

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第5483035号  
(P5483035)

(45) 発行日 平成26年5月7日(2014.5.7)

(24) 登録日 平成26年2月28日(2014.2.28)

(51) Int.Cl. F 1  
**A 6 1 L 27/00 (2006.01)** A 6 1 L 27/00 G

請求項の数 13 (全 16 頁)

<p>(21) 出願番号 特願2011-530958 (P2011-530958)                  (86) (22) 出願日 平成21年10月12日 (2009.10.12)                  (65) 公表番号 特表2012-505013 (P2012-505013A)                  (43) 公表日 平成24年3月1日 (2012.3.1)                  (86) 国際出願番号 PCT/KR2009/005839                  (87) 国際公開番号 W02010/044577                  (87) 国際公開日 平成22年4月22日 (2010.4.22)                  審査請求日 平成23年5月17日 (2011.5.17)                  (31) 優先権主張番号 10-2008-0100005                  (32) 優先日 平成20年10月13日 (2008.10.13)                  (33) 優先権主張国 韓国 (KR)</p>	<p>(73) 特許権者 511092055                  アジュウ ユニバーシティー インダスト                  リー アカデミック コーアベレイション                  ファンデーション                  大韓民国 443-749 キョンギード                  , スウォンシ, ヨントング, ウォンチョン                  ドン, サン5                  (74) 代理人 100091683                  弁理士 ▲吉▼川 俊雄                  (72) 発明者 ミン, ビョンヒョン                  大韓民国 431-076 キョンギード                  , アンヤンシ, ドンアング, グイインドン                  , グムマウル, ウソンアパート, 201ド                  ン, 1405ホ</p>
--	---

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 動物組織の粉末を利用した多孔性3次元支持体の製造方法およびこれを利用して製造された多孔性3次元支持体

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

- (a) 天然素材の動物由来組織を粉末化する段階と、
- (b) 前記動物由来組織の粉末化の以前または以後に、或いは粉末化と同時に脱細胞化する段階と、
- (c) 前記脱細胞化した動物由来組織の粉末とポロゲン (porogen) である塩粒子とを混合して混合物を得て、前記混合物を余分な有機溶媒で溶解させることなく、前記混合物に架橋剤の溶液を添加することにより、前記脱細胞化した動物由来組織の粉末を架橋結合する段階と、
- (d) 前記(c)段階の後、架橋結合及び脱細胞化した動物由来組織の粉末を、粒子抽出法を利用して多孔性3次元支持体に形成する段階と、を含む動物組織の粉末を利用した多孔性3次元支持体の製造方法。

【請求項2】

脱細胞化した動物由来組織の粉末と粒子抽出法に用いられるポロゲン (porogen) である塩粒子とを混ぜてモールドに入れた後、加圧成形し、使用の目的および治療部位に応じていろいろな形態および大きさを有する多孔性3次元支持体を作製することを特徴とする、請求項1に記載の動物組織の粉末を利用した多孔性3次元支持体の製造方法。

【請求項3】

紫外線 (UV)、EDC、NHS、脱水熱乾燥法 (dehydrothermal method) およびグルタルアルデヒド (glutaraldehyde) で構成された

群から選択された少なくとも1つの方法により、多孔性3次元支持体を架橋する段階をさらに含む、請求項1または請求項2に記載の動物組織の粉末を利用した多孔性3次元支持体の製造方法。

【請求項4】

前記動物由来組織の粉末に一以上の成長因子を入れて凍結乾燥する段階を、さらに含む、請求項1または請求項2に記載の動物組織の粉末を利用した多孔性3次元支持体の製造方法。

【請求項5】

前記粒子抽出法を利用して形成された多孔性3次元支持体に軟骨細胞を接種した上、再培養し組織工学的軟骨組織を収得する段階を、さらに含む、請求項1または請求項2に記載の動物組織の粉末を利用した多孔性3次元支持体の製造方法。

10

【請求項6】

前記動物由来組織は、ブタ、牛、羊、馬、犬または猫から由来した軟骨であることを特徴とする、請求項1または請求項2に記載の動物組織の粉末を利用した多孔性3次元支持体の製造方法。

【請求項7】

前記動物由来組織の粉末は、ブタ軟骨粉末であることを特徴とする、請求項6に記載の動物組織の粉末を利用した多孔性3次元支持体の製造方法。

【請求項8】

前記動物由来組織を粉末化する段階は、動物由来の軟骨組織から軟骨を分離した後、粉碎機を利用して粉碎する段階と、粉碎した軟骨を凍結粉碎機を通して粉碎する段階と、を含むことを特徴とする、請求項1または請求項2に記載の動物組織の粉末を利用した多孔性3次元支持体の製造方法。

20

【請求項9】

前記動物由来組織は、ブタ、牛、羊、馬、犬または猫から由来した羊膜、皮膚、小腸粘膜下組織、筋膜、または脊髄膜であることを特徴とする、請求項1または請求項2に記載の動物組織の粉末を利用した多孔性3次元支持体の製造方法。

【請求項10】

前記脱細胞化する段階は、物理的脱細胞方法、化学的脱細胞方法または物理的および化学的方法を組み合わせた方法により行われることを特徴とする、請求項1または請求項2に記載の動物組織の粉末を利用した多孔性3次元支持体の製造方法。

30

【請求項11】

前記物理的脱細胞方法は、凍結-解凍法、超音波処理または物理的攪はんを含み、前記化学的脱細胞方法は、前記動物由来組織の粉末を低張液、陰イオン性界面活性剤、非イオン性界面活性剤、陽イオン性界面活性剤、DNase、RNaseまたはトリプシンで処理することを特徴とする、請求項10に記載の動物組織の粉末を利用した多孔性3次元支持体の製造方法。

【請求項12】

前記脱細胞化する段階は、0～50の温度範囲で行われることを特徴とする、請求項1または請求項2に記載の動物組織の粉末を利用した多孔性3次元支持体の製造方法。

40

【請求項13】

前記化学的脱細胞方法において、前記低張液はトリス-HCl (Tris-HCl) (pH 8.0) 溶液であり、前記陰イオン性界面活性剤は、ドデシル硫酸ナトリウム (SDS)、デオキシコール酸ナトリウム (sodium deoxycholate)、またはトリトンX-200 (Triton X-200) であり、前記非イオン性界面活性剤は、トリトンX-100 (Triton X-100) であり、前記陽イオン性界面活性剤はCHAPS、スルホベタイン-10 (Sulfobetaine-10, SB-10)、スルホベタイン-16 (SB-16)、またはトリ-n-ブチルホスフェート (Tri-n-butyl phosphate) であることを特徴とする、請求項11に

