

(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
2018年12月6日(06.12.2018)



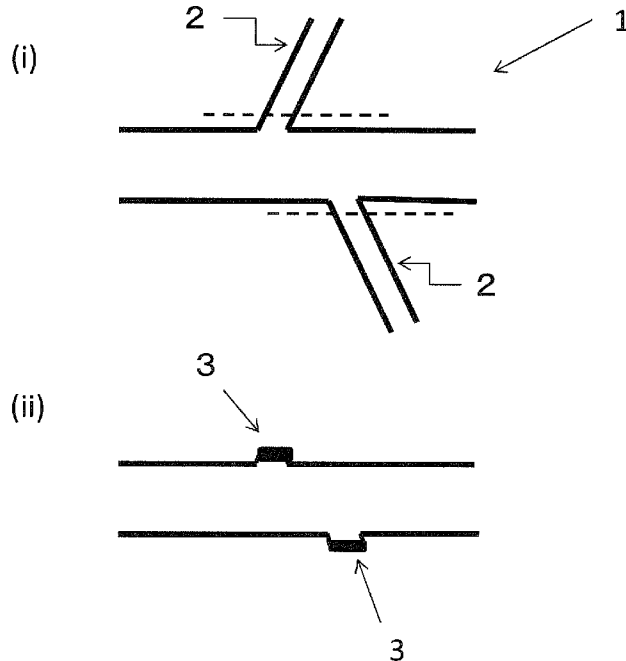
(10) 国際公開番号
WO 2018/221402 A1

- (51) 国際特許分類：
A61L 27/36 (2006.01) A61F 2/06 (2013.01)
- (21) 国際出願番号： PCT/JP2018/020141
- (22) 国際出願日： 2018年5月25日(25.05.2018)
- (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 2017-106400 2017年5月30日(30.05.2017) JP
- (72) 発明者；および
- (71) 出願人：樋上 哲哉 (HIGAMI, Tetsuya) [JP/JP]；
〒6550853 兵庫県神戸市垂水区つつじが丘5
丁目1438-78 Hyogo (JP).
- (72) 発明者：日渡 謙一郎 (HIWATARI, Kenichiro)；
〒1168554 東京都荒川区東尾久七丁目2番35
号 株式会社A D E K A内 Tokyo (JP). 山口 雄
(YAMAGUCHI, Yu)；〒1168554 東京都荒川区
東尾久七丁目2番35号 株式会社A D E K
A内 Tokyo (JP). 小原 春樹(OBARA, Haruki)；
〒1168554 東京都荒川区東尾久七丁目2番3
5号 株式会社A D E K A内 Tokyo (JP). 木
村 拓矢(KIMURA, Takuya)；〒1168554 東京都
荒川区東尾久七丁目2番35号 株式会社A
D E K A内 Tokyo (JP). 本間 光将(HOMMA,
Mitsumasa)；〒1168554 東京都荒川区東尾久七
丁目2番35号 株式会社A D E K A内 Tokyo
(JP). 落合 恭平(OCHIAI, Kyohei)；〒1168554
東京都荒川区東尾久七丁目2番35号 株

(54) Title: METHOD FOR PRODUCING DECELLULARIZED MATERIAL FOR TRANSPLANTATION AND GRAFT COMPOSITION COMPRISING BIOCOMPATIBLE MATERIAL INCLUDING SAID MATERIAL

(54) 発明の名称： 移植用脱細胞化材料の製造方法及び当該材料を含む生体適合性材料からなる移植片組成物

[図1]



(57) Abstract: The purpose of the present invention is to provide a method for producing a decellularized material for transplantation that can be used in a graft composition and minimizes the portion sutured by thread. To achieve the above purpose, the present invention provides a method for producing a decellularized material for transplantation that includes (a) a step for collecting a branched blood vessel from a vertebrate animal (donor), (b) a step for decellularizing the blood



WO 2018/221402 A1

株式会社 A D E K A 内 Tokyo (JP). 木下 敬太 (KINOSHITA, Keita); 〒1168554 東京都荒川区東尾久七丁目 2 番 3 5 号 株式会社 A D E K A 内 Tokyo (JP). 森本 奈保喜 (MORIMOTO, Naoki); 〒1168554 東京都荒川区東尾久七丁目 2 番 3 5 号 株式会社 A D E K A 内 Tokyo (JP).

(74) 代理人: 曾我 道治, 外 (SOGA, Michiharu et al.); 〒1000005 東京都千代田区丸の内三丁目 1 番 1 号 国際ビルディング 8 階 曾我特許事務所 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, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, 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, SA, 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.

(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, ST, 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, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

添付公開書類:

一 国際調査報告 (条約第21条(3))

vessel, and (c) a step for adhering the portion from which the branch has been excised by protein denaturation treatment and closing the vessel. The present invention also provides a graft composition comprising a biocompatible material that includes the decellularized material for transplantation.

(57) 要約: 移植片組成物に利用可能な、糸による縫合部を最小限に抑えた移植用脱細胞化材料を製造する方法を提供することを目的とする。上記目的を達成するため、本発明は (a) 脊椎動物 (ドナー) から分枝を有する血管を採取する工程、(b) 当該血管を脱細胞化する工程、及び (c) 分枝を切除した部分をタンパク質変性処理により接着し閉管する工程を含む、移植用脱細胞化材料の製造方法を提供する。さらに、本発明は当該移植用脱細胞化材料を含む生体適合性材料からなる移植片組成物も提供する。

明 細 書

発明の名称：

移植用脱細胞化材料の製造方法及び当該材料を含む生体適合性材料からなる移植片組成物

技術分野

[0001] 本発明は、移植に用いることができる脱細胞化材料の製造方法及び当該材料を含む生体適合性材料からなる移植片組成物に関する。

背景技術

[0002] 他人の生体組織由来の移植片を移植する場合、被移植者側組織による移植片の拒絶反応が問題となる。このような問題の解決方法として、人工組織の開発が期待されている。素材として種々の高分子が試されているが、これら素材と生体組織との適合性が低いため、移植片と生体組織との接合部位における脱落や感染症が発生する場合がある。そこで、生体組織との適合性を向上すべく、生体組織から細胞を除却して残存する支持組織である脱細胞化生体組織を移植片として使用する技術が開発されてきた。

