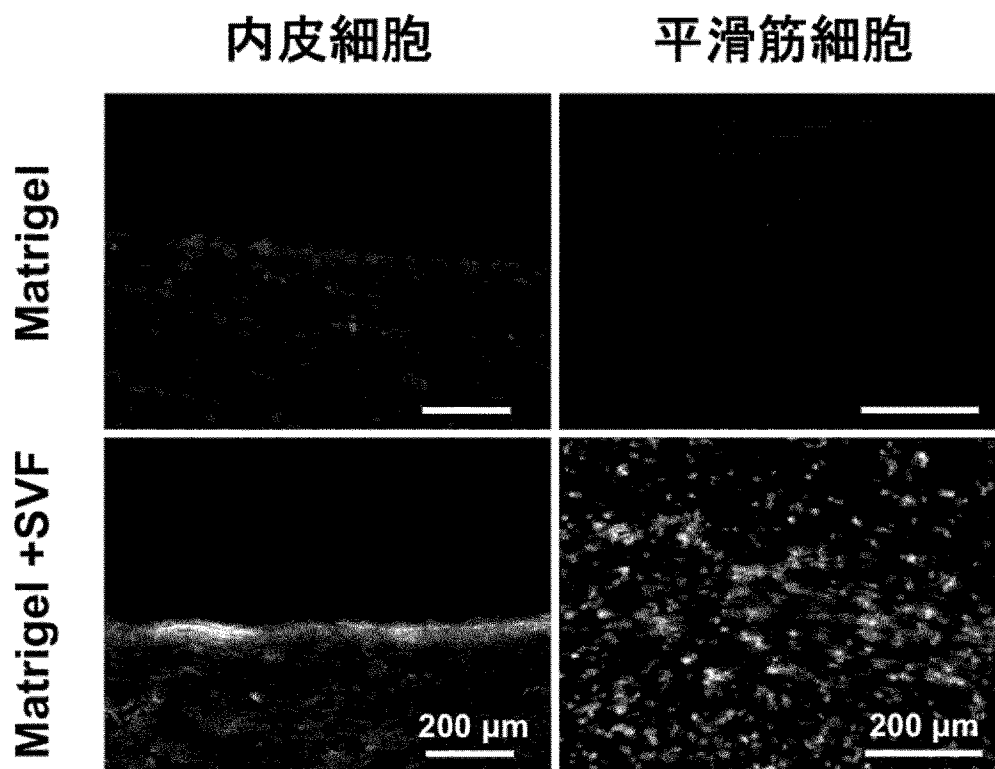
[図5]



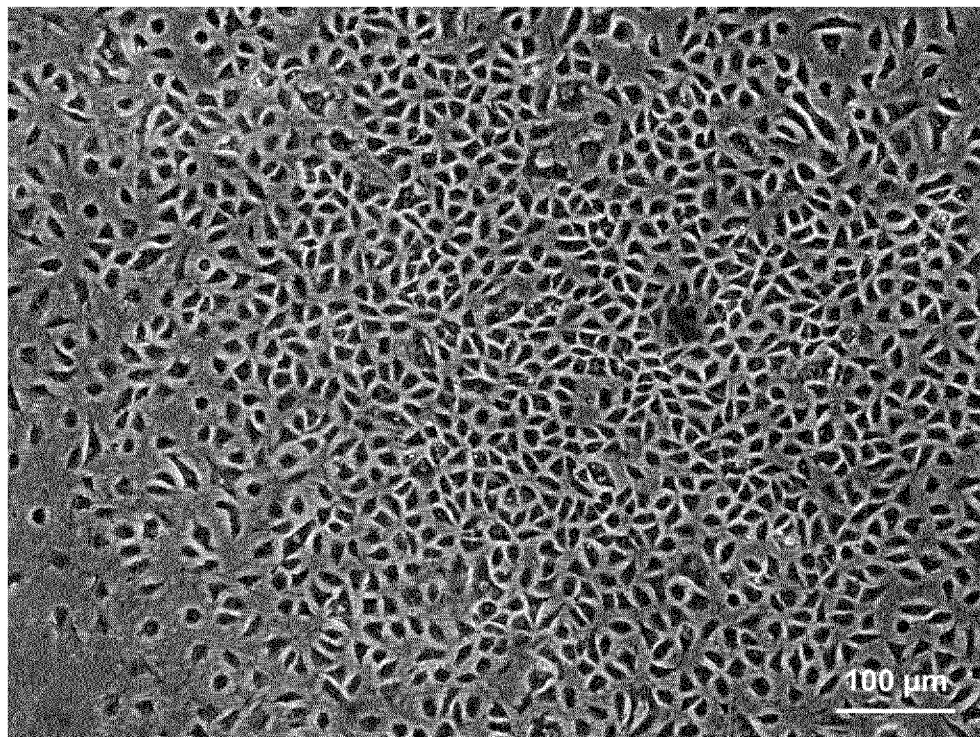
[図6]



