

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第6473695号
(P6473695)

(45) 発行日 平成31年2月20日(2019.2.20)

(24) 登録日 平成31年2月1日(2019.2.1)

(51) Int.Cl.	F I	
A 6 1 L 27/14	(2006.01)	A 6 1 L 27/14
A 6 1 L 27/38	(2006.01)	A 6 1 L 27/38
A 6 1 L 27/50	(2006.01)	A 6 1 L 27/50 3 0 0
A 6 1 L 27/54	(2006.01)	A 6 1 L 27/54
A 6 1 L 27/58	(2006.01)	A 6 1 L 27/58

請求項の数 6 (全 21 頁)

(21) 出願番号 特願2015-553364 (P2015-553364)
 (86) (22) 出願日 平成26年12月12日(2014.12.12)
 (86) 国際出願番号 PCT/JP2014/006193
 (87) 国際公開番号 W02015/093018
 (87) 国際公開日 平成27年6月25日(2015.6.25)
 審査請求日 平成29年11月24日(2017.11.24)
 (31) 優先権主張番号 特願2013-258995 (P2013-258995)
 (32) 優先日 平成25年12月16日(2013.12.16)
 (33) 優先権主張国 日本国(JP)

(73) 特許権者 506137147
 エーザイ・アール・アンド・ディー・マネ
 ジメント株式会社
 東京都文京区小石川四丁目6番10号
 (73) 特許権者 514316433
 小野寺 宏
 東京都文京区本郷7-3-1
 (74) 代理人 230104019
 弁護士 大野 聖二
 (74) 代理人 100119183
 弁理士 松任谷 優子
 (74) 代理人 100114465
 弁理士 北野 健
 (74) 代理人 100149076
 弁理士 梅田 慎介

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 血管再生用移植材料

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

生分解性単系の撚糸の編物からなる中空管状構造の外管及び内管からなり、外管の管腔に、該外管の管腔径よりも小さい外径を有する前記内管が少なくとも一つ配設されている血管再生用の移植材料。

【請求項2】

前記外管の管腔に、該外管の管腔内面と、前記内管の外面とにより構成される空間を備える、請求項1記載の移植材料。

【請求項3】

前記外管及び/又は前記内管に、血管内皮細胞増殖因子(V E G F)、血小板由来成長因子(P D G F)、繊維芽細胞成長因子(F G F)及び/又は肝細胞増殖因子(H G F)からなる群から選択される1以上の因子が結合されている請求項1又は2に記載の移植材料。

【請求項4】

前記外管に前記群から選択される1以上の因子が結合され、前記内管に前記群から選択される他の1以上の因子が結合されている請求項3に記載の移植材料。

【請求項5】

前記内管の管腔及び/又は前記空間に、血管系細胞及び/又は血管系細胞に分化する細胞が充填されている、請求項1~4のいずれか一項に記載の移植材料。

【請求項6】

前記外管及び前記内管は、前記編物を構成する撚糸の間に形成された間隙を有し、前記間隙が管腔の外部と内部との連絡を可能とする、請求項 1 ~ 5 のいずれか一項に記載の移植材料。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、血管再生用の移植材料に関する。

10

【背景技術】

【0002】

糖尿病の合併症や癌、リウマチ等による血管障害を治療するため、管状構造を有する移植材料を用いた血管再生 (revascularization) が試みられている。移植材料を障害部位に埋設すると、生体に内在する細胞あるいは移植材料とともに移植した細胞が、移植材料を足場として組織を再生し、新生血管を形成する。

【0003】

移植材料は、生体吸収性材料によって形成され、生体内で分解・吸収されるものであるが、移植後組織が再生するまでの間は、分解されることなく移植部位にとどまり、再生してくる組織のために足場とスペースを提供する。移植材料を管状構造とすることで、この

20

【0004】

管状構造を有する移植材料として、特許文献 1 には、「生体吸収性高分子のマルチフィラメントよりなる第 1 の糸と、生体吸収性高分子のモノフィラメントからなる第 2 の糸とを、交互に、又は、適当な比率で組み合わせ配置して組み紐状または筒編み状の組織で筒体に構成されていることを特徴とする生体組織再生用管状医療材料。」が開示されている (請求項 1 参照)。この管状医療材料は、筒体内部を空洞とでき、生体組織の再生のための液体の流れを阻害せず、かつ管腔内部の液体が漏れることも防止できるとされている (当該文献段落 0008 参照)。特許文献 1 には、移植材料を、多重管構造とすることは記載されていない。

30

【0005】

また、非特許文献 1 には、「繊維性の人工高分子素材としてポリ乳酸やポリグリコール酸など多くの素材の開発が進んでおり、用途に応じて選択することもできる。組織溶解性型素材の基本系 (直径 10 μm) を複数本編み込むことにより中空のチューブを製作し、種々の接着分子を結合させた。編み機の設定により多彩なサイズの形状の足場を構築できる。」との記載がある (当該文献第 46 頁左欄下から 6 ~ 2 行目)。さらに、「本方法は、脳脊髄という限られたスペースでの神経回路再建に有効な方法であることが明らかになった。」 (当該文献第 47 頁左欄 15 ~ 17 行目) との記載はあるが、血管に使用できることは記載されていない。

【0006】

40

さらに、特許文献 2 には、血管再生用の足場材料に関し、同心円状の複数の層からなる中空の円筒体であって、脂肪族ポリエステル繊維からなる円筒体である足場材料が開示されている。この足場材料は、脂肪族ポリエステルを含有するドープを静電紡糸法で紡糸し、得られた繊維を巻き付けた、複数の層からなる円筒体であり、血管と類似した構造と同程度の機械的強度を有するとされている (当該文献 2 頁 15 ~ 22 行目参照)。この足場材料において、複数の層は、実際の血管組織の内膜、中膜、外膜を模擬するものであり (同 7 頁 1 ~ 12 行目参照)、各層は密着しているものと認められる。

【先行技術文献】

【特許文献】

【0007】

50

【特許文献1】特開2010-240200号公報

【特許文献2】国際公開第2006/054799号

【非特許文献】

【0008】

【非特許文献1】機能材料2012年5月号Vol.32, No.5

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0009】

管状構造を有する移植材料を生体内に埋設した場合、移植材料が変形して管腔が閉塞してしまう場合がある。特に糖尿病の大血管障害の治療において大腿等の筋肉内に移植材料を埋設するような場合には変形（キンキング）が生じやすい。移植材料の変形により管腔が閉塞すると、再生組織のためのスペースを確保することができなくなり、管腔内における細胞の移動や、酸素及び血液、細胞外液の流れが阻害され、血管再生が生じ難くなるおそれがある。

10

【0010】

上述の特許文献1に記載される管状医療材料では、太いモノフィラメントからなる第2の糸によって筒体の耐キンキング性を向上させている（当該文献段落0008参照）。また、特許文献2に記載される足場材料は、複数層からなる積層構造により円筒体の機械的強度を高めていると認められる。

【0011】

20

本発明は、移植部位において再生組織のための十分なスペースを確保して血管の再生を促進することが可能な移植材料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】

【0012】

上記課題解決のため、本発明は、生分解性単系の撚糸が中空管状構造に編み込まれてなる外管及び内管からなり、外管の管腔に、該外管の管腔径よりも小さい外径を有する前記内管が少なくとも一つ配設されている血管再生用の移植材料を提供する。この血管再生用移植材料は、内管が外管の芯材として機能するため、耐キンキング性に優れ、管腔の閉塞が生じ難い。

【0013】

30

また、本発明に係る血管再生用移植材料は、前記外管の管腔に、該外管の管腔内面と、前記内管の外面とにより構成される空間を備える。該空間は、組織再生のためのスペースとなるとともに、外力を受けて外管が変形した場合には、外管の変形を緩衝し内管の変形を防止して、内管の管腔を維持するためにも機能する。

【0014】

さらに、本発明に係る血管再生用移植材料は、前記外管及び前記内管に、編み込まれた前記撚糸の間に形成され、管腔の外部と内部とを連絡する間隙を備えている。この血管再生用移植材料は、細胞や酸素、血液及び細胞外液が、該再生用移植材料の側壁の間隙を通過して外管及び内管の管腔内外へ移動することが可能とされている。

【0015】

40

本発明に係る血管再生用移植材料は、前記外管及び/又は前記内管に、血管内皮細胞増殖因子（VEGF）、血小板由来成長因子（PDGF）、繊維芽細胞成長因子（FGF）及び/又は肝細胞増殖因子（HGF）からなる群から選択される1以上の因子が結合されたものとする。この場合、前記外管に前記群から選択される1以上の因子が結合され、前記内管に前記群から選択される他の1以上の因子が結合されたものであってもよい。