50

記載の動物組織の粉末を利用した多孔性3次元支持体の製造方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、動物組織の粉末を利用した3次元形態の多孔性支持体製造方法およびこれを利用して製造された3次元形態の多孔性支持体に関するものであって、さらに詳しくは、動物組織の粉末を粒子抽出法で3次元形態の多孔性支持体に製造し、治療ないし使用の目的に適した多様な大きさ、多孔性、形態および構造を有する3次元形態の多孔性支持体を製造する方法およびこれを利用して製造された3次元形態の多孔性支持体に関する。

【背景技術】

【0002】

関節軟骨細胞は、軟骨のみで発見される特化された間葉系由来細胞である。軟骨は、軟骨細胞によって生成された細胞外マトリックスで構成された無血管組織であって、一旦損傷を受けると炎症反応が生じず、自家治癒が起きない。したがって、一旦損傷を受けると自家治癒が極めて制約的になり、究極的には骨関節炎を引き起こし、患者のクオリティ・オブ・ライフに大いに影響を及ぼす。

【0003】

現在、損傷された軟骨治療方法には搔爬術および微小骨折術などの骨髄刺激法と、骨、軟骨組織を移植するモザイクプラスチックと、自家軟骨細胞を培養して移植する自家軟骨細胞移植術などがある。

【0004】

骨髄刺激法は、関節鏡を利用して最小限の侵襲により短時間で施術することができるため、簡単な施術法かつ短い施術時間という長所により多く行われているものの、軟骨治療の核心といえる血液と幹細胞で形成された血餅 (blood clot、幹細胞含む) を維持させることが難しく、物理的にも不安定で、正常軟骨への再生が難しい。すなわち、施術過程中、骨髄から由来した血餅を維持することができず、再生された軟骨が正常軟骨となるよりは繊維性軟骨となるため、成功的な治療を期待することが難しい。

【0005】

モザイクプラスチックは、荷重と磨耗の少ない部位の軟骨組織を採取し、損傷部位に補ってあげる方法であって、優れた治療効果があるものの、2次損傷をもたらすという問題点がある。

【0006】

最近では、自家細胞を培養して移植する自家軟骨細胞移植術 (autologous chondrocytes implantation、ACI) が軟骨治療に利用されている。現在、自家軟骨細胞移植術は、臨床承認を受けた細胞移植法 (Brittberg, M., et al., New Eng. J. Med., 331: 889, 1994) である。しかしながら、自家軟骨細胞移植術では骨膜を採取し、軟骨欠損部位を緻密に縫合して覆わなければならない、また、骨膜が軟骨を過剰に増殖させてしまい、手術後、患部に疼痛を招く恐れがある。合わせて、2段階にわたる手術過程を経なければならないという面倒さがある。初めは、関節鏡施術の下、自家軟骨を採取し、体外で軟骨細胞を分離および長期間培養した後、再び細胞懸濁液を欠損部位に移植する。したがって、自家軟骨細胞移植術は、軟骨を採取して手術しなければならないという短所と、長期間培養しなければならないという問題点がある。

【0007】

これに本発明者は、動物の組織、特に動物の軟骨を採取した後、“軟骨の粉末化”と“粒子抽出法の使用”により3次元支持体を形態として作製して移植すれば、窮極の目的である硝子軟骨組織の再生効果を増進させることができるばかりでなく、物性、多孔性、形態、構造および大きさに制約のない3次元形態の支持体を提供することができるものと判断した。

【0008】

10

20

30

40

50

最近には、同種 ( a l l o g e n i c ) または異種 ( x e n o g e n i c ) 組織や臓器を採取した後、細胞を除去 ( a c e l l u l a r i z e d ) し、色々な形態の支持体や膜として使用する技術が注目を集めている。

【 0 0 0 9 】

現在まで小腸の粘膜下組織 ( S I S )、膀胱 ( U B M )、皮膚 ( s k i n )、および羊膜 ( H A M ) などの商品化または研究が進められている。例えば、ドナーから皮膚の提供を受け、脱細胞化して開発された A l l o d e r m および小腸粘膜下組織 ( S I S ) を脱細胞化して創傷ドレッシング剤として開発された O A S I S、そしてブタの膀胱組織を脱細胞化して開発された U B M などがある。また、軟骨再生のために開発されたものとして、第 1 型、第 3 型コラーゲンで作製された C h o n d r o - g i d e ( 商標名である ) ( b i l a y e r c o l l a g e n m e m b r a n e ) を利用した軟骨再生研究が活発に行われている。

10

【 0 0 1 0 】

参考までに、軟骨組織の生化学的構成は、組織液、巨大分子およびその他の基質に分けることができる。組織液は 6 5 ~ 8 0 % の水分と蛋白質、無機塩類、ガスおよび各種の代謝物質からなり、陰電荷を帯びた蛋白糖との均衡をなすために全体として陽電荷の濃度が高い。

【 0 0 1 1 】

巨大分子は、約 6 0 % 程がコラーゲンであり、細胞外マトリックス内の蛋白糖と結合して網構造を形成することによって軟骨の形態を維持するようにして張力または弾性力が提供されている。軟骨の大部分 ( 9 0 ~ 9 5 % ) は、第 2 型コラーゲンから成されており、全て 3 本の型鎖が螺旋構造をなし、これらが集まって繊維状をなす。蛋白糖は中心となる蛋白質 ( c o r e p r o t e i n ) にコンドロイチン 4 - 硫酸 ( c h o n d r o i t i n 4 - s u l f a t e )、コンドロイチン 6 - 硫酸 ( c h o n d r o i t i n 6 - s u l f a t e )、ケラタン硫酸 ( k e r a t a n s u l f a t e ) などのグリコサミノグリカン ( g l y c o s a m i n o g l y c a n ) ( G A G ) が結合してなされた複合体であるが、これらはほとんどが ( 8 0 ~ 9 0 % ) 軟骨でお互い固まってアグリカン ( a g g r e c a n ) と呼ばれる大きい分子をなす。