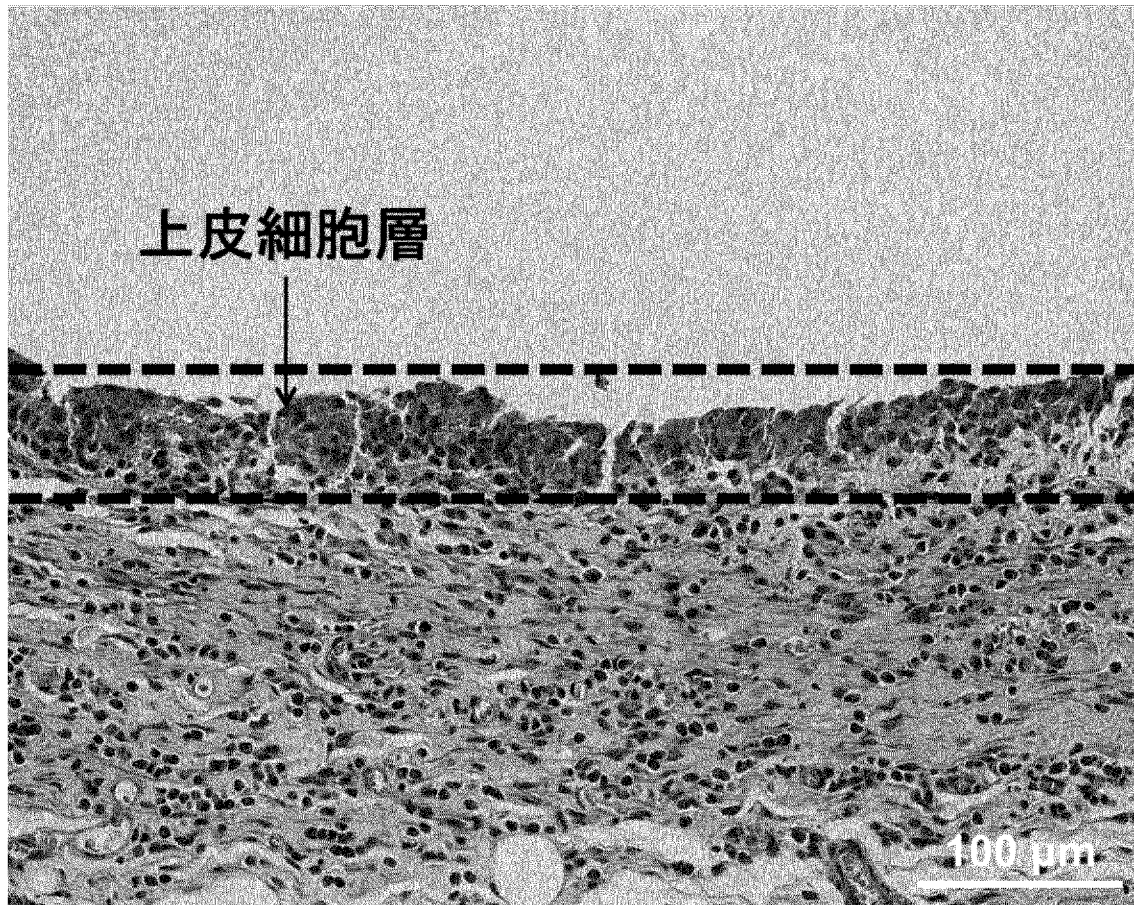
[図7]