また、本発明に係る血管再生用移植材料は、前記内管の管腔及び/又は前記空間に、血管系細胞及び/又は血管系細胞に分化する細胞が充填されていてもよい。

【発明の効果】

【0016】

本発明により、移植部位において耐キンキングに優れ、再生組織のための十分なスパー

50

スを確認して血管の再生を促進することが可能な移植材料が提供される。

【図面の簡単な説明】

【0017】

【図1】本発明の第一実施形態に係る血管再生用移植材料を説明する模式図である。(A)は側面図、(B)は断面図を示す。

【図2】本発明の第二実施形態に係る血管再生用移植材料を説明する模式図である。(A)は側面図、(B)は断面図を示す。

【図3】本発明の第三実施形態に係る血管再生用移植材料を説明する模式図である。(A)は側面図、(B)は断面図を示す。

【図4】本発明に係る血管再生用移植材料の敷設のために使用可能なガイドワイヤを説明する模式図である。

【図5-1】遺伝子導入用ベクターを結合した中空管状構造体により培養細胞に遺伝子導入を行った結果を示す写真である。

【図5-2】図5-1に示す写真の模式図である。

【図6-1】血管再生用移植材料を筋肉内へ移植した結果(移植後3日)を示す写真である。

【図6-2】図6-1に示す写真の模式図である。

【図7】下肢虚血モデルマウス(ヌードマウス)にVEGFコート血管再生用移植材料を移植した結果(移植後3週間)を示す写真である。(A)は一重管構造を有する中空管状構造体の移植部、(B)は二重管構造を有する血管再生用移植材料の移植部を示す。

【図8】下肢虚血モデルマウス(C57BL/6J)にVEGFコート血管再生用移植材料を移植した結果(移植後3週間)を示す写真である。(A)は一重管構造を有する中空管状構造体の移植部、(B)は二重管構造を有する血管再生用移植材料の移植部を示す。

【図9】下肢虚血モデルマウス(C57BL/6J)の血管再生用移植材料の移植部におけるCD31染色像を示す写真である。

【図10】下肢虚血モデルマウス(C57BL/6J)の血管再生用移植材料の移植部におけるトマトレクチンの結合を示す写真である。

【発明を実施するための形態】

【0018】

以下、本発明を実施するための好適な形態について図面を参照しながら説明する。なお、以下に説明する実施形態は、本発明の代表的な実施形態の一例を示したものであり、これにより本発明の範囲が狭く解釈されることはない。また、以下に説明する実施形態の動物種は、ヒトがその一例として挙げられるが、これに限定されるものではない。

【0019】

1. 第一実施形態に係る血管再生用移植材料

図1は、本発明の第一実施形態に係る血管再生用移植材料を説明する図である。血管再生用移植材料Aは、外管1と内管2とからなる。外管1と内管2は、それぞれ生分解性単系3の撚糸4が中空管状構造に編み込まれてなる。

【0020】

[生分解性単系の撚糸]

生分解性単系3は、生体内で酵素の作用により加水分解され得る天然又は合成の高分子(生分解性高分子)から形成されている。生分解性高分子は、体内で溶解、吸収されるため、異物反応の危険性を最小限に抑えることができ、安全性に優れる。

【0021】

生分解性高分子は、例えば、ポリグリコール酸、ポリ乳酸、グリコール酸/乳酸共重合体、ポリ-ε-カプロラクトン、乳酸/ε-カプロラクトン共重合体、ポリヒドロキシ酪酸、ゼラチン、架橋ゼラチン、コラーゲン、アルギン酸、キチン、キトサン、ヒアルロン酸、セルロース、デンプン、ポリアスパラギン酸、ポリグルタミン酸、ポリリジンなどを挙げることができる。生分解性高分子は、特に、ポリグリコール酸、ポリ乳酸、グリコール酸/乳酸共重合体が好ましい。

10

20

30

40

50

【0022】

生分解性単系3の直径は、挿入すべき組織の特性および損傷の程度に応じて適宜選択できる。単系直径は、例えば、200 μm 以下であってもよく、100 μm 以下であってもよく、さらに10 μm 以下であってもよい。単系直径は、好ましくは1~100 μm 、より好ましくは5~50 μm 、さらに好ましくは10~20 μm 程度とされる。

【0023】

生分解性単系3の断面形状は、特に限定されず、円形又は多角形などであってよい。生分解性単系3は、突起や微細凹凸を有していてもよい。

【0024】

撚糸4は、生分解性単系3を複数本撚り合わせたものである。撚糸4には、材料、直径及び断面形状等が異なる複数種の生分解性単系3を組み合わせて用いてもよい。撚糸4として束ねられる生分解性単系3の本数は、特に限定されないが、2~1000本、好ましくは4~500本程度、特に好ましくは4~100本程度とされる。外管1と内管2のそれぞれに用いられる生分解性単系3及び撚糸4は、同一の符号を付しているが、材料、直径、断面形状等及び本数が異なってもよいものとする。

10

【0025】

また、生分解性単系3は、それ自体が中空構造(管状構造)を有する中空糸であってもよい。さらに、生分解性単系3には、形状記憶素材を用いてもよい。

【0026】

外管1及び内管2は、撚糸4を中空管状構造に編み込んで形成されている。具体的には、金属線、樹脂線及び繊維などの芯の周りに撚糸4を編み込んでいき、最後に芯を抜去することによって、中空管状構造を有する外管1及び内管2を得ることができる。なお、芯の材料は、上記の金属、樹脂及び繊維に限定されない。

20

【0027】

また、得られた外管1及び内管2には、撚糸4の編目構造に由来して、撚糸4の間に間隙5が形成される。間隙5は、外管1(あるいは内管2)の管腔の外部と内部を連絡し、管腔内外への細胞や酸素、血液及び細胞外液の移動経路となる。

【0028】

生分解性単系3の材料、直径、断面形状及び本数や、撚糸4の編み組織及び編み込み時に糸に加える力などを調整することによって、外管1及び内管2の剛性や間隙5の形状及び大きさを変化させることが可能である。

30

【0029】

間隙5は、細胞や酸素、血液及び細胞外液が通過可能な大きさとされ、例えば、5 μm ~2000 μm 程度とされる。間隙5の大きさは、10 μm ~1000 μm 程度が好ましく、100 μm ~500 μm 程度がより好ましい。なお、外管1の間隙5と内管2の間隙5は、同一の符号を付したが、形状及び大きさが異なってもよいものとする。

【0030】

[多重管構造]

本発明に係る血管再生用移植材料は、外管1の管腔に、内管2が少なくとも一つ配設された多重管構造を有している。本実施形態の血管再生用移植材料Aでは、外管1の管腔に、一つの内管2が配された二重管構造とされている。

40

【0031】

内管2は、外管1の管腔径 d_1 よりも小さい外径 D_2 を有する。内管2の外径 D_2 は、例えば、外管1の管腔径 d_1 の90%、80%、70%、60%、50%、40%、30%、20%あるいは10%程度とされる。

【0032】

二重管構造は以下の手順により作製できる。まず、芯の周りに撚糸4を編み込んで外管1を作製する。次に、外管1の作製に用いた芯よりも径の小さな芯の周りに撚糸4を編み込んで内管2を作製する。そして、芯を抜き取った後の外管1の管腔に、内管2を芯とともに挿入する。最後に、内管2の芯を抜き取ることで、二重管構造を有する血管再生用移

50

植材料 A を得る。使用する芯の径は、外管 1 の管腔径 d_1 及び内管 2 の管腔径 d_2 に応じて適宜設定すればよい。

【 0 0 3 3 】

外管 1 の外径 D_1 は、挿入すべき組織の特性および損傷の程度に応じて適宜選択することができる。外径 D_1 は、最大 $10000 \mu\text{m}$ まで可能である。外管 1 の管腔径 d_1 は、脊髄や皮下組織のように運動性を欠く臓器へ移植する場合には、 $100 \mu\text{m}$ 程度であっても、移植後に管腔が閉塞することはない。一方、筋肉のように収縮運動の盛んな臓器へ移植する場合には、管腔径 d_1 が $100 \mu\text{m}$ 程度では管腔が閉塞するおそれがあるので、管腔径 d_1 は $500 \mu\text{m}$ 程度とすることが望ましい。ヒトへの適応を考えれば、管腔径 d_1 を比較的大きくすることが、循環動態改善効果ならびに管腔閉塞防止のために有用である。

10

【 0 0 3 4 】

外管 1 及び内管 2 の径の一例として以下の数値が挙げられる。

外管 1 : 外径 $D_1 600 \mu\text{m}$ 、管腔径 $d_1 500 \mu\text{m}$

内管 2 : 外径 $D_2 300 \mu\text{m}$ 、管腔径 $d_2 200 \mu\text{m}$

【 0 0 3 5 】

また、血管再生用移植材料 A の長さは、 $2 \text{mm} \sim 100 \text{cm}$ 程度とされ、好ましくは $1 \text{cm} \sim 30 \text{cm}$ 程度とされる。

【 0 0 3 6 】

血管再生用移植材料 A は、外管 1 の管腔に、外管 1 の管腔内面と、内管 2 の外面とにより構成される空間 11 を備えている。この空間 11 は、生体に内在する細胞あるいは移植材料とともに移植した細胞による組織再生のためのスペースとなる。空間 11 の広さは、組織再生のためのスペースが確保されれば足り、特に限定されず、挿入すべき組織の特性および損傷の程度に応じて適宜設計される。