20

【 0 0 1 2 】

その他の基質としては、非 - コラーゲン蛋白質 ( n o n c o l l a g e n o u s p r o t e i n ) と糖蛋白質 ( g l y c o p r o t e i n ) などが軟骨の乾燥重量 1 0 ~ 1 5 % を占めており、主にマトリックスの巨大分子の構造を安定化させ、有機組織を形成することを手助けする。

30

【 0 0 1 3 】

ところが、異種および同種組織の移植時、細胞抗原は宿主によって認識されるため、組織の炎症反応や免疫拒否反応を引き起こす。しかしながら、細胞外マトリックスの構成物は一般に同種レシピエントに構成物に対する耐性がある。したがって、心血管、血管、皮膚、神経、骨筋、腱、膀胱、肝などを含む組織の多様な細胞外マトリックスは、組織工学と再生医学の応用に多いに研究されている。脱細胞化の目的は、効率的に細胞、核などを除去して構成物に対する拒否反応を減らし、細胞外マトリックスの機械的強度を高めるものである。

40

【 0 0 1 4 】

参考までに、一般に使われる最適化した脱細胞方法は、物理的方法と化学的方法を含む。物理的方法としては攪はんや超音波処理、機械的圧力、凍結や解凍の手順を含む。該方法は細胞膜を分裂させ、細胞構成物を露出させる。その後、洗浄工程を行い、細胞外マトリックスから細胞を除去する。しかし、該物理的方法は、一般に完璧な脱細胞には不十分である。したがって、物理的方法は化学的方法と結びつけて施行されなければならない。トリプシンのような酵素的処理やイオン溶液のような化学的処理は、細胞膜を分裂させ、細胞内部と細胞外部との連結を解体させる。脱細胞化工程の間、細胞外マトリックスは基本骨格を維持しながら適合に分裂されるが、脱細胞化工程は、組織から細胞物質を除去し

50

て処理液 (chaotropic) にあらゆる細胞を適合に露出させるようにする。大抵、脱細胞化工程の目的は、分裂を最小化して元来の機械的特性や生物学的特性を維持するものである。

【0015】

これと関連し、天然組織の細胞外マトリックスを利用して多孔性支持体を製造する従来技術が開示されている。例えば、米国公開特許第2007/0248638A1号においては、軟骨細胞のような天然の組織細胞に酸化剤と洗剤を同時に処理して脱細胞化し、これを凍結乾燥を通し多孔性の支持体に形成することが開示されており、米国公開特許第2008/0124374A1号においては、脊椎動物の骨髄細胞において細胞外マトリックスから脱細胞化する方法およびこれを利用した治療器具が開示されている

10

これら先行技術は、天然の軟骨細胞組織や骨髄細胞組織から脱細胞化した異種の細胞外マトリックスが多孔性3次元支持体形態を有することを利用する技術であった。これらは組織の脱細胞化を通し、多孔性3次元支持体を作製し、免疫拒否反応を抑えることはできるものの、自然組織をそのまま利用しているため、支持体の大きさ、多孔性、形態、構造に制限があって、商業的にもそして治療目的への適用にも制限があるという問題点があった。

【0016】

すなわち、手術患者の損傷部位、損傷面積、患者それぞれの特性に応じて治療に適用される多孔性3次元支持体の大きさ、形態や構造を多様化させる必要があるが、天然軟骨組織を単純に脱細胞化する方式は、このような治療の多様化を期することができないという限界を持っていた。

20

【0017】

一方、米国特許第7,201,917号は、細胞外マトリックスを液状にしてスラリーにした後、凍結乾燥を通し、多孔性の支持体に製造する方法を提供しているが、該方法は自然組織の細胞外マトリックスを液状スラリー化することを特徴としている。また、米国特許第4,656,137号は、動物の軟骨粉末製造に関するものであって、動物から軟骨を収得し、酵素剤処理を通し、軟骨に付着した各種の蛋白質および脂肪組織を除去し、1次に4~8mm大きさに粉碎した後、凍結乾燥を通し、水分除去および2次粉碎を通し40~70μmの大きさに粉末化する技術が開示されている。

【0018】

30

しかしながら、これらの技術は、自然組織から脱細胞化して既存の組織の細胞外マトリックスをそのまま利用する方式であって、支持体の大きさ、多孔性、形態、構造に制限があり、商業的にかつ治療目的への適用において制限があるという問題点があり、また、軟骨の粉末化に関する米国特許第4,656,137号は、多様な大きさ、形態、構造を有する軟骨粉末の3次元的支持体製造について開示されているのでなく、傷などの治療目的に軟骨を粉末化する技術に関するものである。

【0019】

したがって、本発明が属する技術分野においては、硝子軟骨組織の再生効果を増進させることができるばかりでなく、物性、多孔性、形態、構造および大きさに制約のない3次元形態の支持体を提供する技術が要求されていると言える。

40

【0020】

これに本発明者は、動物の組織、例えば軟骨を採取した後、“粉末化”と“粒子抽出法の使用”により多孔性3次元支持体を作製し、物性、多孔性、形態、構造および大きさに制約のない多孔性3次元支持体を開発した。

【0021】

一方、組織工学において、粒子抽出法はPLA、PGAおよびPLGAなどの合成高分子を3次元支持体に作製するのに用いられている。粒子抽出法においては、ポロゲン (porogen) として所望する孔隙の大きさの物質 (塩、有機糖、パラフィン、氷粒子等) を一定量の高分子溶液に添加して混合し、一定の形態に加工した後、鑄造または凍結乾燥で有機溶媒を完全に除去し、ポロゲン (porogen) を水や適当な溶媒または乾燥

50

などで溶解する、または除去すれば所望の大きさの孔隙を有する3次元支持体を完成することができる。本発明者は、このような基本的な粒子抽出法の原理を利用するものの、有機溶媒やその他の溶媒を利用して材料を溶解することなく、動物由来組織の粉末とポロゲンとを混合し、粉末を結合させるために架橋剤(EDC)を用いた。

【0022】

また、動物の組織、例えば軟骨の粉末化の過程の以前または以後に、または粉末化と同時に脱細胞化工程が追加で作製された軟骨粉末の多孔性3次元支持体は、移植時、炎症反応が起こらず、臨床に適用可能な生体適合性に優れていることが判明された。