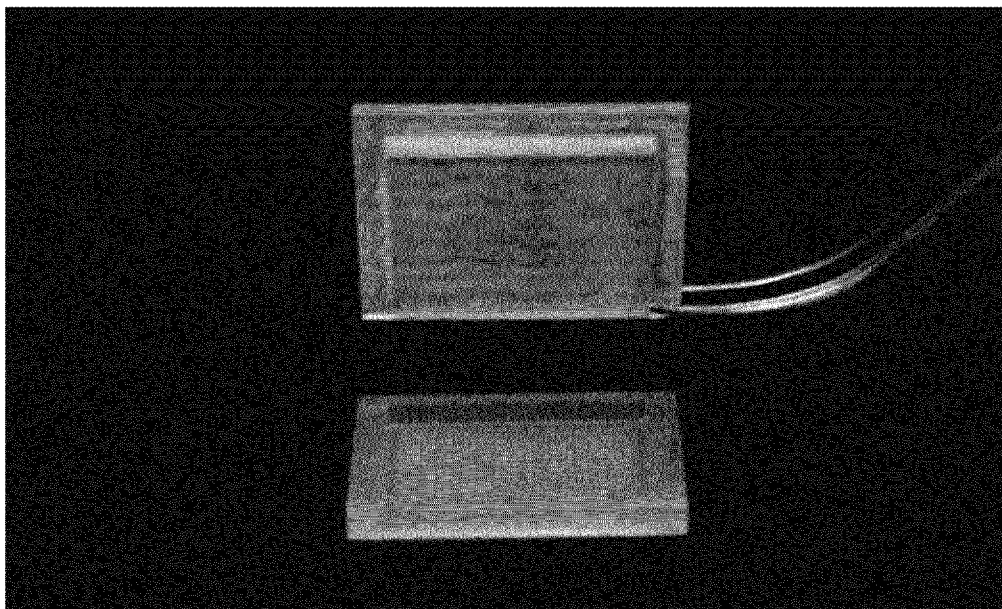
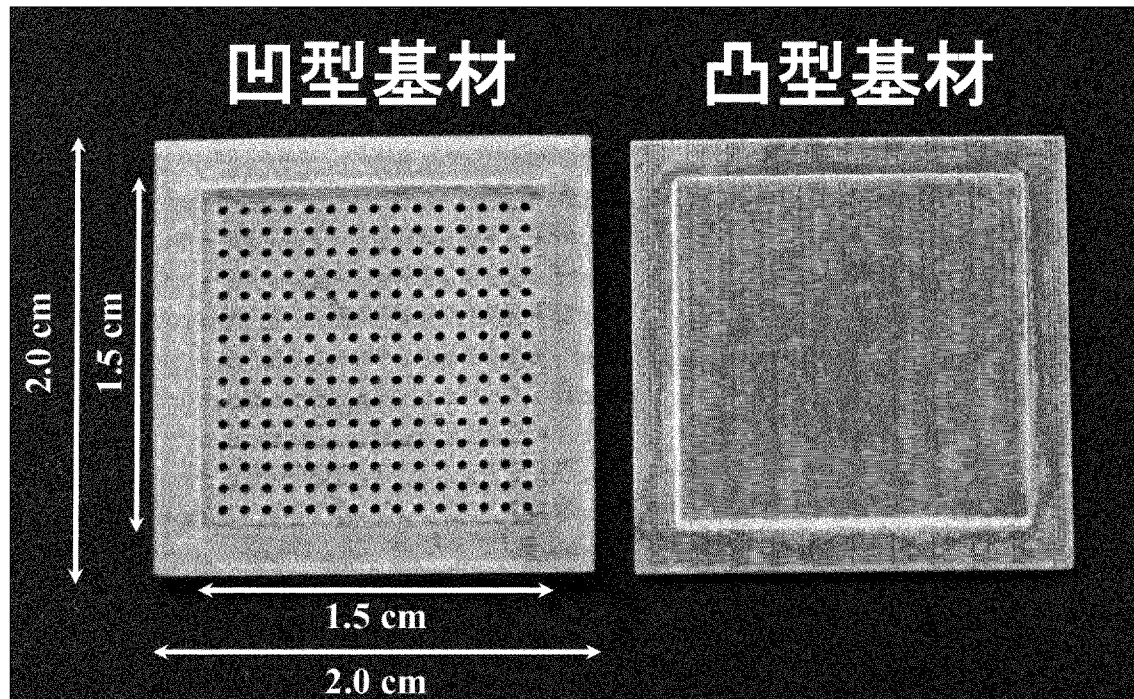
[図8]