[0003] 脱細胞化材料に求められる性質としては、(i) 移植片としての強度、(i i) 拒絶反応を引き起こす脱細胞化組織中のDNAが除去されていること、(i i i) 移植後に自己細胞が浸潤しやすいこと等が挙げられる。これらを満たす脱細胞化材料を得るため、種々の製造方法が検討されてきた。例えば、界面活性剤を使用する方法（例えば、特許文献1、2を参照）、酵素を使用する方法（例えば、特許文献3を参照）、酸化剤を使用する方法（例えば、特許文献4を参照）、高静水圧処理による方法（例えば、特許文献5～7を参照）、凍結融解処理による方法（例えば、特許文献8～9を参照）、高張電解質溶液で処理する方法（例えば、特許文献10を参照）等が知られている。

先行技術文献

特許文献

- [0004] 特許文献1：特開昭60-501540号公報
特許文献2：特表2003-518981号公報
特許文献3：特表2002-507907号公報
特許文献4：特表2003-525062号公報
特許文献5：特開2004-094552号公報
特許文献6：国際公開第2008/111530号
特許文献7：特表2013-502275号公報
特許文献8：特開2005-185507号公報
特許文献9：特開2005-211480号公報
特許文献10：特開2010-221012号公報

非特許文献

- [0005] 非特許文献1：JOURNAL OF BIOMEDICAL MATERIALS RESEARCH A, OCT 2015 Vol .103A, 10

発明の概要

発明が解決しようとする課題

- [0006] 一般に、脱細胞化組織としての機能性を維持するためには、表面状態が保たれていること、つまりその組織の形態的な損傷が極力抑えられていることが重要とされ（例えば非特許文献1）、比較的わずかな障害であっても自己細胞の浸潤に影響する。そこで本発明者は脱細胞化組織への損傷がより少ないと考えられた縫合による加工を行ったところ、自己細胞の浸潤を妨げることとなることを知見した。このような結果を踏まえると、生体組織に由来する移植片組成物は、その中に縫合部を必要最小限に収めることが重要であると考えられる。

課題を解決するための手段

- [0007] 具体的に、分枝（分枝血管）を有する血管から得られる脱細胞化組織を移植片組成物として使用する場合は、分枝部分を切除し閉管する必要がある。このような、分枝の切除部を閉管する手段として縫合ではなく、タンパク質

変性処理を行うことで閉管すると脱細胞化組織の自己細胞の浸潤が妨げられることなく、移植部の組織が再生されることを見出した。

[0008] つまり、本発明は、

- (a) 脊椎動物（ドナー）から分枝を有する血管を採取する工程、
- (b) 当該血管を脱細胞化する工程、及び
- (c) 分枝を切除した部分をタンパク質変性処理により接着し閉管する工程

を含む、移植用脱細胞化材料の製造方法を提供する。

[0009] また、本発明の移植用脱細胞化材料の製造方法は、(a)工程で採取した血管の分枝部を切除する工程をさらに含んでもよい。

[0010] また、本発明は、脊椎動物（ドナー）の分枝が切除された血管からなり、かつタンパク質変性により閉管された分枝切除部を少なくとも1以上有する移植用脱細胞化材料を含む生体適合性材料からなる移植片組成物も提供する。

発明の効果

[0011] 本発明の製造方法では、移植後に自己細胞が浸潤しやすい移植片組成物のための移植用脱細胞化材料を提供することができる。そして、本発明の製造方法により得られた移植用脱細胞化材料を少なくとも一部に含む移植片組成物は、移植後の自己細胞が湿潤しやすいため、移植後も正常な生体組織として機能することができる。

図面の簡単な説明

[0012] [図1]図1は、分枝を有する血管の概略図を示す。(i)の1は分枝を有する血管、2は分枝部分（分枝血管）及び破線は分枝部分を切除する位置の一例を示す。この破線は血管から1mm～2mm離れていることが好ましい。また、別の実施態様として、この破線の位置は血管から5mm～数cm離れていてもよい。(ii)の3はタンパク質変性部を示す。

[図2]図2は、実施例において、ブタから採取した分枝部分が切除された内胸動脈片を示す図である。なお、以下の実施例において、図中(3)の内胸動

脈片を比較例として用いた。

[図3] 図中 (α) は、採取されたブタの内胸動脈片をヘマトキシリン・エオシン染色した断面図の拡大写真である。また、(β) は、採取されたブタの内胸動脈片を脱細胞化し、ヘマトキシリン・エオシン染色した移植用脱細胞化材料の断面図の拡大写真である。核酸が存在せず、脱細胞化されていることが確認できる。なお、各スケールバーは $1000\ \mu\text{m}$ を示す。また、以下の実施例において、図中 (3) の内胸動脈片を比較例として用いた。

[図4] 図4 は、移植用脱細胞化材料である脱細胞化ブタ内胸動脈片をウサギに移植して3カ月後のヘマトキシリン・エオシン染色 (HE染色) 又はエラスチカ・ワンギーソン染色 (EVG染色) により染色した切片の拡大写真である。比較例において、円で囲われた部分の矢印が指している白い小さな円はプロリン糸が通っていた痕跡である。プロリン糸は、紙面に対して垂直に通っていた。プロリン糸が通っていた周辺では細胞の浸潤が認められないのが認識できる。なお、各スケールバーは $500\ \mu\text{m}$ を示す。

[図5] 左側の図は、移植前の本発明の移植用脱細胞化材料である脱細胞化ブタ内胸動脈片をHE染色した分枝部分の切片の拡大写真である。右側の図は、移植して1カ月後のHE染色した分枝部分の切片の拡大写真である。移植後に細胞の浸潤が認められる。なお、各スケールバーは $500\ \mu\text{m}$ を示す。

発明を実施するための形態

[0013] 本発明の移植用脱細胞材料の製造方法について説明する。

本発明は、分枝を有する血管を脊椎動物 (ドナー) から採取する。

ここでいう採取とは、分枝を有する血管をドナーから分離することを意味する。また、「分枝を有する血管」はドナーの中で分枝を有していた血管の意であり、採取する際に分枝が切除されているものも含む。

[0014] 本発明において、脊椎動物とは特に限定されないが、血管が容易に入手できることが好ましいため、ヒト以外の動物であることが好ましく、特に哺乳類の家畜や鳥類の家畜が好ましい。哺乳類の家畜としては、ウシ、ウマ、ラクダ、リヤマ、ロバ、ヤク、ヒツジ、ブタ、ヤギ、シカ、アルパカ、イヌ、