【先行技術文献】

【特許文献】

10

【0023】

【特許文献1】米国公開特許公報US2007/0248638A1号

【特許文献2】米国公開特許公報US2008/0124374A1号

【特許文献3】米国特許公報US7,201,917号

【特許文献4】米国特許公報US4,656,137号

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0024】

本発明は、動物の組織、例えば、軟骨粉末を粒子抽出法で3次元形態の多孔性支持体に製造し、治療目的ないしは使用目的に適合する多様な大きさ、多孔性、形態および構造を有する3次元形態の多孔性支持体の製造方法およびこれを利用して製造された3次元形態の多孔性支持体を提供することにその目的がある。

20

【0025】

さらに具体として、本発明は、動物の組織、例えば軟骨を採取した後、“粉末化”と“粒子抽出法の使用”により3次元支持体を作製し、硝子軟骨組織の再生効果を増進させることができるばかりでなく、物性、多孔性、形態、構造および大きさに制約のない3次元形態の多孔性支持体の製造方法およびこれを利用して製造された3次元形態の多孔性支持体を提供することにその目的がある。

【0026】

また、本発明は、動物の組織、例えば、軟骨を採取した後、粉末化の過程を遂行する以前または粉末化の過程を遂行した以後に、または粉末化と同時に物理的方法および/または化学的方法を利用した脱細胞化工程を追加し、移植時に炎症反応が起こらず、臨床に適用可能な生体適合性に優れた3次元形態の多孔性支持体の製造方法およびこれを利用して製造された3次元形態の多孔性支持体を提供することにその目的がある。

30

【0027】

さらに、本発明は、軟骨細胞や骨細胞、幹細胞などの細胞が接種された3次元支持体を含む細胞治療剤を提供することにその目的がある。

【課題を解決するための手段】

【0028】

前記目的を達成するため、本発明の動物組織の粉末を利用した多孔性3次元支持体の製造方法は、動物由来組織を粉末化する段階と、前記動物由来組織の粉末化の以前または以後に、または粉末化と同時に脱細胞化する段階と、前記脱細胞化した動物由来組織の粉末を粒子抽出法を利用して多孔性3次元支持体に形成する段階と、を含む。

40

【0029】

本発明の方法の一実施例において、前記粒子抽出法は、有機溶媒やその他の溶媒を利用して材料を溶解させることなく、前記脱細胞化した動物由来組織の粉末とポロゲンとを混合し、前記脱細胞化した動物由来組織の粉末を結合させるために架橋剤を用いたことを特徴とする。

【0030】

本発明の方法の一実施例において、前記粒子抽出法は、ポロゲン(porogen)と

50

して、例えば塩化ナトリウムのような塩粒子、有機糖粒子、デキストラン粒子、砂糖粒子、氷粒子およびパラフィン粒子で構成された群から選択された少なくともいずれかの粒子を使用することができる。

【0031】

本発明の方法の一実施例において、前記多孔性3次元支持体に形成する段階において、脱細胞化した動物由来組織の粉末と、粒子抽出法に使われるポロゲン (porogen) の粒子を混ぜてモールドに入れた後、加圧成形し、使用目的および治療部位によって多様な形態および大きさを有する多孔性3次元支持体を作製することを特徴とする。

【0032】

本発明の方法の一実施例において、紫外線 (UV)、EDC、NHS、脱水熱乾燥法 (dehydrothermal method) およびグルタルアルデヒド (glutaraldehyde) で構成された群から選択された少なくともいずれかの方法により多孔性3次元支持体を架橋する段階と、をさらに含むことができる。

10

【0033】

本発明の方法の好ましい一実施例において、前記動物由来組織の粉末に1つ以上の成長因子を入れて凍結乾燥する段階をさらに含むことができる。

【0034】

本発明の方法のより好ましい一実施例において、前記粒子抽出法を利用して形成された多孔性3次元支持体に軟骨細胞を接種した後、再培養して組織工学的軟骨組織を取得する段階と、をさらに含むことができる。

20

【0035】

本発明の方法の好ましい一実施例において、前記動物由来組織としては、ブタ、牛、羊、馬、犬または猫などの脊髄動物から由来した軟骨があり得る。より好ましいものとしては前記動物由来組織の粉末としては、ブタ軟骨粉末である。

【0036】

本発明の方法の好ましい一実施例において、前記動物由来組織を粉末化する段階は、動物由来の軟骨組織から軟骨を分離した後、粉碎機を利用して粉碎する段階と、粉碎した軟骨を凍結粉碎機を通して粉碎する段階と、を含む。

【0037】

本発明の方法のもう1つの一実施例において、前記動物由来組織は、ブタ、牛、羊、馬、犬または猫などの脊髄動物から由来した羊膜、皮膚、小腸の粘膜下組織、筋膜、または脊髄膜があり得る。

30

【0038】

本発明の方法の好ましい一実施例において、前記脱細胞化する段階は、物理的脱細胞方法、化学的脱細胞方法または物理的および化学的方法を組み合わせた方法により行われることを特徴とする。

【0039】

前記物理的脱細胞方法は、凍結 - 解凍法、超音波処理、または物理的攪はんを含む。前記化学的脱細胞方法は、前記動物由来組織の粉末を低張液、陰イオン性界面活性剤、非イオン性界面活性剤、陽イオン性界面活性剤、DNase、RNaseまたはトリプシンで処理することを特徴とする。また、前記脱細胞化する段階は、約0~50の温度範囲で行うのが好ましい。

40

【0040】

前記化学的脱細胞方法において、前記低張液はトリス - HCl (Tris HCl) (pH 8.0) 溶液であり、前記陰イオン性界面活性剤は、ドデシル硫酸ナトリウム (SDS)、デオキシコール酸ナトリウム (sodium deoxycholate)、またはトリトン X - 200 (Triton X - 200) であり、前記非イオン性界面活性剤はトリトン X - 100 (Triton X - 100) であり、前記陽イオン性界面活性剤は CHAPS、スルホベタイン - 10 (Sulfobetaine - 10, SB - 10)、スルホベタイン - 16 (SB - 16)、またはトリ - n - ブチルホスフェート (Tri

50

- n - b u t y l p h o s p h a t e ) とすることができる。

【0041】

本発明の多孔性3次元支持体の製造方法により製造された多孔性3次元支持体は、軟骨再生用とすることを特徴とする。また、本発明の多孔性3次元支持体は、関節軟骨組織の作製ばかりでなく、ディスク、骨組織の作製にも使われることができる。