20

【 0 0 3 7 】

血管再生用移植材料 A は、二重管構造（あるいは多重管構造）を有し、内管 2 が外管 1 の芯材としても機能するため、耐キンキング性に優れ、筋肉のように収縮運動の盛んな臓器へ移植した場合にも外管 1 及び内管 2 の管腔が閉塞し難い。また、仮に外力を受けて外管 1 が変形した場合にも、空間 11 が外管 1 の変形を緩衝し内管 2 の変形を防止するため、内管 2 の管腔（図 1 (B) 符号 22 参照）を維持できる。従って、血管再生用移植材料 A では、移植部位において再生組織のための十分なスペースを確保し、該スペースにおける細胞の移動や、酸素、血液及び細胞外液の流れを促進して、血管の再生を効果的に誘導できる。より具体的には、組織中から外管 1 及び内管 2 の管腔に入った遊走細胞や、管腔に充填されていた移植細胞が、空間 11 及び内管 2 の管腔 22 に沿って宿主の細胞に邪魔されことなく成長できるため、新生血管の伸長が促進される。

30

【 0 0 3 8 】

さらに、血管再生用移植材料 A は、外管 1 及び内管 2 が間隙 5 を有していることにより、外管 1 及び内管 2 の管腔内外への細胞や酸素、血液及び細胞外液の移動が可能とされている。従って、血管再生用移植材料 A では、組織中の遊走細胞や組織液が間隙 5 を通過して管腔内に入ったり、管腔に充填しておいた移植細胞が間隙 5 を通過して組織中に行ったりすることが可能である。血管再生用移植材料 A の管腔から組織中に出た移植細胞は、移植部位及びその周囲に移動して血管の再構築に寄与する。

40

【 0 0 3 9 】

[接着分子]

血管再生用移植材料 A には、細胞接着分子が結合されていてもよい。細胞接着分子とは、細胞の接着を促進する分子をいい、例えば、ラミニン、フィブロネクチン、コラーゲン、ポリリジン及びポリオルニチンなどが挙げられる。

【 0 0 4 0 】

血管再生用移植材料 A には、2 種以上の細胞接着分子を組み合わせる結合してもよい。また、血管再生用移植材料 A の部位毎に異なる種の細胞接着分子を結合させてもよい。例えば、外管 1 と内管 2 とで異なる種の細胞接着分子を結合させたり、血管再生用移植材料

50

Aの端部と中心部とで異なる種の細胞接着分子を結合させたりすることで、挿入する組織に存在する細胞及び血管再生用移植材料Aとともに移植する細胞に応じて所望の細胞接着特性を備えた血管再生用移植材料Aを作製することが可能である。

【0041】

血管再生用移植材料Aへの細胞接着分子の結合は、化学結合によるものであっても、物理的結合（例えば吸着）によるものであってもよい。例えば、血管再生用移植材料Aをラミニン水溶液（1～1000 μ g/ml）中に室温にて2～16時間浸漬させ、次に血管再生用移植材料Aを蒸留水で洗浄後、乾燥することにより、ラミニンが結合した血管再生用移植材料Aが得られる。

【0042】

[成長因子]

血管再生用移植材料Aには、ヘパリン及びノ又はヘパラン硫酸が結合されていてもよい。ヘパリンとヘパラン硫酸は、アデノ随伴ウイルスなどの遺伝子導入用ベクターとして用いられているウイルスと結合親和性を有する。このため、血管再生用移植材料Aにヘパリン等を結合させておくことで、血管再生用移植材料Aにヘパリン等を介してウイルスベクターを結合させることができる。ウイルスベクターには、センダイウイルスベクター、レンチウイルスベクター、レトロウイルスベクター、アデノウイルスベクター等も用いることができる。

【0043】

ウイルスベクターとしては、血管内皮細胞増殖因子（VEGF）、血小板由来成長因子（PDGF）、繊維芽細胞成長因子（FGF・bFGF）及び幹細胞増殖因子（HGF）などの新生血管の成長・成熟を促進する作用を有する因子を発現するウイルスベクターが挙げられる。

【0044】

また、ヘパリンとヘパラン硫酸は、VEGF、HGF、FGF・bFGF、上皮成長因子（EGF）、ケモカイン、ミッドカイン等の多くの栄養因子との結合親和性も有する。このため、血管再生用移植材料Aにヘパリン等を結合させておくことで、血管再生用移植材料Aにヘパリン結合性を有する栄養因子を結合させることもできる。さらに、これらの因子のタンパク質を血管再生用移植材料Aにヘパリンを介さず直接結合させることもできる。

【0045】

VEGF等の新生血管の成長・成熟を促進する作用を有する因子を導入、発現するための手段には、上記のウイルスベクターに限られず、プラスミド等の公知の遺伝子ベクターも採用できる。また、血管形成に関与する因子を発現させるための手段として、DNA（センス鎖、アンチセンス鎖を含む）やRNA（センス鎖、アンチセンス鎖、siRNA、miRNAを含む）を用いることもできる。例えばセンス鎖を用いれば、血管形成に関与する因子の発現を誘導できる。また、アンチセンス鎖を用いる場合やRNAiによる場合には、血管形成に関与する因子の発現抑制に機能している転写因子の発現を抑制することによって、血管形成に関与する因子の発現を誘導することが考えられる。また、上記のポリリジンのようにアミノ基を有する化合物は、DNAやRNAなどの核酸とイオン結合するため、血管再生用移植材料Aに細胞接着分子としてポリリジンを結合させれば、ポリリジンを介して血管形成に関与する遺伝子の発現を制御するための核酸を血管再生用移植材料Aに結合させることも可能である。本発明において、血管再生用移植材料に結合する成長因子の態様及び結合形態は、成長因子がその機能を発揮できるものであればよく、上記の通り、核酸の態様あるいはタンパク質の態様であってよく、これらの結合はヘパリン及びノ又はヘパラン硫酸を介する形態あるいは介さない形態であってよく、さらに因子が核酸である場合には核酸そのものの態様あるいは遺伝子ベクターに搭載された態様であってよいものとする。

【0046】

外管1と内管2のそれぞれに上記因子の一以上を結合させてよく、外管1と内管2に異

10

20

30

40

50

なる因子を結合してもよい。外管 1 と内管 2 のそれぞれに結合される因子の組み合わせは、挿入すべき組織の特性および損傷の程度に応じて適宜設定できる。

【 0 0 4 7 】

一例として、血管内皮細胞を誘導、増殖させる V E G F を内管 2 に結合させ、他の血管形成関連因子 (H G F、F G F 2、P D G F など) を外管 1 に結合させることで、生体内の血管に近い環境を再現できる。あるいは、外管 1 に V E G F を結合させ、内管 2 に他の血管形成関連因子 (H G F、F G F 2、P D G F など) を結合させることも考えられる。血管再生用移植材料 A によって生体内の血管に近い環境を移植部位に構築することで、V E G F 等を組織中に単に注入するだけの従来方法に比して、血管の再生を効果的に促進できる。

10

【 0 0 4 8 】

[細胞]

空間 1 1 及び内管 2 の管腔 2 2 には、血管系細胞及び / 又は血管系細胞に分化する細胞が充填されていてもよい。ここで、「血管系細胞」には、少なくとも血管内皮細胞及び血管周皮細胞 (ペリサイト) が含まれる。また、「血管系細胞に分化する細胞」には、血管内皮細胞及びペリサイトの前駆細胞、誘導性多能性幹細胞 (iPS 細胞) 及び胚性幹細胞 (ES 細胞) 等の幹細胞、間葉系幹細胞等が含まれる。

【 0 0 4 9 】

さらに、空間 1 1 及び内管 2 の管腔 2 2 に、血管系細胞とともに心筋細胞を充填すれば、心筋梗塞や心筋症の治療への適用も可能である。さらに、内管 2 の管腔 2 2 に移植細胞を充填し、空間 1 1 に V E G F、P D G F、F G F ・ b F G F 及び H G F などの新生血管の成長・成熟を促進する作用を有する因子を結合してもよい。これによって、移植した血管内皮細胞等による血管構造の構築を促進できる。

20

【 0 0 5 0 】

細胞に替えて、あるいは細胞と共に、空間 1 1 及び内管 2 の管腔 2 2 に、各種の栄養因子や薬物を導入してもよい。空間 1 1 及び内管 2 の管腔 2 2 にゲル化した栄養因子や薬物を充填すれば、長期にわたってこれらの物質が移植部位において放出されるようにできる。

【 0 0 5 1 】

[磁性体]

血管再生用移植材料 A は、磁性体が接続されていてもよい。血管再生用移植材料 A に磁性体を接続することで、磁気発生装置を用いて、血管再生用移植材料 A を組織中の目的の部位に誘導して留置できる。

30

【 0 0 5 2 】

磁性体の材料としては、例えば、鉄、ニッケル、コバルトならびにこれらの合金 (鉄クロムコバルト合金、アルミニウムコバルト合金等)、フェライト、希土類磁石及び磁性ステンレスなどの任意の金属材料を用いることができる。希土類磁石としては、サマリウムコバルト (SmCo) 磁石、ネオジウム (NdFeB) 磁石などが挙げられる。磁性体には、これらの金属材料を、生体適合性を有する材料であって、従来注射針などのコートに用いられている材料で被覆したものをを用いてもよい。生体適合性材料としては、例えば、パラキシリレン系ポリマーであるパリレン (登録商標)、シリコン、ポリプロピレン及びテトラフルオロエチレンなどが挙げられる。金属材料として鉄クロムコバルト合金 (FeCrCo) を使用する場合、市販 FeCrCo 線を熱により引き伸ばしたナノワイヤを使用できる。