タヌキ、イタチ、キツネ、ネコ、ウサギ、ハムスター、モルモット、ラット、リス及びアライグマ等が挙げられる。また、鳥類の家畜としては、インコ、オウム、ニワトリ、アヒル、七面鳥、ガチョウ、ホロホロ鳥、キジ、ダチョウ、エミュー及びウズラ等が挙げられる。この中でも入手の安定性からブタ、ウサギ又はウシが好ましい。

[0015] 本発明の移植用脱細胞材料の製造方法では、分枝を有する血管を使用する。ここで、分枝を有する血管とは、図1に示す通り、分枝部分（分枝血管）を少なくとも1以上有する血管を言う。

枝分かれした構造の血管を有する血管は複雑な形状であるため、脱細胞化しても加工に適するものではないとされているほか、分枝構造を有するため、移植用血管用途としてもほとんど利用されることはなかった。本発明により、血管の分枝部分を接着させ閉管することで、分枝のない血管として利用できる。従来、利用が困難であった分枝を有する血管を移植片組成物として利用できる意義は極めて大きいものである。

[0016] 分枝を有する血管としては、具体的に、内胸動脈、腹壁動脈、胃大網動脈、頸動脈、橈骨動脈、肋間動脈、筋横隔動脈、大腿動脈、大腿深動脈、大動脈、尺骨動脈、上腕動脈、前脛骨動脈、後脛骨動脈、腸管膜動脈、脾動脈、内胸静脈、前肋間静脈、奇静脈、半奇静脈、頸静脈、腸管静脈、大腿静脈、伏在静脈、腸管膜静脈、脾静脈等が挙げられる。移植片組成物としての物理的特性（伸び、生体適合性、強度等）を考慮すると、動脈が好ましく、内胸動脈がより好ましい。

[0017] 分枝を有する血管は、脊椎動物を麻酔または屠殺した後、胸部、腹部、脚部などの身体の一部を切開して、採取の対象となる分枝を有する血管を切除する。麻酔方法や屠殺方法は当業者が従来行っている方法をそのまま用いることができる。

脊椎動物の身体の一部を切開するときは、動物実験や外科用手術で通常用いるメスやハサミ等を使用することが可能である。

[0018] 同様に、分枝を有する血管を採取する場合は、動物実験や外科用手術で通

常用いるメスやハサミ等を使用することが可能である。血管を切除する場合に、超音波メスや電気メスを使用することが好ましい。これらは、血管を切除する箇所に超音波振動又は高周波電流により、血液を凝固させながら血管を切除することが可能である。特に、切除部分のタンパク質の変性の程度が適度であるため、超音波メスを使用することが好ましい。

なお、本明細書においては「超音波メス」と「超音波振動メス」を同義で用いるものとする。

[0019] 本発明で使用可能な電気メスは、エルベ社製のバイオシリーズや泉工医科工業社製のSHAPPERシリーズ社等が挙げられる。本発明で使用可能な超音波メスは、ストライカーメドテック社製のソノペットUST-2001、エチコンエンドサージェリー社製のハーモニックスカルペル等が挙げられる。

[0020] (a) 工程で採取された血管は、既に分枝部分を切除した状態でもよく、分枝部分が十分な長さで残った状態（例えば、5mm～数cm）であってもよい。分枝部分が十分な長さで残っている場合は、適宜これを切除する。

なお、タンパク質変性処理を行う分枝部分の長さは、血管の枝分れ部分から1mm～10mm離れた位置であることが好ましく、2mm～7mm離れた位置がより好ましく、3～5mm離れた位置が最も好ましい。上記範囲でタンパク質変性処理を行うことで、本発明の移植用脱細胞材料を利用する際の変性処理に伴う影響（物性の変化および血流を妨げないことや抗血栓性など）を最小限に抑え、再組織化を促すことができる。

[0021] 脊椎動物から採取された上記血管は脱細胞化処理が行われる。脱細胞化処理は、界面活性剤処理 (Singelyn J.M., et al., *Biomaterials*, 2009, 30, 5409-5416; Singelyn J.M., et al., *J. Am. Coll. Cardiol.*, 2012, 59, 751-763; Sonya B., et al., *Sci. Transl. Med.*, 2013, 5, 173ra25)、酵素処理、浸透圧処理、凍結融解処理、酸化剤処理、高静水圧処理 (Sasaki S., et al., *Mol. Vis.*, 2009, 15, 2022-2028; Yoshihide H., et al., *Biomaterials*, 2010, 31, 3941-3949; S

eiichi F., et al., *Biomaterials*, 2010, 31, 3590-3595; Negishi J., et al., *J. Artif. Organs*, 2011, 14, 223-231; 特許第4092397号公報; 再公表2008-111530号公報; 特開2009-50297号公報) 及びこれらの組み合わせが例示されるが、高静水圧処理によって脱細胞化処理されることが好ましい。

[0022] 高静水圧処理を行う際の圧力に関し、脊椎動物であるドナー由来の細胞や病原体が破壊される程度の圧力であればよく、ドナーの動物種や血管の種類に応じて適宜選択することができる。静水圧としては、2~1,500MPaが例示される。印加する静水圧が50MPaよりも高い場合には、血管からの脱細胞化が十分に行われる。そのため、好ましくは、50~1,500MPa、更に好ましくは80~1,300MPa、更に一層好ましくは90~1,200MPa、最も好ましくは95~1,100MPaである。

[0023] 高静水圧の印加に使用する媒体としては、水、生理食塩水、緩衝液、プロピレングリコール又はその水溶液、グリセリン又はその水溶液、及び糖類水溶液等が挙げられる。緩衝液としては、酢酸緩衝液、リン酸緩衝液、クエン酸緩衝液、ホウ酸緩衝液、酒石酸緩衝液、トリス緩衝液、HEPES緩衝液、及びMES緩衝液等が挙げられる。糖類水溶液の糖類としては、エリトローズ、キシロース、アラビノース、アロース、タロース、グルコース、マンノース、ガラクトース、エリスリトール、キシリトール、マンニトール、ソルビトール、ガラクチトール、スクロース、ラクトース、マルトース、トレハロース、デキストラン、アルギン酸、及びヒアルロン酸等が挙げられる。

[0024] 高静水圧処理の媒体の温度は、氷を生成せず、熱による組織へのダメージがない温度であれば、特に限定されない。脱細胞化処理が円滑に行われ、組織への影響も少ないことから0~45℃が好ましく、更に好ましくは4~40℃、更に一層好ましくは10~37℃、最も好ましくは15~35℃である。