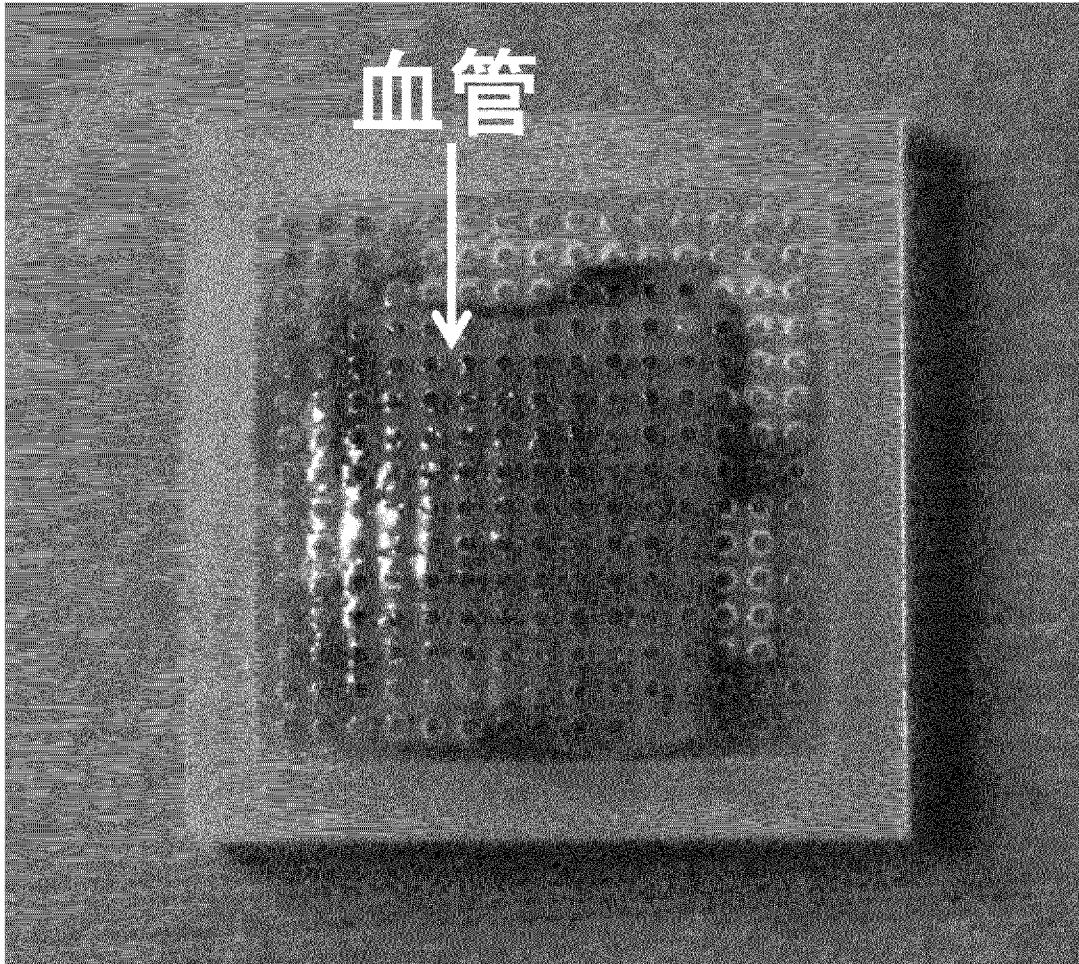
[図9]