40

【 0 0 5 3 】

磁性体は、血管再生用移植材料 A の一端に連結されていてもよく、血管再生用移植材料 A の管腔に少なくとも一部を挿入した状態で固定されていてもよい。

【 0 0 5 4 】

磁性体を血管再生用移植材料 A の一端に連結するためには、磁性体の一端と血管再生用移植材料 A の一端とを糊剤や熱融着により結合させる。磁性体と血管再生用移植材料 A を 1 ケ所結合することで、外部磁場により磁性体と血管再生用移植材料 A を同時に制御でき

50

る。糊剤として例えば0.5%濃度でポリ乳酸(PLLA)とクロロホルムを混合した糊剤を使用できる。熱融着の場合、200程度のハンダコテを血管再生用移植材料Aにあてて融着してもよい。磁性体の一端と血管再生用移植材料Aの一端とを機械的に結合させる方法も考えられる。

【0055】

磁性体を血管再生用移植材料Aの管腔に少なくとも一部を挿入した状態で固定するためには、血管再生用移植材料Aの管腔に磁性体を挿し込み、200程度で数秒加熱し、糸を溶融させ磁性体と接着する。また、薬剤で接着してもよい。

【0056】

磁気発生装置による磁性体の誘導と組織内への挿入を容易にするため、磁性体は細い針状あるいは棒状に形成されることが好ましい。針状あるいは棒状とした磁性体(以下「針状磁性体」という)は、極細磁石であることが好ましい。磁性体を極細とすることで、血管再生用移植材料Aの挿入あるいは留置に伴う、組織の出血や損傷を最小限に抑えることができる。

【0057】

針状磁性体の直径は、挿入すべき組織の特性および損傷の程度に応じて適宜選択することができ、例えば、200 μm 以下、好ましくは100 μm 以下、さらに好ましくは10 μm 以下とされる。針状磁性体の直径は、血管再生用移植材料Aの外径より小さいことが望ましい。針状磁性体の長さも、挿入すべき組織の特性および損傷の程度に応じて適宜選択することができる。

【0058】

磁場発生装置としては、例えば、国際公開第2001/061474号に開示される磁場制御装置を用いることができる。磁場発生装置は、電磁石と、発生する磁場を制御する制御装置とを備え、先端に誘導針を有する。誘導針は、電磁石から発生した磁場の磁束密度を高めるための磁性金属の針である。血管再生用移植材料Aを挿入する組織の付近に誘導針を密着させるかまたは挿入した後、制御装置を操作して磁場を発生させる。磁場の強度と誘導針の位置を調節することにより、磁性体を誘導して、血管再生用移植材料Aを組織内の所望の位置に挿入・留置できる。

【0059】

この際、高感度磁気センサーを利用することにより、磁性体の正確な位置をモニターできる。高感度磁気センサーを利用した手術中のモニター方法として、例えばホール素子、MI(磁気インピーダンス)センサー、SQUID(超伝導量子干渉素子)センサーの利用が考えられる。

【0060】

2. 第二実施形態に係る血管再生用移植材料

図2は、本発明の第二実施形態に係る血管再生用移植材料を説明する図である。血管再生用移植材料Bは、外管1の管腔に、内管が複数配設されている点で、上述の血管再生用移植材料Aと異なる。すなわち、本実施形態の血管再生用移植材料Bでは、外管1の管腔に、3つの内管2a、2b、2cが配された多重管構造とされている。なお、外管1の管腔に配設される内管の数は2又は4以上であってもよい。

【0061】

血管再生用移植材料Bを構成する撚糸4(及び生分解性単糸3)、外管1及び内管2a、2b、2cの中空管状構造、間隙5等は、血管再生用移植材料Aと同じであるので詳細な説明を割愛する。

【0062】

内管2aは、外管1の管腔径 d_1 よりも小さい外径 D_{2a} を有する。内管2aの外径 D_{2a} は、例えば、外管1の管腔径 d_1 の70%、60%、50%、40%、30%、20%、10%あるいは5%程度とされる。内管2b、2cについても同様であるが、内管2a、2b、2cの外径は同一であっても異なってもよい。

【0063】

10

20

30

40

50

多重管構造は以下の手順により作製できる。まず、芯の周りに撚糸 4 を編み込んで外管 1 を作製する。次に、外管 1 の作製に用いた芯よりも径の小さな芯の周りに撚糸 4 を編み込んで内管 2 a、2 b、2 c を作製する。そして、芯を抜き取った後の外管 1 の管腔に、内管 2 a、2 b、2 c を芯とともに挿入する。最後に、内管 2 a、2 b、2 c の芯を順に抜き取ることで、多重管構造を有する血管再生用移植材料 B を得る。使用する芯の径は、外管 1 の管腔径 d_1 、内管 2 a の管腔径 d_{2a} (及び内管 2 b、2 c の管腔径) に応じて適宜設定すればよい。同様に、2 又は 4 以上の内管を配置することもできる。

【0064】

外管 1 及び内管 2 a (及び内管 2 b、2 c) の径の一例として以下の数値が挙げられる。

外管 1 : 外径 D_1 600 μm 、管腔径 d_1 500 μm

内管 2 a : 外径 D_{2a} 200 μm 、管腔径 d_{2a} 100 μm

【0065】

血管再生用移植材料 B は、外管 1 の管腔に、外管 1 の管腔内面と、内管 2 a、2 b、2 c の外面とにより構成される空間 1 1 を備えている。この空間 1 1 は、生体に内在する細胞あるいは移植材料とともに移植した細胞による組織再生のためのスペースとなる。

【0066】

血管再生用移植材料 B は、多重管構造を有し、内管 2 a、2 b、2 c が外管 1 の芯材としても機能するため、耐キンキング性に優れ、筋肉のように収縮運動の盛んな臓器へ移植した場合にも外管 1 及び内管 2 a、2 b、2 c の管腔が閉塞し難い。血管再生用移植材料 B は、外管 1 の管腔に複数の内管を配することで、上述の血管再生用移植材料 A に比して、より高い耐キンキング性が得られる。

【0067】

また、仮に外力を受けて外管 1 が変形した場合にも、空間 1 1 が外管 1 の変形を緩衝し内管 2 a、2 b、2 c の変形を防止するため、内管 2 a、2 b、2 c の管腔 (図 2 (B) 符号 2 2 a、2 2 b、2 2 c 参照) を維持できる。従って、血管再生用移植材料 B では、移植部位において再生組織のための十分なスペースを確保し、該スペースにおける細胞の移動や、酸素、血液及び細胞外液の流れを促進して、効果的に血管の再生を誘導できる。より具体的には、組織中から外管 1 及び内管 2 a、2 b、2 c の管腔に入った遊走細胞や、管腔に充填されていた移植細胞が、空間 1 1 及び内管 2 a、2 b、2 c の管腔 2 2 a、2 2 b、2 2 c に沿って宿主の細胞に邪魔されることなく成長できるため、新生血管の伸長を促進できる。

【0068】

血管再生用移植材料 B には、上述した細胞接着分子、ヘパリン及びノ又はヘパラン硫酸、成長因子、ウイルスベクター等を結合させてもよく、必要に応じて磁性体を結合させてもよい。この場合、内管 2 a、2 b、2 c には、それぞれ異なる細胞接着分子等を結合させることもできる。

【0069】

また、空間 1 1 及び内管 2 a、2 b、2 c の管腔 2 2 a、2 2 b、2 2 c には、血管系細胞及びノ又は血管系細胞に分化する細胞が充填されていてもよく、ゲル化した栄養因子や薬物が充填されていてもよい。各管腔には、それぞれ細胞及びノ又は薬物を任意の組み合わせで充填できる。本実施形態に係る血管再生用移植材料 B では、内管を 3 つ配しているため、空間 1 1 及び内管 2 a、2 b、2 c の各管腔に充填する細胞や薬物について多様な組み合わせを実現できる。他方、上述の第一実施形態に係る血管再生用移植材料 A は、空間 1 1 及び内管 2 の管腔 2 2 を比較的広くとることができるため、多量の細胞や薬物を充填、移植するために適している。

【0070】

空間 1 1 及び内管 2 a、2 b、2 c の管腔 2 2 a、2 2 b、2 2 c に充填する細胞や薬物の組み合わせは例えば以下のようにできる。2 又は 4 以上の内管が配されている場合にも同様に種々の組み合わせが可能である。

10

20

30

40

50

【 0 0 7 1 】

【表 1】

	組合せ例A	組合せ例B	組合せ例C	組合せ例D
空間 1 1	なし	なし	なし	薬物 1
管腔 2 2 a	なし	なし	なし	なし
管腔 2 2 b	薬物 1	細胞 1	薬物 1	薬物 2
管腔 2 2 c	細胞 1	細胞 2	薬物 2	細胞 1