[0025] 高静水圧処理の時間は、短すぎると脱細胞化処理が十分行われず、長い場合にはエネルギーの浪費につながることから、5分~12時間が好ましく、

7分～5時間がより好ましく、10分～3時間が更に好ましい。

[0026] 脱細胞化の適否は、組織学的染色（ヘマトキシリン－エオジン染色）又は残存DNA定量で確認することができる。

[0027] 高静水圧が印加された血管は、組織中の細胞が破壊されており、この細胞成分は洗浄液により除去される。洗浄液は、高静水圧の印加に使用した媒体と同じ液でもよいし、異なる洗浄液でもよく、複数の種類の洗浄液を組み合わせ用いてもよい。洗浄液は、核酸分解酵素、有機溶媒又はキレート剤を含有することが好ましい。核酸分解酵素は、静水圧が印加された血管からの核酸成分について、有機溶媒は脂質について、それぞれの除去効率を向上させることができ、キレート剤は、脱細胞化組織中のカルシウムイオンやマグネシウムイオンを不活性化することにより、脱細胞化組織を患部へ適用した場合の石灰化を防ぐことができる。

[0028] 本発明では、分枝を切除した部分を、タンパク質変性処理を行って閉管する。ここで、タンパク質を変性する手段として特に限定されないが、作業の簡易性や効率、組織への損傷を少なくするという観点から、超音波メスや電気メスを使用することが好ましく、組織への損傷が少なく、かつ、分枝断端の閉鎖性を確実にする点から超音波メスを使用することが好ましい。

[0029] 超音波メスは、刃先が機械的超音波振動する構造を有して、刃先が接触した生体組織近傍が摩擦熱を生じ、生体組織内部のタンパク質が変性する。分枝血管を切除して開管している部分は、当該タンパク質が変性することで接着して閉管する。

なお、上記「分枝を切除した部分を、タンパク質変性処理を行って閉管する」とは、「分枝の切除」と「タンパク質変性処理を行って閉管する」ことを同時に行う場合も含むものとする。

[0030] 上記のように超音波を用いて処理を行う際の周波数は、好ましくは20kHz～100kHz、より好ましくは約30kHz～約60kHzである。出力は好ましくは50～500mA、より好ましくは100～400mA、さらに好ましくは200～300mAである（100VAC利用時）。

[0031] 超音波処理が行われる時間は周波数や出力に応じて様々であり特に限定されるものではないが、好ましくは0.1秒～10分、より好ましくは1秒～5分、さらに好ましくは3～60秒である。

[0032] 次に、本発明の、

(a) 脊椎動物（ドナー）から分枝を有する血管を採取する工程、

(b) 当該血管を脱細胞化する工程、及び

(c) 分枝を切除した部分をタンパク質変性処理により接着し閉管する工程

を含む、移植用脱細胞化材料の製造方法の各工程の順序について説明する。

[0033] この実施形態において（a）、（b）、（c）のそれぞれ工程は上記の順序に限定されない。

例えば、工程（a）、工程（b）及び工程（c）をこの順番で行う他に、工程（a）の後に、工程（c）を行い、その後、工程（b）を行ってもよい。また、別の態様として、分枝を有する血管の分枝部分をドナーである脊椎動物から採取する前に切除し、その分枝を切除した部分をタンパク質変性処理して、ドナーから採取し、この後に、工程（b）の脱細胞化を行うことも可能である。つまり、工程（c）、工程（a）、工程（b）の順序で含む態様も本発明に包含される。

[0034] 別の態様として、工程（a）で採取された分枝を有する血管の分枝部分が十分な長さで存在する場合（例えば、分枝部分の長さが5mm～数cm）は、この分枝部分を切除する工程（d）をさらに含むことができる。この工程（d）をいつ行うかも特に限定されない。

例えば、工程（a）、工程（d）、工程（b）及び工程（c）の順序、工程（a）、工程（b）、工程（d）及び工程（c）の順序で行うことも可能である。

本発明においては、分枝血管を見落とすことなく閉管できること、また作業がより効率的となる点で、（c）工程において「分枝の切除」と「タンパク質変性処理を行って閉管する」ことを同時に行い、さらに（c）工程と（

- a) 工程を連続的に行うことがより好ましい。なお、この場合であっても (b) 工程の前後に再度工程 (c) を行ってもよい。
- [0035] 本発明では、脊椎動物（ドナー）の分枝が切除された血管からなり、かつタンパク質変性により閉管された分枝切除部を少なくとも1以上有する移植用脱細胞化材料を含む生体適合性材料からなる移植片組成物も提供する。
- [0036] 本発明の移植片組成物における脊椎動物とは特に限定されないが、血管が容易に入手できることが好ましいため、ヒト以外の動物であることが好ましく、特に哺乳類の家畜や鳥類の家畜が好ましい。ここでの哺乳類の家畜や鳥類の家畜は、本発明の移植用脱細胞化材料の製造方法で使用する哺乳類の家畜や鳥類の家畜の具体例で挙げられている家畜と同じである。この中でも入手の安定性からブタ、ウサギ又はウシが好ましい。
- [0037] 本発明の移植片組成物において、「分枝が切除された血管」とは、本発明の移植用脱細胞化材料を製造するために用いた、分枝を有する血管から分枝部分を切除した血管である。分枝を有する血管としては、上記製造方法で用いた血管と同じものが使用でき、移植片組成物としての物理的特性（伸び、生体適合性、強度等）を考慮すると、動脈が好ましく、内胸動脈がより好ましい。
- [0038] 本発明の移植片組成物に使用される移植用脱細胞化材料はタンパク質変性部を有する。具体的には、分枝部分の切除箇所は開管の状態になっており、タンパク質変性処理を行うことで開管部を塞ぐことができる。
- タンパク質変性処理の具体的な方法は、上記の移植用脱細胞化材料と同様に特に限定されないが、超音波メスや電気メスを使用することができる。組織への損傷が少ないことから超音波メスを使用することが好ましい。
- [0039] 本発明の移植片組成物において、タンパク質を変性させるための超音波の周波数及び処理時間に関する条件は、上記の移植用脱細胞化材料の製造方法での超音波の周波数及び処理時間の条件と同じである。
- [0040] 本発明の移植片組成物に使用される移植用脱細胞化材料について、脱細胞化処理は上述の脱細胞化処理と同様の脱細胞化処理を行うことができ、高静