【0042】

本発明の好ましい多孔性3次元支持体は、一以上の成長因子をさらに含むことができる。

【0043】

本発明の最も好ましい多孔性3次元支持体は、軟骨細胞が接種された後、軟骨細胞を再培養して組織工学的軟骨組織がさらに形成されたものであるとすることができる。

10

【発明の効果】

【0044】

本発明による動物の組織、例えば軟骨の粉末を利用した多孔性3次元支持体は、多様な大きさ、多孔性、形態および構造を有することによって、治療目的ないしは使用目的に適合に臨床に適用されることができ長所がある。すなわち、本発明によれば硝子軟骨組織の再生効果を増進させることができるばかりでなく、物性、多孔性、形態、構造および大きさに制約のない3次元形態の多孔性支持体を提供することができる。

【0045】

また、本発明の動物の組織、例えば軟骨の粉末を利用した多孔性3次元支持体は、動物の組織、例えば軟骨を採取した後、粉末化過程を遂行する以前または遂行した以後に、または粉末化と同時に物理的方法および/または化学的方法を利用した脱細胞化工程を追加して作製することによって、移植時、免疫拒否反応や炎症反応がなく、臨床に適用可能な生体適合性に優れ、軟骨再生においてもコラーゲンおよびその他の合成高分子の支持体より軟骨再生効果に優れている。

20

【0046】

また、本発明の動物の組織、例えば軟骨の粉末を利用した多孔性3次元支持体は、3次元に製造され細胞の移動、成長、および分化に適合した環境を提供し、軟骨再生に適合した構成成分と成長因子などを含んでおり、優秀な生体適合性および生分解性、そして3次元構造により軟骨欠損において組織工学的支持体に有用に使用されることができ。

30

【図面の簡単な説明】

【0047】

【図1】図1の(a)は、ブタ軟骨を分離したブタ軟骨欠片の写真であり、図1の(b)は、ブタ軟骨を凍結粉碎後、脱細胞した粉末の写真であり、図1の(c)は、脱細胞化したブタ軟骨粉末のSEM写真である。

【図2】ブタ軟骨(Native porcine cartilage; 脱細胞前PC)、脱細胞したブタ軟骨欠片(Decellular porcine cartilage, decellular PC)、そして脱細胞した軟骨粉末(Decellular porcine cartilage powder, decellular PCP)のDNA残存量を定量した結果をグラフで示す図面である。

40

【図3】本発明による軟骨粉末を利用した多孔性3次元支持体の製造工程を説明する模式図である。

【図4】本発明の一実施例に従って製造した軟骨粉末を利用した多孔性3次元支持体の写真である。

【図5】本発明の一実施例に従って製造した軟骨粉末を利用した多孔性3次元支持体のSEM写真である。図5の(a)は、表面の20倍写真であり、図5の(b)は、表面の50倍写真であり、図5の(c)は、横面の20倍写真であり、図5の(d)は、横面の50倍写真である。

【図6】本発明の一実施例に従って製造した軟骨粉末を利用した多孔性3次元支持体の多孔分布図である。

50

【図7】本発明の一実施例に従って製造した軟骨粉末を利用した多孔性3次元支持体の親水性の実験結果の写真である。

【図8】生体外条件において細胞を培養して有効性を評価する前のコラーゲン支持体と、本発明のブタ軟骨粉末支持体の写真である。図8の(a)は、コラーゲン支持体の正面写真であり、図8の(b)は、コラーゲン支持体の横面写真であり、図8の(c)は、本発明のブタ軟骨粉末支持体の正面写真であり、図8の(d)は、本発明のブタ軟骨粉末支持体の横面写真である。

【図9】対照群であるコラーゲン支持体と本発明のブタ軟骨粉末支持体に細胞を接種した後、細胞接種率を分析した結果を表す図表である。

【図10】生体外培養の一週間後、対照群であるコラーゲン支持体と本発明のブタ軟骨粉末支持体の成長様子を表す写真である。図10の(a)は、コラーゲン支持体の正面写真であり、図10の(b)は、コラーゲン支持体の横面写真であり、図10の(c)は、本発明のブタ軟骨粉末支持体の正面写真であり、図10の(d)は、本発明のブタ軟骨粉末支持体の横面写真である。

10

【図11】生体外培養の一週間後、対照群であるコラーゲン支持体と本発明のブタ軟骨粉末支持体のサフラニン-O(Safranin-O)染色写真である。図11の(a)は、コラーゲン支持体の20倍写真であり、図11の(b)は、コラーゲン支持体の100倍写真であり、図11の(c)は、本発明のブタ軟骨粉末支持体の20倍写真であり、図11の(d)は、本発明のブタ軟骨粉末支持体の100倍写真である。

【図12】生体外培養の二週間後、対照群であるコラーゲン支持体と本発明のブタ軟骨粉末支持体の成長様子を表す写真である。図12の(a)は、コラーゲン支持体の正面写真であり、図12の(b)はコラーゲン支持体の横面写真であり、図12の(c)は、本発明のブタ軟骨粉末支持体の正面写真であり、図12の(d)は、本発明のブタ軟骨粉末支持体の横面写真である。

20

【図13】生体外培養の二週間後、対照群であるコラーゲン支持体と本発明のブタ軟骨粉末支持体のサフラニン-O(Safranin-O)染色写真である。図13の(a)は、コラーゲン支持体の20倍写真であり、図13の(b)は、コラーゲン支持体の100倍写真であり、図13の(c)は、本発明のブタ軟骨粉末支持体の20倍写真であり、図13の(d)は、本発明のブタ軟骨粉末支持体の100倍写真である。

【発明を実施するための形態】

30

【0048】

以下では、本発明を限定しない実施例に沿って本発明を詳細に説明する。本発明の下記の実施例は、本発明を具体化するためだけのものであって、本発明の権利範囲を制限したり限定するものでないことはもちろんである。したがって、本発明の詳細な説明および実施例から本発明が属す技術分野の専門家が容易に類推することができるものは、本発明の権利範囲に属するものと解釈される。本発明に引用された参考文献は、本発明に参考として統合される。

【0049】

<参照例1>ブタ軟骨の分離

ブタ軟骨の分離はEN 12442の“Animal tissues and their derivatives utilized in the manufacture of medical devices, part 1; Analysis and management of risk, part 2; controls on sourcing, collection and handling”を参考として、基準に符合する施設のブタ軟骨を購入して使用した。