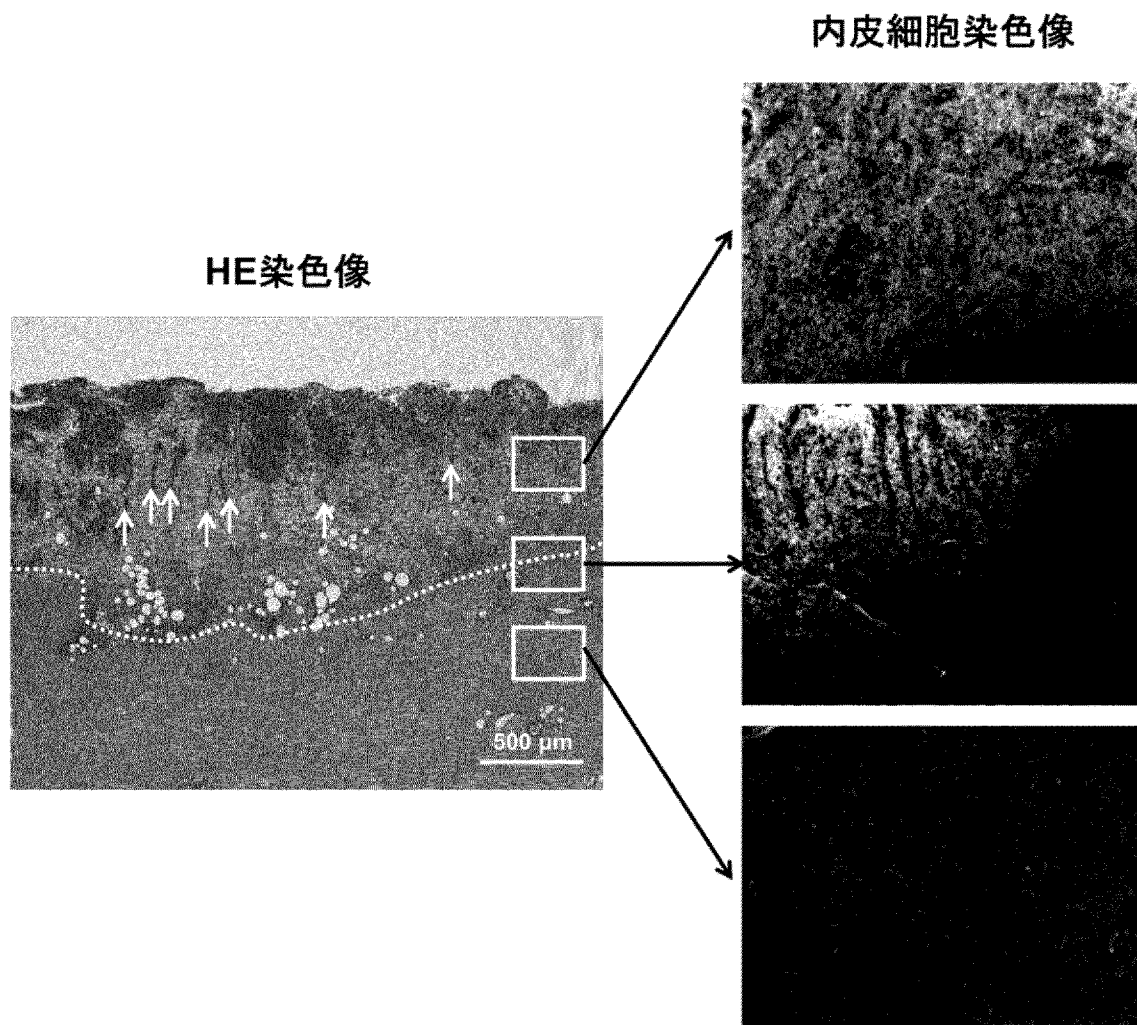
[図10]