水圧処理によって脱細胞化処理されることが好ましい。

高静水圧処理を行う際の圧力に関し、脊椎動物であるドナー由来の細胞や病原体が破壊される程度の圧力であればよく、上記の静水圧の条件と同じ条件で行うことができる。また、高静水圧の印加に使用する媒体としては、水、生理食塩水、緩衝液、プロピレングリコール又はその水溶液、グリセリン又はその水溶液、及び糖類水溶液等が挙げられ、各溶媒の具体例としては、上記の溶媒の具体例と同じ溶媒を使用することができる。

[0041] 本発明の移植片組成物は、特定の生体適合性材料からなる。ここで、「生体適合性」とは、移植片が被移植組織により受け容れられ、毒性や著しい免疫拒絶を誘発しないことを意味する。

[0042] 生体適合性材料としては流動性を有さず固体状のものであれば特に限定されるものではないが、非再吸収性ポリマーや吸収性ポリマー、金属類、ガラス類、セラミック類が挙げられる。

[0043] 上記非再吸収性ポリマーとしては、ポリエチレン、ポリエチレンテレフタレート、ポリブチレン、ポリブチレンテレフタレート、ポリプロピレン、アクリル、ポリアミドイミド、ポリエーテルエーテルケトン、ポリアリールエーテルケトン、ポリカーボネート、ポリアミド、ポリフッ化ビニル、ポリフッ化ビニリデン、ポリメチルメタクリレート、ならびにこれらの組み合わせ及び等価物が挙げられるが、これらに限定されるものではない。

[0044] 上記吸収性ポリマーとしては、合成ポリマーであっても天然ポリマーであってもよく、ポリアミノ酸、ポリアミド、脂肪酸ポリエステル、天然ポリマーとしては、コラーゲン、エラスチン、ヒアルロン酸、ラミニン、及びゼラチン、ケラチン、硫酸コンドロイチン、及び脱細胞化組織が挙げられる。

[0045] 上記金属類としては、タンタル、タンタル合金、ステンレススチール、チタン、チタン合金、コバルトクロム合金等が挙げられ、従来から医療機器等で用いられている生体適合性金属類を用いることができる。

[0046] 上記ガラス類又はセラミック類としては、リン酸テトラカルシウム、アルファー及びベーターリン酸トリカルシウム、リン酸オクタカルシウム、ヒド

ロキシアパタイト、置換アパタイト、モネタイト、メタリン酸塩、ピロリン酸塩、リン酸塩ガラス等のリン酸塩、カルシウム及びマグネシウムの炭酸塩、硫酸塩、及び酸化物、ならびにこれらの組み合わせが挙げられるが、これらに限定されるものではない。

[0047] 本発明の移植片組成物は、特定の移植用脱細胞化材料を少なくとも一部に含む生体適合性材料からなる。ここで、「少なくとも一部に含む」とは、当該移植用脱細胞化材料が生体適合性材料に1以上、複数で存在し得ることを意味する。自己細胞の浸潤がより効果的に達成される点で生体適合性材料は脱細胞化材料のみで構成されることがより好ましい。

[0048] 本発明の移植片組成物は、移植後生体組織の一部として機能することが可能となる。特に、移植用の血管代用物として機能することができる。

実施例

[0049] 1. 脱細胞化ブタ内胸動脈の作製

ブタ内胸動脈の採取（分枝血管の処理）

月齢3～4か月の食用ブタ（SPF（specific pathogen free）ブタ、メス、体重約50キロ）を麻酔下で開胸し内胸動脈を露出させた。超音波メス（ハーモニックスカルペルII、ハーモニックSYNERGY、エチコンエンドサージェリー社）の設定を55500Hz、出力レベル2として分枝血管を接触させ凝固させながら胸壁から内胸動脈を剥離（採取）した。

2頭のブタから4本の内胸動脈を採取した。

[0050] 2. ブタ内胸動脈の観察

採取したブタ内胸動脈4本の長さとお内径を測定した。それぞれ（1）長さ：140mm、内径：3.2mm、（2）長さ：135mm、内径：2.6mm、（3）長さ：95mm、内径：2.9mm、（4）長さ：105mm、内径：2.8mmであった。図2に得られたブタ内胸動脈（1）～（4）を示す。また、図3にその断面図（HE染色）を示す。

[0051] 3. ブタ内胸動脈の脱細胞化処理

[使用試薬]

・DNase溶液

DNase I (Roche, Grade II) 50mg/L、MgCl₂·6H₂O (Wako、試薬特級) 2.55g/Lを含有した大塚生理食塩水

・EtOH溶液

局方エタノールと大塚生理食塩水を体積比で80%となるように調製した溶液

・クエン酸溶液

クエン酸三ナトリウム二水和物 (Calbiochem、Molecular Biology Grade) とクエン酸無水物 (Wako、特級) を大塚生理食塩水に加え、pH7.4に調製した溶液

[0052] 上記のブタ内胸動脈を、水を媒体として超高静水圧装置 (Dr. Chef、神戸製鋼(株)製) で処理した。超高静水圧処理は、印加圧力600MPa、昇圧時間9分、圧力維持時間120分、降圧時間9分、圧媒温度30℃の条件で行った。

超高圧処理後50mg/L DNase I溶液で4日、EtOH溶液で3日、クエン酸溶液で4日洗浄を行い、脱細胞化を完了した。

[0053] 脱細胞化は、ヘマトキシリン・エオシン染色 (Hematoxylin-Eosin染色、以下、HE染色ということもある) を行い、HE染色切片画像に核酸がないことを顕微鏡で確認することで行った。

なお、HE染色はヘマトキシリンとエオシンの2種類の色素を用いて、細胞核と核以外の組織、成分を染め分ける方法であり、ヘマトキシリンで核を青藍色に、エオシンで細胞質・線維類や赤血球をピンク色に染めることができる。

[0054] 4. 耐圧強度の測定

脱細胞化後、各ブタ内胸動脈の片端をクランプで挟み反対側から20mLシリンジを用いて生理食塩水を送液して、耐圧強度を測定した。上記の(3

)を除く(1)、(2)、(4)のブタ内胸動脈を用いた移植用脱細胞化材料では耐圧強度が150 mmHg以上であった。

また、分枝部分の一部が閉塞されていない(3)では生理食塩水の漏れが確認できた。

なお、耐圧強度の測定は、シリンジポンプ(YSP-101)で20 mLシリンジから3 mL/minの速度で生理食塩水をブタ内胸動脈内に送液し、そのときの圧力をデジタル圧力計(KDM30)で計測した。

以後の実験において、(1)、(2)、(4)を実施例し、(3)を比較例とする。

[0055] 5. 比較例の血管の縫合

(3)の移植用脱細胞材料について、生理食塩水の漏れが確認できた分枝血管を切除した部分を6-0プロリン糸で結紮した。結紮は血管外膜部分に縫合糸を通した後、分枝の管状部分を外側から縛り上げるように行った。

[0056] 6. ウサギ大動脈への脱細胞化ブタ内胸動脈(移植用脱細胞化材料からなる移植片組成物)の長期移植

・移植方法

体重3.70-4.00 kgのウサギ(品種:日本白兔、5ヶ月齢、オス)にペントバルビタールナトリウム塩酸塩(商品名:ソムノペンチル(登録商標)0.2 mL)、生理食塩水(1.8 mL/ウサギ)、塩酸メデトミジン(商品名:ドルベネ注1 mL)を皮下注射した。不動化確認後、腹部皮膚を剃毛した。呼気麻酔としてイソフルラン吸入し(導入時2%、手術時1%)、保定台に保定した後、ポビドンヨード製剤を浸漬させたガーゼで皮膚を消毒した。続いて、生理食塩水3倍希釈リドカイン注射液(商品名:キシロカイン(登録商標))を腹部皮下に注射し、耳の静脈から点滴ラインをとりソリタ(登録商標)T-3を静注した。電気メス、ハサミを使用し、皮膚、腹膜を切開し腹部大動脈を露出させ、ヘパリン1000単位(1000単位/mLヘパリン1 mL)を点滴ラインから静注し、その後ヘパリン静注後3分が経過したのを確認し、腹部大動脈中枢側を遮断した。腹部大動脈にシャ

ントチューブを挿入後、血流遮断を解除した。シャントチューブで血流を確保しながら、8-0プロリン糸を使用し端側吻合法で脱細胞化ブタ内胸動脈と腹部大動脈中枢部を吻合した。続いて同様の方法で脱細胞化ブタ内胸動脈と腹部大動脈末梢部を吻合し、バイパス血管を作製した。加えて、バイパス血管へ血流を向かわせるため中枢吻合部と末梢吻合部の間の腹部大動脈を6-0プロリン糸で結紮した。脱細胞化ブタ内胸動脈移植後は、腹膜を4-0 PDS糸、筋層を2-0 PDS、皮膚を4-0 PDS糸で縫合し腹部を閉じた。抗生剤としてバイトリル（登録商標）を0.5 mL投与、塩酸メドミジン拮抗剤として塩酸アチパメゾール（商品名：アチパメ注1 mL）を大腿部皮下に注射した。覚醒確認後、飼育ケージにウサギを移した。

[0057] ・ 剖検

脱細胞化ブタ内胸動脈移植後1カ月或いは3ヶ月のウサギについて剖検を行った。ウサギから点滴ラインはとらず、移植時と同様の方法で腹部大動脈を（移植した脱細胞化ブタ内胸動脈）を露出させた。続いて血管開存評価、血栓形成評価を行った。血管開存評価は、腹部大動脈の末梢側を切断し、放血の有無で判断した。すべてのサンプルで放血を確認し、血管が開存していたことが示された。血管開存評価後、耳静脈にペントバルビタールナトリウム（ソムノペンチル（登録商標）5 mL）を注射し、サクリファイスした。心臓、呼吸停止後、脱細胞化ブタ内胸動脈を取り出した。脱細胞化ブタ内胸動脈内部を生理食塩水で洗浄した後、長軸方向に切開し血栓形成を目視で観察した。脱細胞化ブタ内胸動脈の内腔面へは血栓の付着はなく抗血栓性が高いことが示された。なお「開存」とは、血管の内腔が閉塞することなく、中空の状態が維持されていることをいう。

[0058] ・ 病理標本作製

移植した脱細胞化ブタ内胸動脈の病理標本の作製は（株）新組織科学研究所が行った。この際、脱細胞化ブタ内胸動脈の超音波メス或いは、6-0プロリン糸で閉塞させた分枝血管部分の組織構造が確認できる部分でHE染色切片、エラスチカ・ワンギーソン染色（Elastica van Gie

son染色、以下、EVG染色ということもある)を行い、EVG染色切片の作製を行った。具体的には、血管の長軸方向におよそ5 μ m厚で連続的に切片を作成し、超音波メス或いは、6-0プロリン糸で閉塞させた分枝血管部分の組織構造が確認できる部分で切片を作成した。

[0059] なお、EVG染色は弾性繊維を同定する染色方法であり、結合組織のなかのエラスチンを黒紫色に、コラーゲンを赤紫色に染め分けることができる。

[0060] 実施例サンプルのHE染色像、EVG染色像(3ヶ月)、比較例サンプルのHE染色像、EVG染色像(3ヶ月)を以下に示す(図4)。実施例サンプルでは、EVG染色で黒紫色に染まる脱細胞化ブタ内胸動脈組織部分にも細胞が浸潤していることが分かる。一方、比較例サンプルでは、EVG染色で黒紫色に染まる脱細胞化ブタ内胸動脈組織部分に細胞の浸潤が認められなかった。

また実施例サンプルでは、移植後1ヶ月の段階で分枝血管の段差がウサギ細胞で覆われる所見をみだした(図5)。

[0061] 7.

流通食用ブタ由来のブロック肉より、超音波メス(EESジェネレーター、ハーモニック SYNERGY、ハーモニック FOCUS+、<ブルーハンドピース使用>、エチコンエンドサージェリー社)の設定を55500Hz、出力レベル5および2として分枝血管を接触させ凝固させながら胸壁から内胸動脈を剥離(採取)した。分枝血管の凝固は血管の枝分かれ部分から3-5mm離れた位置で行うようにし、5本の内胸動脈を剥離(採取)した。上記「3」記載の方法にて脱細胞化処置を行った後、上記「4」記載の方法にて耐圧強度の測定を行った。その結果、5本のサンプル全てにおいて、耐圧強度は250mmHg以上であることを確認した。