10

【 0 0 7 2 】

3. 第三実施形態に係る血管再生用移植材料

図 3 は、本発明の第三実施形態に係る血管再生用移植材料を説明する図である。血管再生用移植材料 C は、外管 1 の管腔に配置された第 1 の内管 2 d の管腔にさらに第 2 の内管 2 e が配設されている点で、上述の血管再生用移植材料 A と異なる。すなわち、本実施形態の血管再生用移植材料 C においては、第一の内管 2 d は、外管 1 に対しての内管であると同時に、第 2 の内管 2 e に対しての外管ともなっている。血管再生用移植材料 C は、3 つの管状構造体（外管 1、第 1 の内管 2 d、第 2 の内管 2 e）が「入れ子」になった多重管構造とされている。「入れ子」構造は、図に示す 3 重構造に限られず、4 重以上であってもよい。

20

【 0 0 7 3 】

血管再生用移植材料 C を構成する 4（及び生分解性単糸 3）、外管 1 及び第 1・第 2 の内管 2 d、2 e の中空管状構造、間隙 5 等は、血管再生用移植材料 A と同じであるので詳細な説明を割愛する。

【 0 0 7 4 】

第 1 の内管 2 d は、外管 1 の管腔径 d_1 よりも小さい外径 D_{2d} を有する。また、第 2 の内管 2 e は、第 1 の内管 2 d の管腔径 d_{2d} よりも小さい外径 D_{2e} を有する。第 1 の内管 2 d の外径 D_{2d} は、例えば、外管 1 の管腔径 d_1 の 90%、80%、70%、60%、50%、40%、30%、20% あるいは 10% 程度とされる。同様に、第 2 の内管 2 e の外径 D_{2e} は、例えば、第 1 の内管 2 d の管腔径 d_{2d} の 90%、80%、70%、60%、50%、40%、30%、20% あるいは 10% 程度とされる。

30

【 0 0 7 5 】

多重管構造は以下の手順により作製できる。まず、芯の周りに撚糸 4 を編み込んで外管 1 を作製する。次に、外管 1 の作製に用いた芯よりも径の小さな芯の周りに撚糸 4 を編み込んで第 1 の内管 2 d を作製する。さらに、第 1 の内管 2 d の作製に用いた芯よりも径の小さな芯の周りに撚糸 4 を編み込んで第 2 の内管 2 e を作製する。そして、芯を抜き取った後の外管 1 の管腔に、第 1 の内管 2 d を芯とともに挿入した後、芯を抜き取る。さらに、芯を抜き取った後の第 1 の内管 2 d の管腔に、第 2 の内管 2 e を芯とともに挿入した後、芯を抜き取ることで、多重管構造を有する血管再生用移植材料 C を得る。使用する芯の径は、外管 1 の管腔径 d_1 及び第 1・第 2 の内管 2 d、2 e の管腔径 d_{2d} 、 d_{2e} に応じて適宜設定すればよい。同様にして、4 重以上の構造を作製することもできる。

40

【 0 0 7 6 】

外管 1 及び第 1・第 2 の内管 2 d、2 e の径の一例として以下の数値が挙げられる。

外管 1：外径 D_1 700 μm 、管腔径 d_1 600 μm

第 1 の内管 2 d：外径 D_{2d} 400 μm 、管腔径 d_{2d} 300 μm

第 2 の内管 2 e：外径 D_{2e} 200 μm 、管腔径 d_{2e} 100 μm

【 0 0 7 7 】

血管再生用移植材料 C は、外管 1 の管腔に、外管 1 の管腔内面と、第 1 の内管 2 d の外

50

面とにより構成される空間 1 1 を備えている。また、第 1 の内管 2 d の管腔にも、第 1 の内管 2 d の管腔内面と、第 2 の内管 2 e の外面とにより構成される空間 2 2 d を備えている。これらの空間 1 1、2 2 d は、生体に内在する細胞あるいは移植材料とともに移植した細胞による組織再生のためのスペースとなる。

【 0 0 7 8 】

血管再生用移植材料 C は、多重管構造を有し、第 1・第 2 の内管 2 d、2 e が外管 1 の芯材としても機能するため、耐キンキング性に優れ、筋肉のように収縮運動の盛んな臓器へ移植した場合にも外管 1 及び内管 2 d、2 e の管腔が閉塞し難い。血管再生用移植材料 C は、「入れ子」状の多重構造とされることで、上述の血管再生用移植材料 A に比してより高い耐キンキング性を発揮する。

10

【 0 0 7 9 】

また、仮に外力を受けて外管 1 が変形した場合にも、空間 1 1 が外管 1 の変形を緩衝し、第 1 の内管 2 d の変形を防止する。さらに、仮に第 1 の内管 2 d までもが変形した場合にも、空間 2 2 d が第 1 の内管 2 d の変形を緩衝し、第 2 の内管 2 e の変形を防止する。このため、空間 2 2 d 及び第 2 の内管 2 e の管腔（図 3（B）符号 2 2 e 参照）が維持される。従って、血管再生用移植材料 C では、移植部位において再生組織のための十分なスペースを確保し、該スペースにおける細胞の移動や、酸素、血液及び細胞外液の流れを促進して、効果的に血管の再生を誘導できる。より具体的には、組織中から外管 1 及び内管 2 d、2 e の管腔に入った遊走細胞や、管腔に充填されていた移植細胞が、空間 1 1、2 2 d 及び第 2 の内管 2 e の管腔 2 2 e に沿って宿主の細胞に邪魔されることなく成長できるため、新生血管の伸長を促進できる。

20

【 0 0 8 0 】

血管再生用移植材料 C には、上述した細胞接着分子、ヘパリン及び / 又はヘパラン硫酸、成長因子、ウイルスベクター等を結合させてもよく、必要に応じて磁性体を結合させてもよい。この場合、外管 1 及び内管 2 d、2 e には、それぞれ異なる細胞接着分子等を結合させることもできる。

【 0 0 8 1 】

また、空間 1 1、2 2 d 及び第 2 の内管 2 e の管腔 2 2 e には、血管系細胞及び / 又は血管系細胞に分化する細胞が充填されていてもよく、ゲル化した栄養因子や薬物が充填されていてもよい。各管腔には、それぞれ細胞及び / 又は薬物を任意の組み合わせで充填できる。本実施形態に係る血管再生用移植材料 C では、3 つの管状構造体（外管 1、第 1 の内管 2 d、第 2 の内管 2 e）が「入れ子」になって配されているため、空間 1 1、2 2 d 及び第 2 の内管 2 e の管腔 2 2 e に充填する細胞や薬物について多様な組み合わせを実現できる。

30

【 0 0 8 2 】

空間 1 1、2 2 d 及び第 2 の内管 2 e の管腔 2 2 e に充填する細胞や薬物の組み合わせは例えば以下のようにできる。4 重以上の構造とする場合にも同様に種々の組み合わせが可能である。

【 0 0 8 3 】

【表 2】

40

	組合せ例 A	組合せ例 B	組合せ例 C	組合せ例 D
空間 1 1	なし	なし	なし	薬物 1
空間 2 2 d	薬物 1	薬物 1	細胞 1	細胞 1
管腔 2 2 e	細胞 1	薬物 2	細胞 2	薬物 2

【 0 0 8 4 】

50

さらに、本発明に係る血管再生用移植材料は、上述の第二実施形態における多重管構造と、第三実施形態における多重管構造とを組み合わせた構造を有していてもよいものとする。

【0085】

4. 血管再生用移植材料の敷設方法

本発明に係る血管再生用移植材料の敷設様式としては、(1)全体を皮下及び/又は筋肉内に埋設する方式、(2)両端部を体外に露出し、中央部のみを皮下及び/又は筋肉内に埋設する方式、(3)片端部を体外に露出し、残余の部を皮下及び/又は筋肉内に埋設する方式のいずれであってもよい。

【0086】

[磁気による敷設]

本発明に係る血管再生用移植材料が磁性体を備える場合には、上述の通り、磁気発生装置を用いて組織中の目的の部位へ誘導し、敷設することができる。また、この際、高感度磁気センサーを用いることで、磁性体の位置をモニターして、血管再生用移植材料を目的の位置へ正確に移植できる。

【0087】

磁性体は、無害な鉄を用いる場合には挿入部位にそのまま留置してもよいし、磁性体を体外に導き出した後に、磁性体を血管再生用移植材料から切り離し、血管再生用移植材料のみを体内に留置してもよい。安全性を考慮すると血管再生用移植材料のみを体内に留置することが好ましい。

【0088】

比較的長い針状磁性体を血管再生用移植材料の管腔に挿入した構造の場合、血管再生用移植材料の全長に磁力線を挿入することが可能となるため強力な磁場誘導効果が得られる。

【0089】

[ガイドワイヤによる敷設]

また、本発明に係る血管再生用移植材料は、磁場を使用せずに、手動的に組織に挿入し、敷設することもできる。ガイドワイヤが目的部位へ到達したかは、例えばX線カメラ透視により確認できる。

【0090】

図4に本発明に係る血管再生用移植材料の敷設に使用可能なガイドワイヤを例示する。

【0091】

(A)に示す筒状のガイドワイヤは、先端の開口から血管再生用移植材料を通して用いるものであり、太い血管再生用移植材料の敷設に適する。先端は、筋肉内に進入できるように鋭利となっている。このガイドワイヤでは、上記(1)~(3)の敷設様式が可能である。また、二本以上の血管再生用移植材料を同時に敷設することもできる。

【0092】

(B)に示すガイドワイヤは、先端部の溝に血管再生用移植材料を引っ掛けて用いる。先端は、筋肉内に進入できるように鋭利となっている。このガイドワイヤでは、先端を目的部位まで挿入後引き抜くだけで敷設でき、上記(2)(3)の敷設様式が可能である。また、二本以上の血管再生用移植材料を同時に敷設することもできる。

【0093】

(C)に示すガイドワイヤは、先端の孔に血管再生用移植材料を通して用いるものである。先端は、筋肉内に進入できるように鋭利となっている。このガイドワイヤでは、上記(1)(2)の敷設様式が可能である。

【0094】

また、図に示さないが、血管再生用移植材料の一端を閉鎖端とし、開口端である他の一端から血管再生用移植材料の管腔に挿入したガイドワイヤを用いて、血管再生用移植材料を組織中の目的の部位へ誘導してもよい。目的の部位へ挿入した後、開口端からガイドワイヤを引き抜く、あるいは、閉鎖端を切断して開口させ該開口からガイドワイヤを抜き取

10

20

30

40

50

る。

【0095】

ガイドワイヤの長さは、通常、血管再生用移植材料の体内敷設長よりも長くされる。ガイドワイヤの長さは、臓器の種類や敷設部位などに応じて適宜設定されるものであり、特に限定されない。ガイドワイヤの材質は、特に限定されず、非磁性金属あるいはテフロン（登録商標）、ポリプロピレン、ポリエチレンなどの有機素材を使用できる。

【0096】

[縫い込みによる敷設]

さらに、本発明に係る血管再生用移植材料を用手的に組織に敷設する方法として、通常の手術系のように、血管再生用移植材料を組織に縫い込む方法も採用できる。この方法は、細い血管再生用移植材料の敷設に適する。

10

【0097】

以上のようにして、血管再生用移植材料を敷設することにより、例えば虚血部位では、血管再生用移植材料に沿って血管が再生する。これにより、侵襲と危険が伴う血管再建術を行うことなく、心筋梗塞や、動脈硬化による下肢虚血（主に糖尿病）を治療できる可能性がある。また、血管内皮細胞あるいはその前駆細胞を血管再生用移植材料に付着させて、好ましくは血管再生用移植材料の管腔に充填して移植すれば、細胞を単に注入するだけの従来法ではほとんど不可能であった長い血管を目的臓器内に再生させることも可能となる。

【0098】

本発明の血管再生用移植材料は、動物に移植して血管を再生させることができる。動物種は、特に限定されないが、好ましくはヒト、サル、イヌ、ネコ、ウサギ、ウマ、ヒツジ、マウス、ラット等であり、更に好ましくは、ヒト、サル、イヌ、ネコ等であり、最も好ましくは、ヒトである。また、血管再生用移植材料は、上記のとおり作製することもできるが、購入することもできる。

20

【実施例】

【0099】

<参考例1：中空管状構造体の作製>

芯（直径100，500 μ mのポリグリコール酸繊維（PGA））の周りにポリグリコール酸繊維（直径10 μ mの単糸を4～8本撚り合わせて使用）を編み込んで中空管状構造体（外管あるいは内管に相当）を作製した。

30

【0100】

ヘパリンを10 μ g/mlで0.1N-リン酸バッファ（pH7.2）に溶解し、中空管状構造体を浸漬した（室温、16時間）。次に、中空管状構造体をリン酸バッファで洗浄し、乾燥させてヘパリン結合中空管状構造体とした。

【0101】

ヘパリン結合中空管状構造体をVEGF溶液に浸漬することによって、中空管状構造体にヘパリンを介してVEGFを結合させた。

【0102】

<参考例2：遺伝子導入用ベクターを結合した中空管状構造体による遺伝子導入>

40

参考例1で得た中空管状構造体を、GFP遺伝子を組み込んだアデノ随伴ウイルス（AAV）の溶液（ウイルス濃度 1×10^{12} viral particle/mlのリン酸バッファ）に浸漬し、37 $^{\circ}$ Cで1時間反応させた後、リン酸バッファで洗浄した。293細胞を培養皿一面に培養し、その上にAAVを搭載した中空管状構造体を載せ、3週間培養した。

【0103】

図5-1に示されるように、中空管状構造体に触れた細胞のみが緑色蛍光を発していた。このことは、AAVが中空管状構造体からほとんど離脱しないこと、及びAAVが活性を持った状態で中空管状構造体に結合していることを示している。なお、図5-2は、図5-1に示した写真において、中空管状構造体と、これに接触しかつGFPを発現する細

50

胞と、が位置している領域を模式的に示した図である。

【0104】

<実施例1：血管再生用移植材料の筋肉内への移植>

参考例1で得た一重管構造を有する中空管状構造体（以下、本実施例及び実施例2、3において単に「中空管状構造体」という）のうち管腔径500 μ mのもの及び管腔径100 μ mのものを、ラット下肢の皮下結合組織に縫い込んで移植した。3日後に、中空管状構造体を縫い込んだ部位を採取し、定法に従って組織切片を作製し、光学顕微鏡により観察した。結果を図6-1(A)及び(B)に示す。

【0105】

また、参考例1で得た中空管状構造体のうち管腔径100 μ mのものをラット下肢の筋肉内に縫い込んで移植した。さらに、参考例1で得た中空管状構造体のうち管腔径500 μ mのもの及び管腔径100 μ mのものをそれぞれ外管及び内管とし、芯を抜き取った外管の管腔に内管を芯とともに挿入し、内管の芯を抜き取ることで、二重管構造を有する中空管状構造体（すなわち、血管再生用移植材料）を得た。得られた血管再生用移植材料を、ラット下肢の筋肉内に縫い込んで移植した。3日後に、中空管状構造体あるいは血管再生用移植材料を縫い込んだ部位を採取し、定法に従って組織切片を作製し、光学顕微鏡により観察した。結果を図6-1(C)及び(D)に示す。

【0106】

皮下結合組織に移植した場合には、管腔径500 μ m及び管腔径100 μ mのいずれの中空管状構造体でも、移植3日後にも、管腔が維持されていた（図6-1(A)及び(B)、中空管状構造体及び管腔を模式的に示した図6-2(A)及び(B)を参照）。しかし、筋肉内に移植した場合には、管腔径100 μ mの管状構造体では、移植3日後には管腔が閉塞し、管状構造が崩壊していた（図6-1及び図6-2の(C)参照）。一方、二重管構造を有する血管再生用移植材料では、筋肉内への移植後3日においても、内管の管腔スペースを維持でき、外管の管腔内面と内管の外面とにより構成された空間も維持できていることが明らかとなった（図6-1及び図6-2の(D)参照）。

【0107】

<実施例2：VEGFコート血管再生用移植材料の下肢虚血モデルマウス（ヌードマウス）への移植>

参考例1により管腔径100 μ mの中空管状構造体を得た。二重管構造を有する血管再生用移植材料は、参考例1により得た芯を抜き取った外管（管腔径500 μ m）の管腔に芯を抜き取った内管（管腔径100 μ m）を挿入することにより得た。

【0108】

ヘパリン（シグマ）を10mg/mlで注射用蒸留水に溶解し、中空管状構造体及び血管再生用移植材料を浸漬した（室温、16時間）。次に、中空管状構造体及び血管再生用移植材料を注射用蒸留水で洗浄し、ヘパリン結合中空管状構造体及びヘパリン結合血管再生用移植材料とした。

【0109】

組換えマウスVEGF（R&D systems）を5 μ g/mlになるようにリン酸緩衝生理食塩水に溶解し、ヘパリン結合中空管状構造体及びヘパリン結合血管再生用移植材料を浸漬した（室温、2時間）。次に、中空管状構造体及び血管再生用移植材料をリン酸緩衝生理食塩水で洗浄し、VEGFが結合した中空管状構造体及び血管再生用移植材料を得た。

【0110】

下肢虚血モデル動物への血管再生用移植材料の移植は以下のように行った。ヌードマウス（CAN.N.cg-Foxn1nu、チャールズリバー）の雌に、ソムノペンチル（登録商標）（共立製薬）を腹腔内投与することで全身麻酔を行った。右側下肢の皮膚を切開し、腹壁直下にて大腿動静脈を縫合系にて結紮し、縫合部位から伏在動静脈にかけて血管を剥離した。続いて、大腿二頭筋に、VEGFが結合した中空管状構造体又は血管再生用移植材料を縫合針で縫い込むことにより移植した。皮膚を縫合し、移植部位を閉じた。

10

20

30

40

50

【0111】

移植3週間後に、アパーチン(2, 2, 2 トリプロモエタノール、シグマ)麻酔下にて放血させることにより安楽死させた。移植用足場材を縫い込んだ部位を採取し、10%中性緩衝ホルマリンにて固定した。定法に従って組織のパラフィン切片を作製し、ヘマトキシリン(武藤化学)、エオシン(武藤化学)による染色を行った。光学顕微鏡(キーエンスBIOREVO X710)により観察した。

【0112】

結果を図7に示す。(A)は中空管状構造体の移植部、(B)は血管再生用移植材料の移植部を示す。下肢筋肉に移植した3週間後、一重管構造を有する中空管状構造体は管腔が閉塞し、管状構造が崩壊していた。一方、二重管構造を有する血管再生用移植材料を移植した場合は、内管の管腔スペースを維持でき、外管の管腔内面と内管の外表面により構成された空間も維持できていることが明らかとなった。

10

【0113】

<実施例3: VEGFコート血管再生用移植材料の下肢虚血モデルマウス(C57BL/6J)への移植>

次に、別のマウス系統において血管再生用移植材料の内部の管腔スペースの確保を確認するとともに、血管再生用移植材料の内部の血管再生を実証するための実験を実施した。C57BL/6Jマウス(チャールズリバー)の雌を用いて、実施例2と同様にして、下肢虚血モデルを作製し、VEGFを結合した中空管状構造体又は血管再生用移植材料を移植した。

20

【0114】

移植3週間後に、ビオチン結合トマトレクチン(ベクターラボラトリーズ)1mg/ml、100 μ lを尾静脈注射し、注射7分後にアパーチン麻酔薬の腹腔内投与を行い、注射10分後に開胸してリン酸緩衝生理食塩水20mlを灌流、さらに2%パラホルムアルデヒド溶液20mlを灌流した。

【0115】

中空管状構造体又は血管再生用移植材料を縫い込んだ部位を採取し、10%中性緩衝ホルマリンにて固定した。定法に従って組織のパラフィン切片を作製し、ヘマトキシリン、エオシン染色を行った。血管内皮細胞のマーカーであるCD31の抗体を用いた免疫組織染色を以下のように行った。0.5M Tris-HClバッファー(pH10.0)中での加熱処理により抗原の賦活化を行い、10%ロバ血清(ジャクソンイムノリサーチ)によるブロッキング後、ウサギ抗CD31抗体(アブカム)、enbisionキット+HRP・抗ウサギ(ダコ)およびDAB+(3,3'-ジアミノベンジジンテトラヒドロクロライド)基質キットを用いて染色を行った。また、静脈注射したビオチン結合トマトレクチンを検出するため、1mM EDTA溶液中での加熱処理により抗原の賦活化を行い、5%スキムミルク(BDバイオサイエンス)によるブロッキング後、西洋ワサビパーオキシダーゼ(HRP)標識ストレプトアビジン(サーモサイエンティフィック)およびDAB+基質キット(ダコ)を用いて染色を行った。光学顕微鏡(キーエンスBIOREVO X710)により観察した。

30

【0116】

結果を図8に示す。(A)は中空管状構造体の移植部、(B)は血管再生用移植材料の移植部を示す。下肢筋肉に移植した3週間後、一重管構造を有する中空管状構造体は管腔が一部閉塞していた。一方、二重管構造を有する血管再生用移植材料を移植した場合は、内管の管腔スペースを維持でき、外管の管腔内面と内管の外表面により構成された空間も維持できていることが明らかとなった。実施例1の移植後3日の結果に加え、実施例2と実施例3の移植後3週間の結果からも、二重管構造を有する血管再生用移植材料の有用性が明らかとなった。

40

【0117】

CD31の染色を行うことにより、二重管構造を有する血管再生用移植材料の内部の血管再生を確認した。結果を図9に示す。内管の管腔スペース、および外管の管腔内面と内

50

管の外面により構成された空間のいずれにおいても、CD31陽性の血管が形成されていることが明らかとなった。

【0118】

静脈注射したビオチン結合トマトレクチンを検出することにより、二重管構造を有する血管再生用移植材料の内部の、血流を伴う機能的な血管再生を評価した。結果を図10に示す。内管の管腔スペース、および外管の管腔内面と内管の外面により構成された空間のいずれにおいても、静脈注射したトマトレクチン陽性となる機能的な血管が形成されていることが明らかとなった。

【産業上の利用可能性】

【0119】

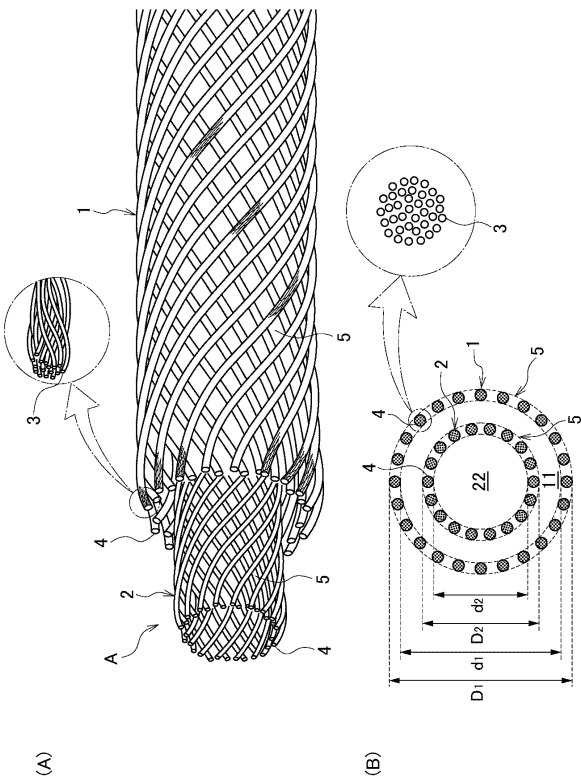
本発明に係る血管再生用移植材料は、糖尿病の合併症や癌、リウマチ等による血管障害の治療を目的とした、血管の再生医療に有用である。