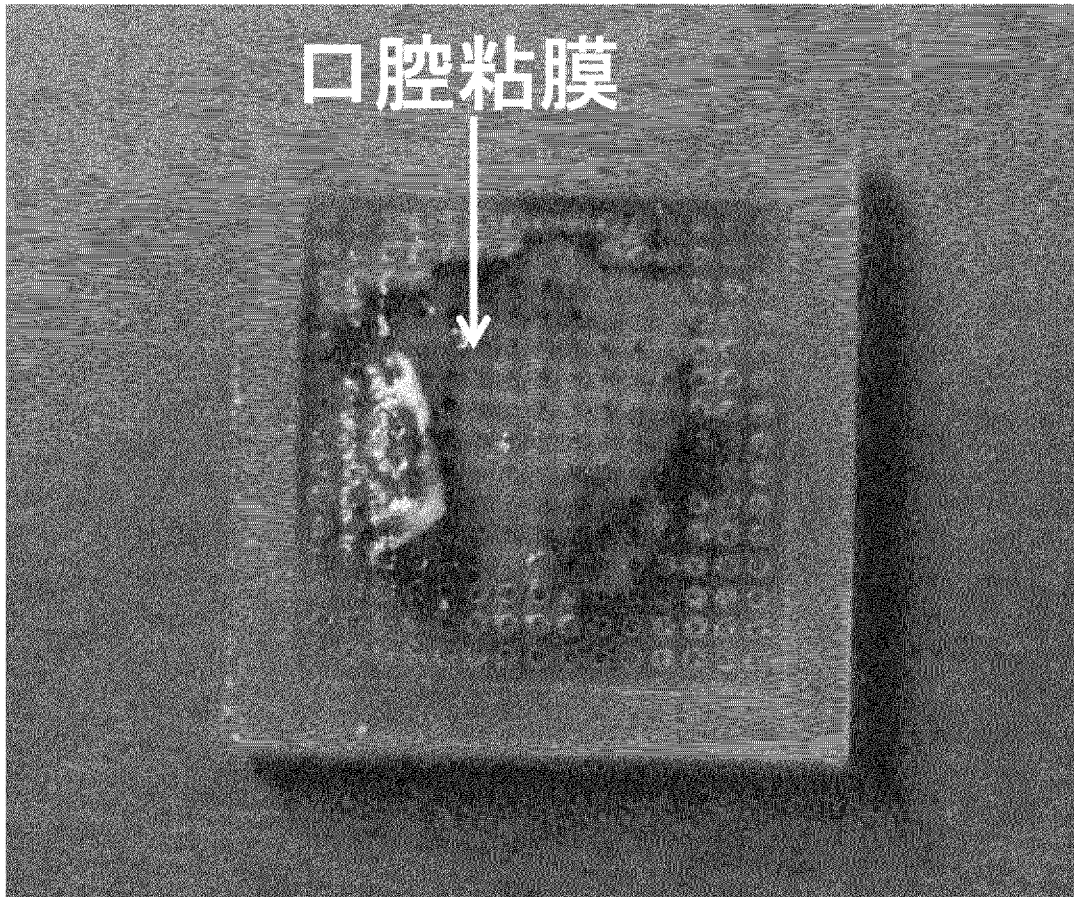
[図11]



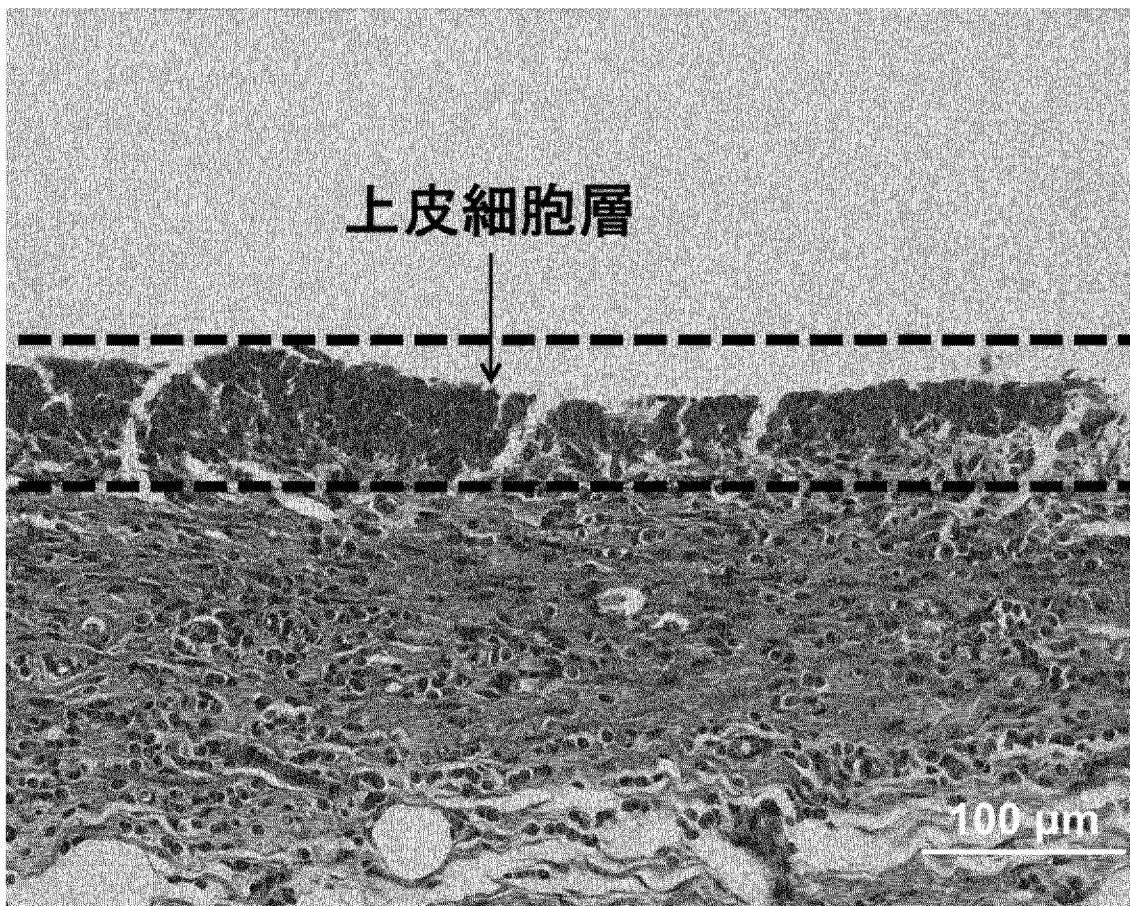
[図12]



[図13]



[図14]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2013/064082

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C12M3/00(2006.01)i, A61F2/06(2013.01)i, C12N5/071(2010.01)i, C12N5/0735(2010.01)i, C12N5/0775(2010.01)i, C12N5/10(2006.01)i

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)

C12M3/00, A61F2/06, C12N5/071, C12N5/0735, C12N5/0775, C12N5/10

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Jitsuyo Shinan Koho	1922-1996	Jitsuyo Shinan Toroku Koho	1996-2013
Kokai Jitsuyo Shinan Koho	1971-2013	Toroku Jitsuyo Shinan Koho	1994-2013

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

CAPLUS/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS (STN), JSTPLUS/JMEDPLUS/JST7580 (JDreamIII), PubMed

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X/Y	JP 2007-143833 A (President of National Cardiovascular Center), 14 June 2007 (14.06.2007), entire text (Family: none)	1-7/8-13
X/Y	JP 2007-068879 A (President of National Cardiovascular Center), 22 March 2007 (22.03.2007), entire text (Family: none)	1-7/8-13
Y	JP 2011-025002 A (Japan Health Sciences Foundation), 10 February 2011 (10.02.2011), entire text (Family: none)	1-13

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☐ See patent family annex.

* 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
02 August, 2013 (02.08.13)

Date of mailing of the international search report
13 August, 2013 (13.08.13)

Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (I P C))

Int.Cl. C12M3/00(2006.01)i, A61F2/06(2013.01)i, C12N5/071(2010.01)i, C12N5/0735(2010.01)i,
C12N5/0775(2010.01)i, C12N5/10(2006.01)i

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 (I P C))

Int.Cl. C12M3/00, A61F2/06, C12N5/071, C12N5/0735, C12N5/0775, C12N5/10

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

日本国実用新案公報	1 9 2 2 - 1 9 9 6 年
日本国公開実用新案公報	1 9 7 1 - 2 0 1 3 年
日本国実用新案登録公報	1 9 9 6 - 2 0 1 3 年
日本国登録実用新案公報	1 9 9 4 - 2 0 1 3 年

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

CAplus/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS(STN), JSTplus/JMEDplus/JST7580(JDreamIII), PubMed

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 請求項の番号
X / Y	JP 2007-143833 A (国立循環器病センター総長) 2007.06.14, 全文 (ファミリーなし)	1 - 7 / 8 - 1 3
X / Y	JP 2007-068879 A (国立循環器病センター総長) 2007.03.22, 全文 (ファミリーなし)	1 - 7 / 8 - 1 3

☒ 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

0 2 . 0 8 . 2 0 1 3

国際調査報告の発送日

1 3 . 0 8 . 2 0 1 3

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (I S A / J P)
郵便番号 1 0 0 - 8 9 1 5
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)

福澤 洋光

電話番号 0 3 - 3 5 8 1 - 1 1 0 1 内線 3 4 4 8

4 B

3 9 6 3

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 請求項の番号
Y	JP 2011-025002 A (財団法人ヒューマンサイエンス振興財団) 2011.02.10, 全文 (ファミリーなし)	1 - 1 3