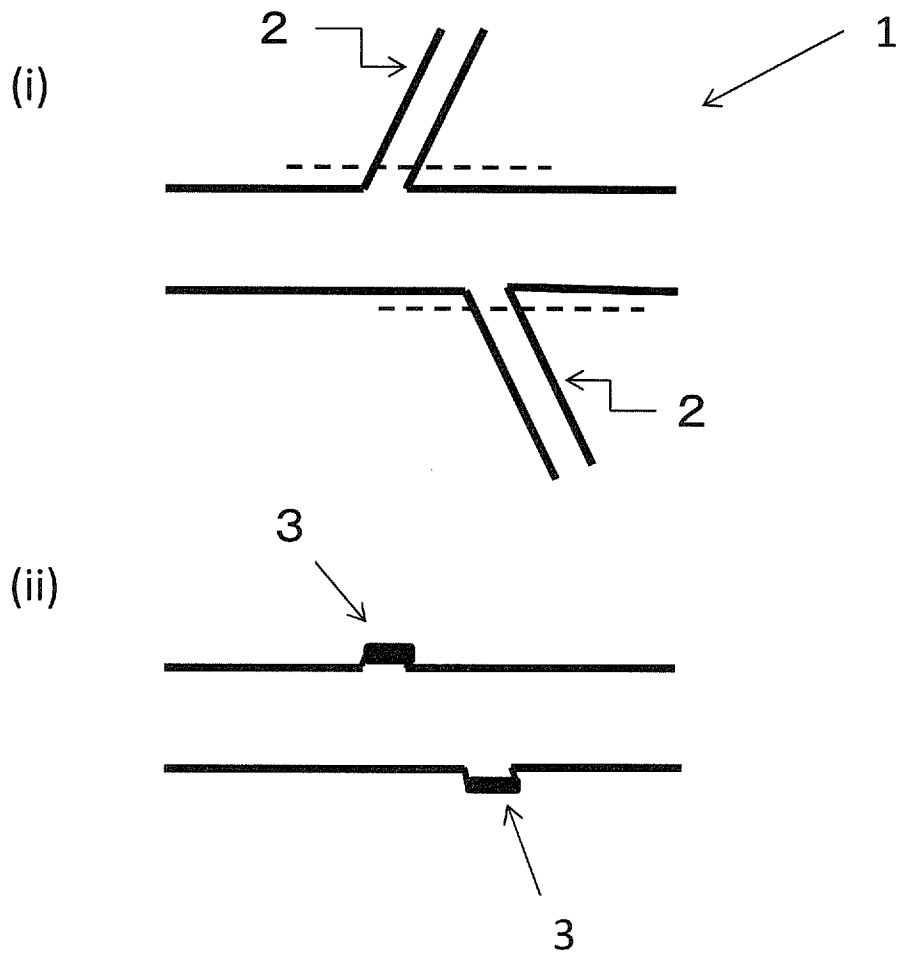
符号の説明

[0062] 1：分枝を有する血管、2：分枝部分(分枝血管)、3：タンパク質変性部

請求の範囲

- [請求項1] (a) 脊椎動物（ドナー）から分枝を有する血管を採取する工程、
(b) 当該血管を脱細胞化する工程、及び
(c) 分枝を切除した部分をタンパク質変性処理により接着し閉管する工程
を含む、移植用脱細胞化材料の製造方法。
- [請求項2] 前記工程（a）の後に、（d）採取した血管の分枝を切除する工程を含む、請求項1に記載の移植用脱細胞化材料の製造方法。
- [請求項3] 前記タンパク質変性処理が超音波振動処理である、請求項1又は2に記載の移植用脱細胞化材料の製造方法。
- [請求項4] 工程（b）の脱細胞化が超高静水圧処理を含む、請求項1～3のいずれかに記載の移植用脱細胞化材料の製造方法。
- [請求項5] 脊椎動物（ドナー）の分枝が切除された血管からなり、かつタンパク質変性により閉管された分枝切除部を少なくとも1以上有する移植用脱細胞化材料を含む生体適合性材料からなる移植片組成物。
- [請求項6] 前記血管が内胸動脈を含む、請求項5に記載の移植片組成物。
- [請求項7] ブタの内胸動脈を含む血管の脱細胞化組織からなり、タンパク質変性により閉管された分枝切除部を有する移植片組成物。

[図1]



[図2]



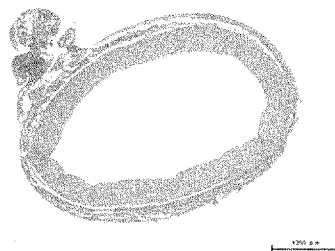
[図3]

 (α)

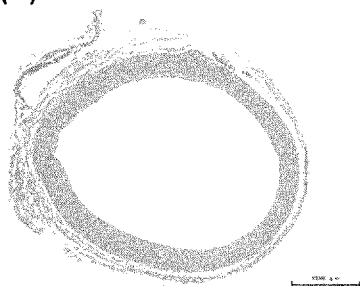
(1)



(2)



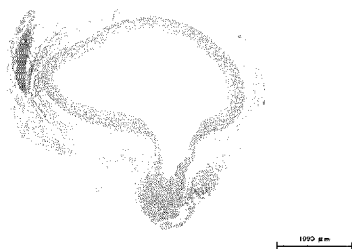
(3)



(4)

 (β)

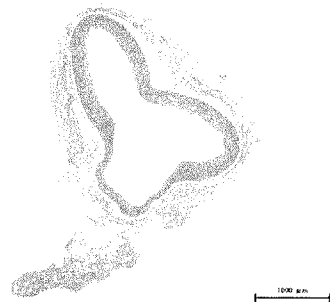
(1)



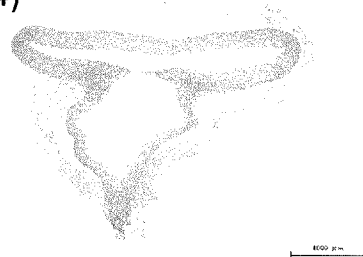
(2)