【符号の説明】

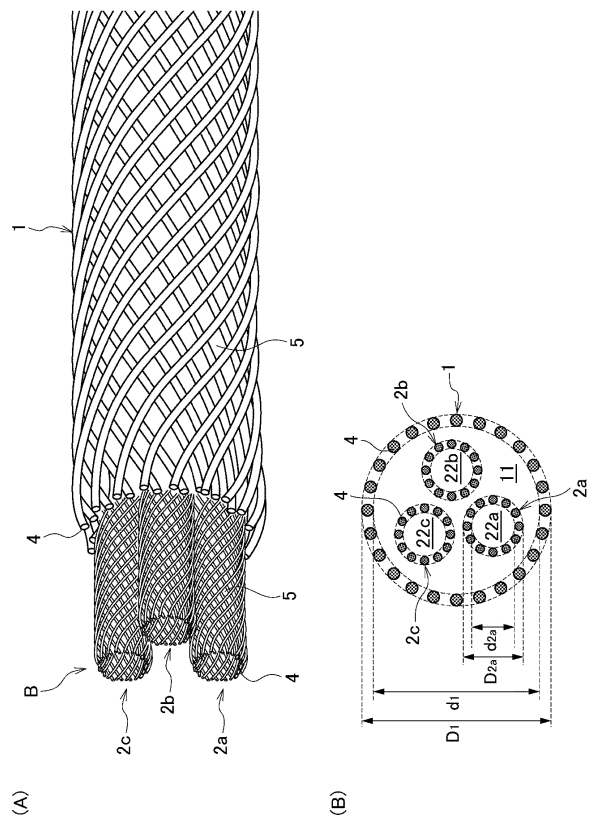
【0120】

1：外管、2，2a，2b，2c：内管、2d：第1の内管、2e：第2の内管、3：生分解性単糸、4：撚糸、5：間隙、11，22d：空間

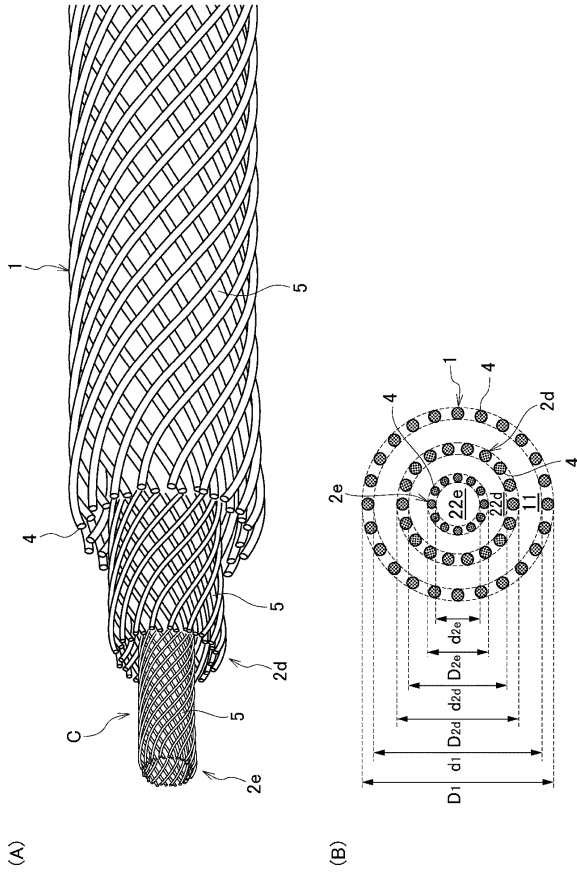
【図1】



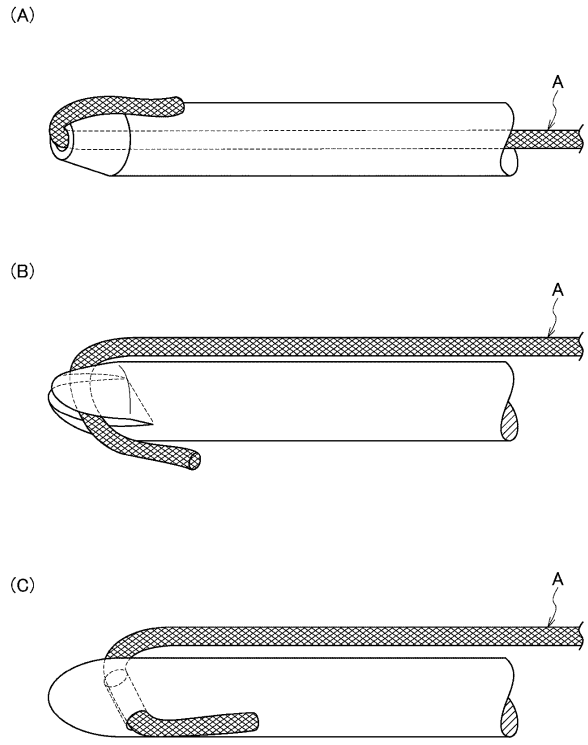
【図2】



【図3】



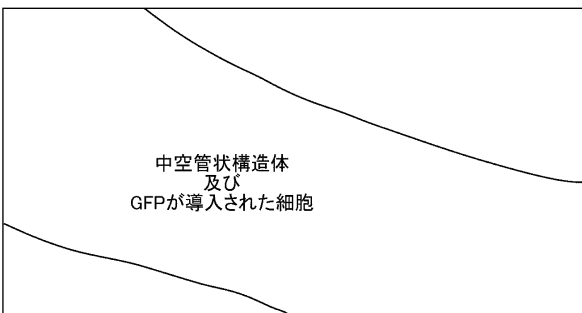
【図4】



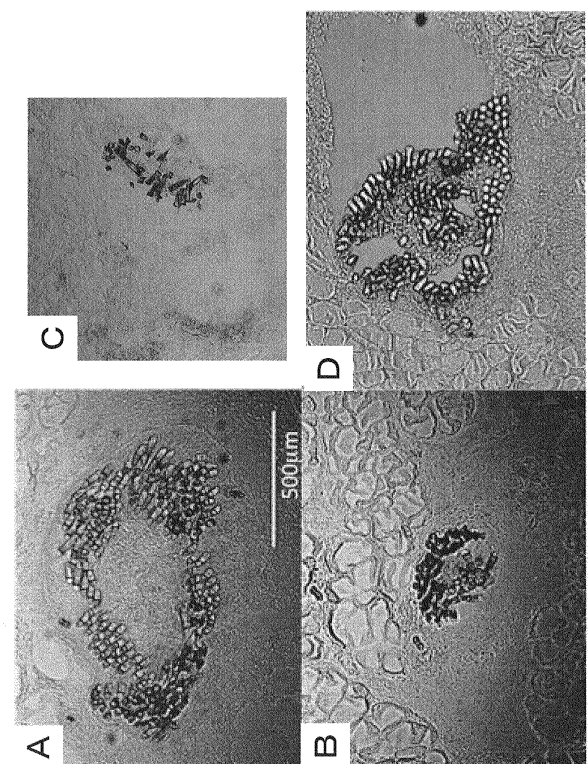
【図5 - 1】



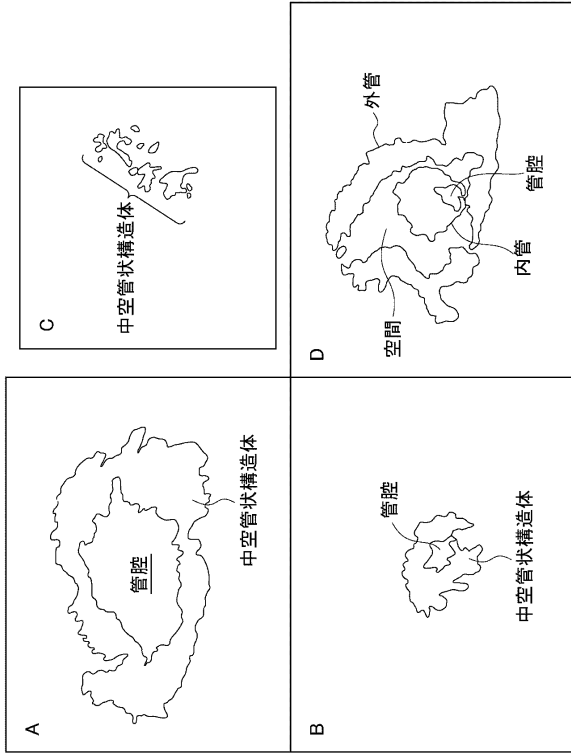
【図5 - 2】



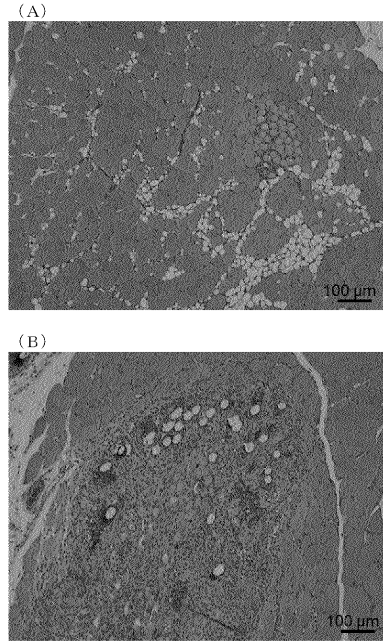
【図6 - 1】



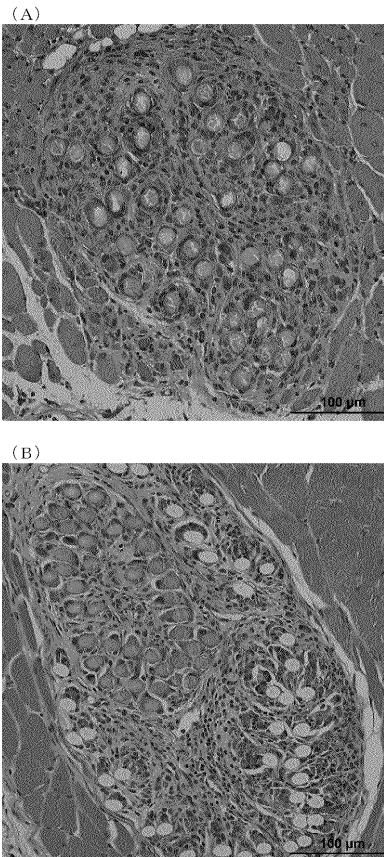
【 図 6 - 2 】



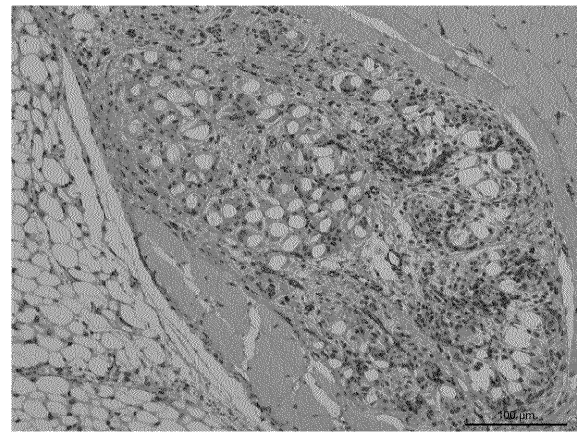
【 図 7 】



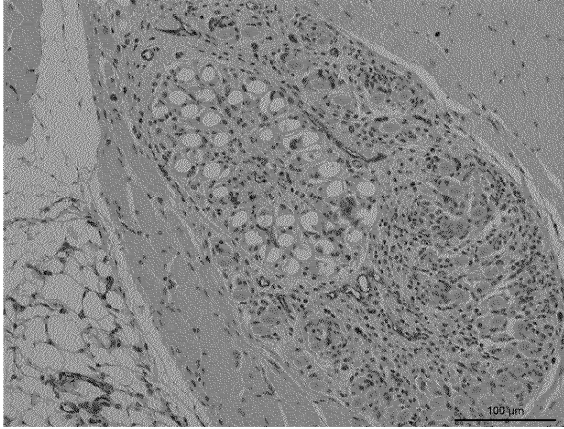
【 図 8 】



【 図 9 】



【図 10】



フロントページの続き

(74)代理人 100173185

弁理士 森田 裕

(72)発明者 小野寺 宏

東京都文京区本郷7-3-1

(72)発明者 西岡 恵理

兵庫県神戸市中央区港島南町六丁目8番地2 株式会社カン研究所内

審査官 佐々木 大輔

(56)参考文献 特開昭61-288865(JP,A)

特開2004-313310(JP,A)

特開平04-250167(JP,A)

特開2012-120696(JP,A)

J. Biomed. Mater. Res. A., 2003, Vol.65, No.2, pp.170-181

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

A61L 15/00-33/18

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamIII)

CPlus/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS/WPIDS(STN)