40

【0050】

ブタ軟骨から軟骨を切り出し、軟骨欠片(約20×30mm)を作り、ここに生理食塩水を利用して10分間3回洗浄した。洗浄した軟骨欠片を1%抗菌-抗真菌剤(antibiotic-antimycotic)が含まれたPBSに漬けた後、-80において超低温冷蔵庫で最終の保管をした(図1の(a)参照)。

50

## 【0051】

## &lt;実施例1&gt; ブタ軟骨の粉碎

洗浄した軟骨欠片は、当業界に広く知られ、商業的に入手可能な粉碎機（フードミキサーHMF-505、韓日（Hanil）、Korea）を使用し、約2×2mmサイズに粉碎した。粉碎した軟骨欠片は凍結乾燥をし、最終的に乾燥した軟骨欠片を凍結粉碎機（JAI、JFC-300、Japan）を使用して約10μmサイズ程度に凍結粉碎した。

## 【0052】

## 1-1. ブタ軟骨粉末の形態の分析

走査電子顕微鏡（scanning electron microscope）を使用して凍結粉碎したブタ軟骨粉末の形態を分析した。2.5%グルタルアルデヒド（glutaraldehyde）で実施例1にて粉碎したブタ軟骨粉末を1時間程度の間固定させた後、リン酸塩緩衝液（phosphate buffer solution）で洗浄した。試料をエタノールで脱水させた後、乾燥し、電子顕微鏡（JEOL、JSM-6380、Japan；20KV）でパウダーの大きさおよび形態を観察した。大きさは約10μm程度に観察された（図1の（c））。

10

## 【0053】

## &lt;実施例2&gt; ブタ軟骨粉末の脱細胞および特性の分析

## 2-1. ブタ軟骨粉末の脱細胞化

ブタ軟骨粉末に存在する軟骨細胞および遺伝子成分を除去し、純粋な細胞外マトリックスを得るため、次の通り、脱細胞化過程を行った。

20

## 【0054】

実施例1にて製造したブタ軟骨粉末を10g当たり0.1%のSDS（sodium dodecyl sulfate、Bio-rad, USA）1lの溶液に入れ、100rpmで24時間の間攪はんした。SDS処理後3次蒸溜水で100rpmで30分間5回洗浄した。

## 【0055】

洗浄水の交換において、軟骨粉末を沈殿させるため、超高速遠心分離機（US-215MT, Vision, Korea）を使用し、10,000rpmで1時間の間軟骨粉末を沈殿させた。

30

## 【0056】

次に、200U/mlの濃度のDNase（Sigma, USA）200mlを入れ、37℃において100rpmで24時間攪はんさせた。3次蒸溜水の洗浄水で100rpmで30分間5回洗浄した。洗浄水の交換は前述したようなSDS洗浄における遠心分離条件で進めた。脱細胞化した軟骨粉末は図1の（b）に示された通りである。

## 【0057】

一方、本発明の実施例においては、軟骨粉末の製造後、脱細胞過程を行ったが、軟骨の粉末化前に脱細胞を行い、粉末化することもやはり本発明の方法が排除されるものでないことを本発明が属する技術分野の当業者ならば容易に理解するはずである。

## 【0058】

## 2-2. 脱細胞化したブタ軟骨粉末のDNA含有量の分析

脱細胞以前の軟骨組織（以下、“PC”とする）と、脱細胞化工程を経た軟骨欠片（PC）および脱細胞化工程を経た軟骨粉末（以下、“PCP”とする）を試験片とし、Qubiq DNA定量機器（Qubiq, BIORAD, USA）でDNAを定量的に分析した。その分析の結果を下記の表1および図2のグラフで表した。参考までに、脱細胞化過程は実施例2-1と同じ方法で行った。

40

## 【0059】

表1：DNA残存量を数値化した結果

## 【0060】

【表 1】

	DNA残存量(含有量)	C. V数値
脱細胞前PC	485	13.22876
脱細胞後PC	394	4.358899
脱細胞後PCP	9.48	0

## 【0061】

10

<実施例3>脱細胞化したブタ軟骨粉末を利用した3次元支持体の製造および特性の分析

## 3-1. 多孔性3次元支持体の製造

実施例2-1に記述した方法にて、脱細胞した軟骨粉末を1:9の割合で塩化ナトリウム(NaCl, 結晶の大きさ250~350 $\mu$ m)とまんべんなく混ぜる。ここに3次蒸留水に溶解させた100mM EDC(N-(3-Dimethylaminopropyl)-N-ethylcarbodiimide hydrochloride, Sigma, USA)溶液を10%の割合で混ぜる。

## 【0062】

20

EDC溶液を軟骨粉末および塩化ナトリウム混合物にまんべんなく混ぜた後、自作製の超合金モールドに混合物試料を入れ、1000psi圧力で加圧し、ディスク形態の成形物を製造する。モールドは一般的なモールドのように固定部材と可動部材で構成され、固定部材および/または可動部材の内部に所望する3次元支持体の形状を形成する。本実施例においては、ディスク形態の3次元支持体を製造したが、使用目的および治療部位によっていろいろな形態および大きさを有する3次元支持体の作製が可能である。

## 【0063】

本実施例においては、多孔性3次元支持体の形成におけるポロゲン(porogen)として塩化ナトリウム粒子を用いたが、他の物質、例えば、砂糖粒子や氷粒子も本発明の方法に適用可能であることを本発明が属する技術分野の当業者ならば容易に理解できるはずである。

30

## 【0064】

次に、ディスク形態の成形物を常温で乾燥させた後、100mM EDC(99.9%のエタノールに溶解させた溶液)で4時間の間架橋させ、100mMのNHS(N-Hydroxysuccinimide, Fluka, Japan)を入れ、再び4時間反応させる。架橋反応は、軟骨粉末の多孔性3次元支持体の物性を良くし、分解期間を延長させるために行う。

## 【0065】

架橋反応が終われば、塩を溶出させるために3次蒸留水に入れ、少なくとも5回以上入れ換え、塩を完全に除去する。架橋結合後、未反応基を除去するため、NH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>で3回洗浄する。最後に3次蒸留水で3回洗浄した後、凍結乾燥する。