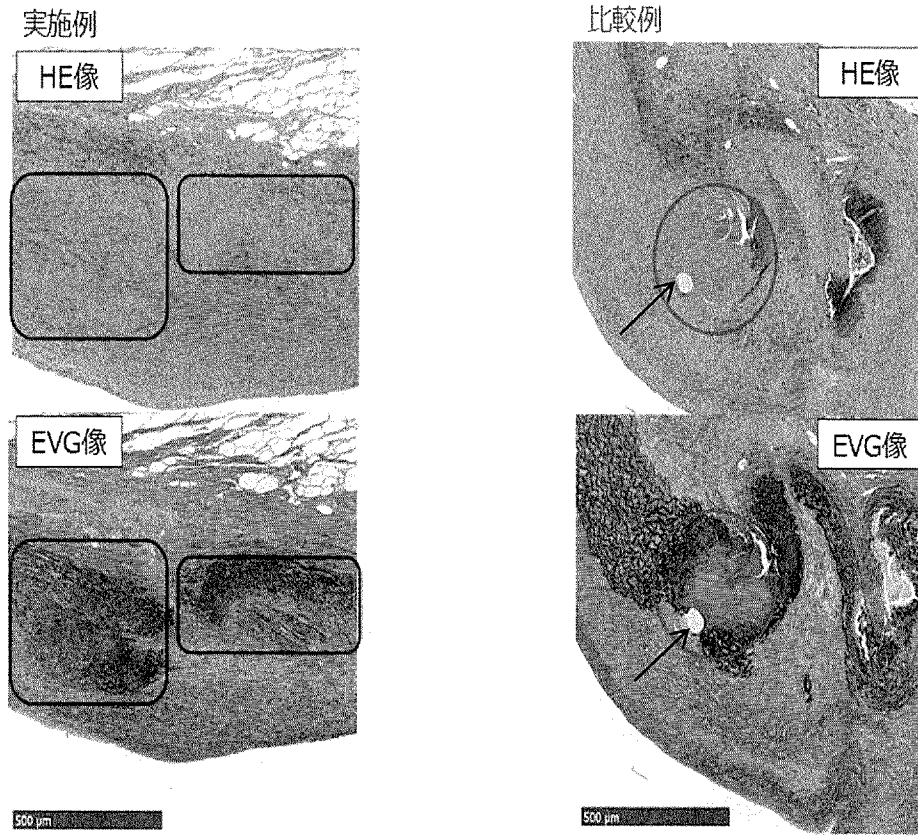
(3)



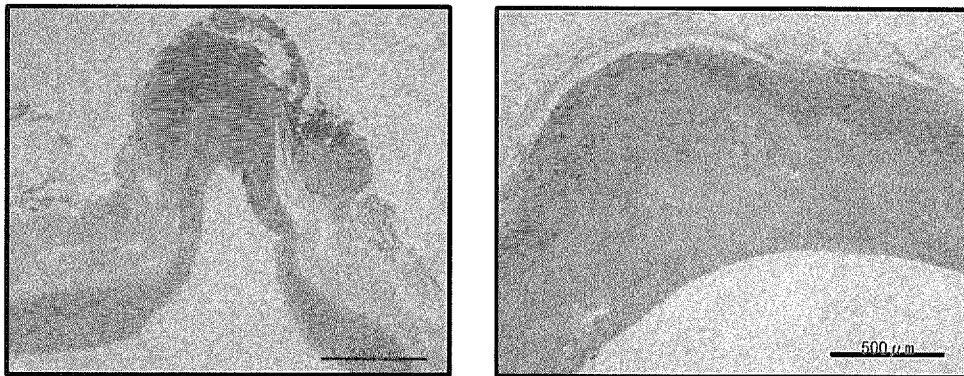
(4)



[図4]



[図5]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2018/020141

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
 Int.Cl. A61L27/36 (2006.01) i, A61F2/06 (2013.01) 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)
 Int.Cl. A61L27/36, A61F2/06

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

Published examined utility model applications of Japan	1922-1996
Published unexamined utility model applications of Japan	1971-2018
Registered utility model specifications of Japan	1996-2018
Published registered utility model applications of Japan	1994-2018

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
 JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII)
 CAPLUS/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS (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 2000-505315 A (ORIGIN MEDSYSTEMS, INC.) 09 May 2000, claims 23, 25, page 23, lines 4-13 & WO 1997/026831 A1, claims 23, 25, page 15, lines 25-37 & US 5695514 A & US 5797946 A & US 5976168 A & US 5980549 A & US 6264670 B1 & US 6277137 B1 & US 7384423 B1 & US 2009/0024156 A1 & US 5873889 A & EP 912139 A1 & AU 1710097 A & BR 9707085 A & CA 2244164 A & AU 719712 B	1-7
Y	WO 2016/194895 A1 (ADEKA CORPORATION) 08 December 2016, paragraphs [0027]-[0029] & EP 3305248 A1, [0037]-[0039] & CA 2987723 A & CN 107708612 A & KR 10-2018-0015156 A & TW 201711644 A	1-7

Further documents are listed in the continuation of Box C. See patent family annex.

* Special categories of cited documents:	"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
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"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
"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date	"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
"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)	"&" document member of the same patent family
"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	

Date of the actual completion of the international search 30 July 2018 (30.07.2018)	Date of mailing of the international search report 07 August 2018 (07.08.2018)
--	---

Name and mailing address of the ISA/ Japan Patent Office 3-4-3, Kasumigaseki, Chiyoda-ku, Tokyo 100-8915, Japan	Authorized officer Telephone No.
--	---

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int.Cl. A61L27/36(2006.01)i, A61F2/06(2013.01)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 (IPC))

Int.Cl. A61L27/36, A61F2/06

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	1922-1996年
日本国公開実用新案公報	1971-2018年
日本国実用新案登録公報	1996-2018年
日本国登録実用新案公報	1994-2018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)

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII)
CAplus/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS (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 請求項の番号
Y	JP 2000-505315 A (オリジン・メッドシステムズ, インコーポレイ テッド) 2000.05.09, 請求項 23, 25, 23 頁 4-13 行 & WO 1997/026831 A1, 請求項 23, 25, 15 頁 25-37 行 & US 5695514 A & US 5797946 A & US 5976168 A & US 5980549 A & US 6264670 B1 & US 6277137 B1 & US 7384423 B1 & US 2009/0024156 A1 & US 5873889 A & EP 912139 A1 & AU 1710097 A & BR 9707085 A & CA 2244164 A & AU 719712 B	1-7

☑ 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

30.07.2018

国際調査報告の発送日

07.08.2018

国際調査機関の名称及びあて先
日本国特許庁 (ISA/J P)
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)

天野 貴子

4U

9444

電話番号 03-3581-1101 内線 3439

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	WO 2016/194895 A1 (株式会社ADEKA) 2016. 12. 08, [0027]-[0029] & EP 3305248 A1, [0037]-[0039] & CA 2987723 A & CN 107708612 A & KR 10-2018-0015156 A & TW 201711644 A	1 - 7