40

## 【0066】

図3には軟骨粉末の多孔性3次元支持体の製造工程が示されており、図4にはこのような製造工程に従って作製された最終製品が示されている。

## 【0067】

## 3-2. ブタ軟骨粉末支持体の多孔構造分析

走査電子顕微鏡(scanning electron microscope)を使用し、ブタ軟骨粉末支持体の多孔構造を分析した。2.5%グルタルアルデヒド(glutaraldehyde)で実施例3-1にて作製したブタ軟骨粉末支持体を1時間程度の間固定させた後、リン酸塩緩衝液(phosphate buffer solution)で洗浄した。試料をエタノールで脱水させた後、乾燥して電子顕微鏡(JEOL, 50

JSM-6380, 日本; 20KV) で支持体の多孔の大きさおよび形態を観察した。

【0068】

多孔の大きさは約200 μm内外であり、相互多孔連結性は優れていた。また、全体の多孔分布も均一であり、表面多孔も開いた形態になっていた(図5参照)。

【0069】

3-3. ブタ軟骨粉末支持体の多孔度の分析

水銀ポロシメトリー(Mercury porosimeter)を使用し、ブタ軟骨粉末支持体の多孔度を分析した。分析試料の重さは0.0193gであり、分析圧力は50 μmHg、時間は5分、水銀充填圧力は0.44 psiaであった。測定した結果、ブタ軟骨粉末支持体の多孔度は82.39%であった(図6参照)。

10

【0070】

<実施例4> ブタ軟骨粉末支持体の親水性の評価

ブタ軟骨粉末支持体の親水性の特性を把握するため、染料を利用して水吸収度を肉眼で確認できた。ブタ軟骨粉末支持体上に2.5%のトリパンブルー細胞染色溶液を落としてから10秒後、写真を撮って評価したところ、染料が支持体にすぐに吸収されることが確認された。したがって、ブタ軟骨粉末支持体は、親水性に優れていることを確認することができた(図7参照)。

【0071】

<実施例5> ブタ軟骨粉末支持体の有効性の評価

5-1. ブタ軟骨粉末支持体を利用した軟骨細胞の培養

生後2週以内のニュージーランド産うさぎの軟骨から軟骨細胞を分離した。膝軟骨から軟骨組織だけを採取した後、これを1~2mm程に細かく刻み、0.1%コラゲナーゼ(Collagenase type II, Washington, USA)で37の細胞培養器で12時間処理することによって軟骨細胞の分離がなされる。0.1%のコラゲナーゼの12時間処理後、細胞濾過器で軟骨細胞だけをろ過し、遠心分離(1700 rpm, 10分)して軟骨細胞のみを分離した。

20

【0072】

前述したような実施例1、実施例2および実施例3にて説明された方法で製造した軟骨粉末の多孔性3次元支持体(直径5mm、高さ2mm)に分離されたうさぎ軟骨細胞を5×10<sup>6</sup>細胞の濃度に接種した。

30

【0073】

一方、培地[DMEM+1%の抗生-抗真菌剤(antibiotic-antimycotic)+ITS{1.0mg/mlのインシュリン, 0.55mg/mlのヒト・トランスフェリン(human transferrin)、0.5mg/mlの亜セレン酸ナトリウム(sodium selenite)で構成)+50 μm/mlのアスコルビン酸(ascorbic acid)+1.25mg/mlのBSA(bovine serum albumin)+100nMデキサメタゾン(dexamethasone)+40 μm/mlのプロリン]は一週に3回入れ換えた。

【0074】

5-2. ブタ軟骨粉末支持体の細胞接種率の評価

うさぎ軟骨細胞を5×10<sup>6</sup>細胞で計数した後、ブタ軟骨粉末支持体に静的接種方法で接種した。細胞が支持体に付着するよう4時間の間、37の細胞培養器で培養した上、培養液を入れた。この時、支持体に付着せずに、底に落ちた細胞を計数した。また、24時間後、支持体を新しいプレートに移して底に落ちた細胞を計数した。

40

【0075】

細胞接種率を評価した結果、4時間後、コラーゲン支持体(collagen sponge)の細胞接種率は90.5%であり、ブタ軟骨粉末支持体の細胞接種率は80%であった。24時間後、細胞接種率はコラーゲン支持体が90%に計算され、ブタ軟骨粉末支持体が79%に計算された。

【0076】

50

コラーゲン支持体がより高い細胞接種率を表したが、軟骨粉末支持体も80%程の高い細胞接種率を表していることを確認することができた(図9参照)。

【0077】

5-3. 時間の経過にともなう軟骨組織形成能の比較

本発明の3次元支持体との比較のため、第1型アテロコラーゲン(atellocollagen)(MATRIXENTM, バイオランド, Korea)を1%の濃度で溶解させ、凍結乾燥法にてスポンジとして作製したものを対照群に使用した。

【0078】

前述したような方法でうさぎ軟骨細胞を播種した対照群のコラーゲン支持体と本発明の軟骨粉末の3次元支持体を1週と2週の間培養した後、一定期間にサンプルを回収し、10%のホルマリンで24時間固定した。固定されたサンプルはパラフィン包埋後、切片を作ってサフラニン-O(safranin-O)染色とH&E染色をし、軟骨組織形成能を比較した。

10

【0079】

その結果、培養後1週になった時点で、対照群のコラーゲン支持体と本発明の軟骨粉末の3次元支持体のいずれからも白色の半透明な組織が形成された(図10参照)。サフラニン-O(Safranin-O)染色の結果、対照群のコラーゲン支持体と本発明の軟骨粉末の3次元支持体のいずれから軟骨細胞が分布していることが確認されたが、本発明の軟骨粉末の3次元支持体がコラーゲン支持体より細胞の分布図が高く、本発明の3次元支持体壁に沿ってグリコサミノグリカン(glycosaminoglycan)の合成および軟骨化の進行も優れた(図10参照)。

20

【0080】

図11に示すように、培養後2週になった時点でも2つのグループいずれも半透明な形態を表した。サフラニン-O染色の結果、2グループとも培養後1週になった時点より優れた軟骨再生効果を表したが、本発明の軟骨粉末の3次元支持体からほぼ全体として軟骨再生効果が現われた(図12参照)。

【0081】

したがって、本発明の多孔性3次元支持体は軟骨再生であって、物性、多孔性、形態、構造および大きさに制約がなく、3次元で製造され軟骨細胞の移動、成長、および分化に適合した環境を提供し、優れた生体適合性および生分解性そして3次元構造により軟骨欠損において組織工学的支持体に有用に使われることができることを確認することができた。

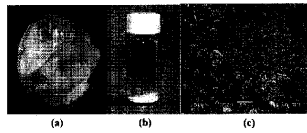
30

【0082】

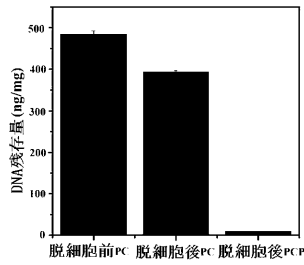
以上、本発明を前述した実施例により説明したが、本発明は開示された実施例に制限されるものではない。当業者であれば、本発明の趣旨により修正変更可能であり、このような修正変更もまた本発明の範囲に属するということを理解することができる。

【 図 1 】

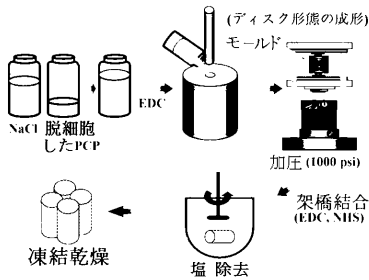
[Fig. 1]



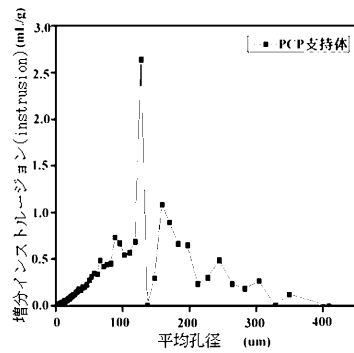
【 図 2 】



【 図 3 】

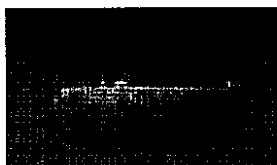


【 図 6 】



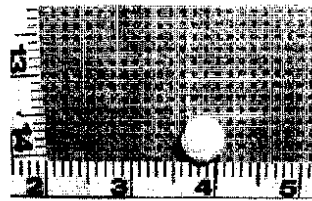
【 図 7 】

[Fig. 7]



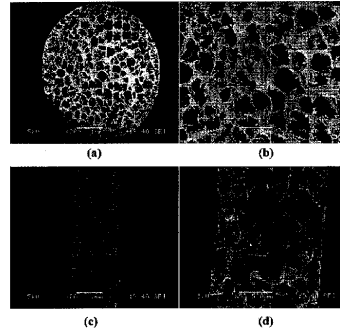
【 図 4 】

[Fig. 4]



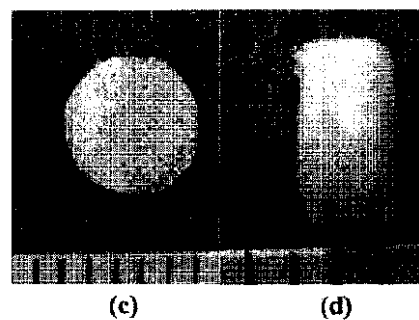
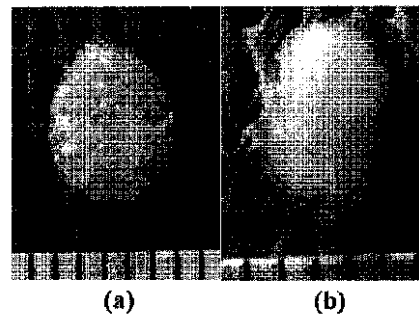
【 図 5 】

[Fig. 5]



【 図 8 】

[Fig. 8]

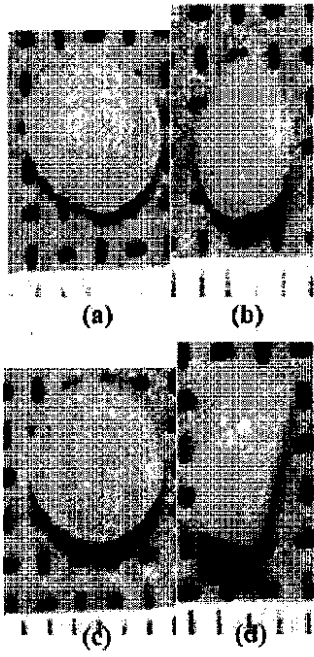


【 図 9 】

細胞接種率	静的接種 (4時間後)	静的接種 (1日後)
コラーゲン支持体	90.5%	90%
PCP支持体	80%	79%

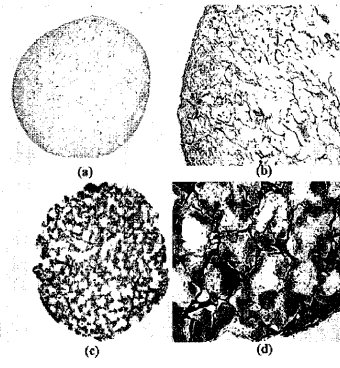
【 図 1 0 】

[Fig. 10]



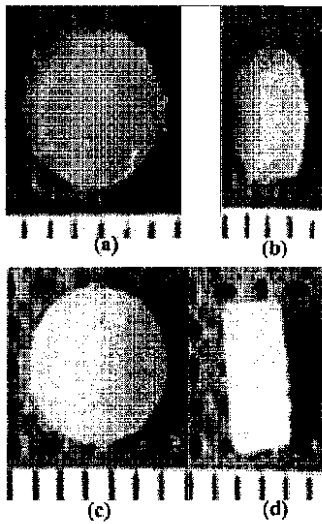
【 図 1 1 】

[Fig. 11]



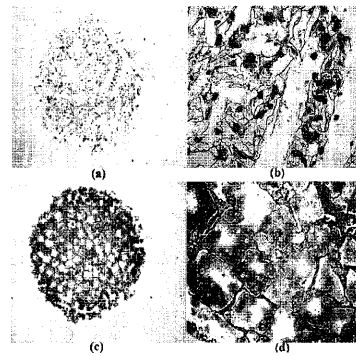
【 図 1 2 】

[Fig. 12]



【 図 1 3 】

[Fig. 13]



---

フロントページの続き

(72)発明者 ジャン, ジウク

大韓民国 443-380 キョンギード, スウォンシ, ヨントング, ウォンチョンドン, アジュ  
ビルラ, ガドン, 101ホ

審査官 石井 裕美子

(56)参考文献 特表2005-523733(JP, A)

特表2002-531182(JP, A)

特表2001-510358(JP, A)

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

A61L 15/00-33/00

CAplus/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS(STN)

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamIII)