(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)

WIPO | PCT

(10) 国際公開番号
WO 2013/176239 A1

(51) 国際特許分類:
C08L 89/00 (2006.01) *C08K 5/1545* (2006.01)
A61L 27/00 (2006.01) *C08L 5/00* (2006.01)

(21) 国際出願番号: PCT/JP2013/064433

(22) 国際出願日: 2013 年 5 月 24 日(24.05.2013)

(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 2012-118380 2012 年 5 月 24 日(24.05.2012) JP

(71) 出願人: 国立大学法人　東京大学(THE UNIVERSITY OF TOKYO) [JP/JP]; 〒1138654 東京都文京区本郷七丁目３番１号 Tokyo (JP).

(72) 発明者: 上村　渉(KAMIMURA Wataru); 〒1138654 東京都文京区本郷七丁目３番１号　国立大学法人東京大学内 Tokyo (JP). 小山　博之(KOYAMA Hiroyuki); 〒1138654 東京都文京区本郷七丁目３番１号　国立大学法人東京大学内 Tokyo (JP).

(74) 代理人: 岩瀬　吉和，外(IWASE Yoshikazu et al.); 〒1066036 東京都港区六本木一丁目６番１号 泉ガーデンタワー　アンダーソン・毛利・友常法律事務所 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, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, 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.

(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)）

(54) **Title**: GEL MATERIAL CROSSLINKED WITH OXIDIZED OLIGOSACCHARIDE

(54) 発明の名称 : 酸化オリゴ糖で架橋したゲル材料

(57) **Abstract**: [Problem] To provide a material that can be used as a scaffold for the construction of a large regenerated tissue and has all of the following characteristic properties: (1) the material has a high affinity for cells; (2) the structure of the material is stable under physiological environments; (3) the material can be decomposed rapidly in a living body after being transplanted; (4) the material can carry a blood vessel induction factor in the inside thereof stably without leaking the blood vessel induction factor therefrom; (5) the material has transparency at such a level that the state of cells in culture can be observed in the inside of the gel over time; and (6) the strength of a gel produced from the material can be controlled readily. [Solution] A crosslinkable composition comprising an oligosaccharide oxide having an aldehyde group and a polypeptide or polysaccharide having an amino group in a side chain thereof.

(57) 要約: 【解決課題】　大型の再生組織を構築するためのスキャホールドとして、（１）高い細胞親和性をもち、（２）生理環境下でも構造が安定で、（３）移植後に速やかに生体内分解し、（４）血管誘導因子を漏洩することなく内部に安定に担持でき、（５）ゲル内部で培養している細胞の状態を経時的に観察できる程度の透明性を有し、（６）得られるゲルの強度を容易に調整できる特徴を兼備した材料を提供すること。【解決手段】　アルデヒド基を有するオリゴ糖酸化物、及び側鎖にアミノ基を有するポリペプチド又は多糖類を含む架橋性組成物。

WO 2013/176239 A1

明　細　書

発明の名称 ： 酸化オリゴ糖で架橋したゲル材料

技術分野

[0001] 本発明は、オリゴ糖酸化物で架橋したゲル材料、当該ゲル材料の調製に用いられるオリゴ糖酸化物からなる架橋剤、当該ゲル材料を用いた細胞培養システム及び移植システムに関する。

背景技術

[0002] 近年、細胞を三次元培養して、大型の再生組織を構築する研究が活発に行なわれており、細胞シート上に細胞を培養して積層化する技術などが提案されている（非特許文献１～３）。ここで、大型再生組織の構築にあたっては、血管系をいかにして導入するかを検討することが必要である。即ち、受動拡散による酸素や物質のやりとりは数百ミクロンが限界であるとされているため、仮に大型の再生組織を作成することができても、血管系が導入されていないと、当該再生組織をホストに移植しても中心が壊死してしまう。

[0003] 大型再生組織に血管系を導入する手法として、血管系を含んだ再生組織を組織工学的に作ることが理想的ではあるが、そのためには血管系構築技術を確立することが必要であり、この技術は現時点では確立していない。また、別の方法として、ホストの移植母床での血管新生機構を制御することが考えられる。これは、ホストに再生組織を移植し、ホスト母床からの血管新生を誘導し、再生組織に栄養血管を引き込む手法である。

[0004] 近年、微小再生組織単位としてスフェロイドが注目されている。スフェロイドとは、細胞が多数凝集して球状塊になったものであり、スフェロイド培養は、従来の単層培養に比べ、細胞の機能を長期間維持でき、より生体に近い培養法といえる。そこで、スフェロイドをホストに移植し、スフェロイドへ血管を誘導（器質化）し、器質化されたスフェロイドを三次元構築する技術が検討されている（特許文献１、非特許文献４～５）。

しかしながら、スフェロイドのみをホスト母床に移植してもすぐに分散して

しまい適所に留めることは困難である。さらに、スフェロイド周辺において血管の伸張や構造を維持する支持体がないため血管新生をうまく誘導することができない。そこで、血管新生を誘導するような足場材料が必要となる。

[0005] このような足場材料として、細胞接着性や生体内分解性に優れることから、コラーゲンがこれまで検討されてきた（特許文献２）。また、近年、コラーゲンを基盤としたゲル内細胞培養システムが市販されている。しかしながら、コラーゲンのゲル化機構はコラーゲン分子同士の凝集によるため、得られたゲルの強度や透明性は、コラーゲンの濃度、イオン強度、ｐＨに大きく依存する。従って、このような凝集体によって形成されたゲルは、生体内において安定とは言い難い。

先行技術文献

特許文献

[0006] 特許文献1：特開２０１０－０６５０８２号公報

特許文献2：特開２０１１－１６０８１７号公報

非特許文献

[0007] 非特許文献1：Ｈａｒａｇｕｃｈｉ Ｙ．，Ｓｈｉｍｉｚｕ Ｔ．，Ｙａｍａｔｏ Ｍ．，Ｏｋａｎｏ Ｔ．，Ｊ．Ｔｉｓｓｕｅ Ｅｎｇ Ｒｅｇｅｎ．Ｍｅｄ．，４（４），２９１－２９９（２０１０）．

非特許文献2：Ｓｅｋｉｙａ Ｓ．，Ｓｈｉｍｉｚｕ Ｔ．，Ｙａｍａｔｏ Ｍ．，Ｏｋａｎｏ Ｔ．，Ｊ．Ａｒｔｉｆ．Ｏｒｇａｎｓ，１４（１），４３－５１（２０１１）．

非特許文献3：Ｏｈａｓｈｉ Ｋ．，Ｙｏｋｏｙａｍａ Ｔ．，Ｙａｍａｔｏ Ｍ．，Ｋｕｇｅ Ｈ．，Ｋａｎｅｈｉｒｏ Ｈ．，Ｔｓｕｔｓｕｍｉ Ｍ．，Ａｍａｎｕｍａ Ｔ．，Ｉｗａｔａ，Ｈ．Ｙａｎｇ Ｊ．，Ｏｋａｎｏ Ｔ．，Ｎａｋａｊｉｍａ Ｙ．，Ｎａｔ．Ｍｅｄ．１３，８８０－８８５（２００７）．

非特許文献4：Ｌａｚａｒ Ａ．，Ｍａｎｎ Ｈ－Ｊ．，Ｒｅｍｍｅｌ Ｒ－Ｐ．，Ｓｈａｔｆｏｒｄ Ｒ－Ａ．，Ｃｅｒｒａ Ｆ－Ｂ．，Ｈｕ Ｗ－Ｓ

．，Ｉｎ Ｖｉｔｒｏ Ｃｅｌｌ Ｄｅｖ． Ｂｉｏｌ． Ａｎｉｍ．，３１（５）：３４０－６（１９９５）．

非特許文献5：高山利夫、田口哲志、小山博之、小林尚俊、宮田哲郎、名川弘一、脈管学　４８巻、Ｓ１００号（２００８）

発明の概要

発明が解決しようとする課題

[0008] 本発明は、大型の再生組織を構築するためのスキャホールド（足場）として、（１）高い細胞親和性をもち、（２）生理環境下でも構造が安定で、（３）移植後に速やかに生体内分解し、（４）血管誘導因子を漏洩することなく内部に安定に担持でき、（５）ゲル内部で培養している細胞の状態を経時的に観察できる程度の透明性を有し、（６）得られるゲルの強度を容易に調整できる特徴を兼備した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

[0009] 本発明者らは、コラーゲンゲルを細胞培養に適した条件で安定に維持するため、化学架橋を形成させることにより、コラーゲンが凝集体を形成することを抑制することを着想した。ここで、化学架橋を形成する水溶性の架橋剤としては、水溶性カルボジイミドやグルタルアルデヒドなどが知られているが、細胞に対する刺激性や毒性の問題からこれらを使用することは適切ではない。そこで、鋭意検討した結果、オリゴ糖の酸化物を架橋剤として使用すると無色透明なゲルが得られることを見出した。

酸化反応としては、オリゴ糖の有機溶媒に対する溶解性が低いため水系における酸化反応が好ましく、また四酢酸鉛を用いた酸化反応では残留鉛の毒性が懸念された。従って、過ヨウ素酸による酸化反応を選択し、酸化反応後にアルコールを添加することで容易にヨウ素化合物を除去できる技術を確立し、本発明に到達した。

[0010] すなわち、本発明は、

（１）アルデヒド基を有するオリゴ糖酸化物、及び側鎖にアミノ基を有するポリペプチド又は多糖類を含む架橋性組成物、

（２）オリゴ糖酸化物がオリゴ糖の過ヨウ素酸酸化から生成された、（１）に記載の架橋性組成物、

（３）前記ポリペプチドが、コラーゲン、アテロコラーゲン、ゼラチン、それらの誘導体又はこれらの混合物から選択される、（１）又は（２）に記載の架橋性組成物、

（４）前記多糖類が、脱アセチル化キチン又はキトサン、スクシニル化キトサン、グリセリル化キトサン、カルボキシメチル化キトサン、ヒドロキシブチルーヒドロキシプロピル化キトサン、アミノ化デキストラン、アミノ化デンプン、アミノアルキル化プルラン、アミノ化ヒアルロン酸、アミノ化コンドロイチン硫酸、アミノ化セルロース、それらの誘導体又はこれらの混合物から選択される、（１）又は（２）に記載の架橋性組成物、

（５）前記オリゴ糖が、スクロース、マルトース、ラフィノース、これらの誘導体及びこれらの２以上の混合物からなる群から選択される、（１）～（４）のいずれか１に記載の架橋性組成物、

（６）（１）～（５）のいずれか１に記載の架橋性組成物から得られる架橋体、

（７）前記オリゴ糖酸化物のアルデヒド基と前記ポリペプチド又は多糖類のアミノ基が共有結合している、（６）に記載の架橋体、

（８）ゲル化した状態にある、（６）又は（７）に記載の架橋体、

（９）血管新生因子を含有する、（６）～（８）のいずれか１に記載の架橋体、

（１０）細胞又は細胞組織を含有する、（６）～（９）のいずれか１に記載の架橋体、

（１１）細胞培養液を含有する、（１０）に記載の架橋体、

（１２）（６）～（１１）のいずれか１に記載の架橋体を用いた、細胞培養システム、

（１３）（６）～（１１）のいずれか１に記載の架橋体を被験者の体内に移植するシステム、

（１４）（１２）に記載の細胞培養システムで得られる培養細胞を、被験者の体内に移植するシステム、

（１５）（ａ）（１）～（５）のいずれか１に記載の架橋性組成物を調製する工程、

（ｂ）前記架橋性組成物のｐＨを７．０以上に調整する工程

を含む、前記架橋性組成物のゲルを調製する方法、

（１６）（ａ）（１）～（５）のいずれか１に記載の架橋性組成物を調製する工程、

（ｂ）前記架橋性組成物のｐＨを７．０以上に調整する工程、

（ｃ）前記架橋性組成物をゲル化させる工程

を含み、（ｃ）の工程前、工程中または工程後の時点で、前記架橋性組成物に細胞又は細胞組織を添加する、細胞を培養する方法、

（１７）前記（ｃ）の工程前、工程中または工程後の時点で前記架橋性組成物に培養液を添加する、（１６）に記載の細胞を培養する方法、

（１８）（１５）に記載の方法で得られるゲルを被験者の体内に移植する方法、

（１９）（１６）又は（１７）に記載の方法で得られる培養細胞を被験者の体内に移植する方法、

（２０）アルデヒド基を有するオリゴ糖酸化物及び側鎖にアミノ基を有するポリペプチド又は多糖類を含む架橋性組成物から形成されたゲル中に細胞又は細胞組織が包埋されており、被験者の体内に移植されるように用いられる、再生組織を構築するための移植材料、

（２１）アルデヒド基を有するオリゴ糖酸化物からなり、側鎖にアミノ基を有するポリペプチド又は多糖類との架橋反応に用いられる架橋剤、

（２２）オリゴ糖酸化物がオリゴ糖の過ヨウ素酸酸化から生成される、（２１）に記載の架橋剤、

（２３）前記オリゴ糖が、スクロース、マルトース、ラフィノース、これらの誘導体及びこれらの２以上の混合物からなる群から選択される、（２１）

又は（２２）に記載の架橋剤、

（２４）側鎖にアミノ基を有するポリペプチドが、コラーゲン、アテロコラーゲン、ゼラチン、それらの誘導体又はこれらの混合物から選択される、（２１）～（２３）のいずれか１に記載の架橋剤、及び

（２５）側鎖にアミノ基を有する多糖類が、脱アセチル化キチン又はキトサン、スクシニル化キトサン、グリセリル化キトサン、カルボキシメチル化キトサン、ヒドロキシブチルーヒドロキシプロピル化キトサン、アミノ化デキストラン、アミノ化デンプン、アミノアルキル化プルラン、アミノ化ヒアルロン酸、アミノ化コンドロイチン硫酸、アミノ化セルロース、それらの誘導体又はこれらの混合物から選択される、（２１）～（２３）のいずれか１に記載の架橋剤

を、提供するものである。

発明の効果

[0011] コラーゲン等の側鎖にアミノ基を有するポリペプチド又はキトサン誘導体等のアミノ基を有する多糖類をオリゴ糖酸化物で化学架橋することにより、凝集体の形成を抑制し、透明で均一なゲルを調製することが可能となった。透明で均一なゲルは、細胞の観察が容易であり、生体内での分解もむらなく速やかに進行する。また、化学架橋は、生理環境下におけるゲルの収縮・膨潤・溶解などの構造変化を制限・抑制し、細胞用足場材料として十分な強度と分解速度が得られるような適切な架橋密度を維持することができる。

また、オリゴ糖酸化物は低級アルデヒドと比較して刺激・毒性が低く、細胞に対しても、また移植用材料としても安全な架橋剤となる。

更に、オリゴ糖酸化物のアルデヒド基は血管新生因子などを共有結合により担持することができる。また、アルデヒドの酸化によって生じたカルボン酸もｂＦＧＦなどの塩基性因子を静電相互作用によって担持することができる。従って、本発明のゲル材料は生体内で血管新生因子などを外部に放出しにくいため、効率的に血管新生を誘導することが可能となる。

図面の簡単な説明

[0012] [図1]本発明のゲルを用いて培養した正常ヒト臍帯静脈内皮細胞（ＨＵＶＥＣ）の顕微鏡観察結果（培養５日目）

[図2]本発明のゲルを用いて培養し肝細胞のスフェロイドの顕微鏡観察結果（培養３日目）

[図3]本発明のゲルを用いて培養した心筋細胞のスフェロイドの顕微鏡観察結果（培養３日目）

[図4]ラットへの移植実験の概略フロー図

[図5]移植から５日後に摘出したゲル断面の光学顕微鏡観察結果

発明を実施するための形態

[0013] 架橋剤

本発明の一つの形態は、アルデヒド基を有するオリゴ糖酸化物からなる架橋剤である。

[0014] オリゴ糖とは、単糖類同士がグリコシド結合によって結合した化合物の中で、分子量としては３００～３０００程度のものを指す。本発明において使用できるオリゴ糖は、二糖であるスクロース、ラクトース、マルトース、トレハロース、ツラノース、セロビオースなど；三糖であるラフィノース、パノース、マルトトリオース、メレジトース、ゲンチアノースなど；四糖であるアカルボース、スタキオースなど；環状オリゴ糖であるシクロデキストリン、シクロアワオドリンなど；単糖の重合体であるフラクトオリゴ糖、ガラクトオリゴ糖など；多糖の分解産物としてのマンナンオリゴ糖、キシロオリゴ糖など；天然物からの分解・抽出物；これらの誘導体及びこれらの２以上の混合物からなる群から選択される。

本発明においては、これらの中でも、スクロース、マルトース、ラフィノース、シクロデキストリンが好ましく、スクロース、マルトース、ラフィノースが特に好ましい。

[0015] 本発明におけるアルデヒド基を有するオリゴ糖酸化物とは、オリゴ糖のビシナルジオール基が一部解離してアルデヒド基に酸化されているものを言う。ここで、オリゴ糖のビシナルジオール基がアルデヒド基に酸化されたもの

は種々の方法により得ることができるが、本発明においては、アルデヒド基を有するオリゴ糖酸化物として、オリゴ糖の過ヨウ素酸酸化から生成された酸化物であることが特に好ましい。

[0016] 本発明の架橋剤の製造方法に関して、オリゴ糖の過ヨウ素酸酸化により製造する方法について説明する。

オリゴ糖を水又は水酸化ナトリウム溶液などの塩基性水溶液に溶解し、氷冷下で過ヨウ素酸ナトリウムを添加して、オリゴ糖の過ヨウ素酸酸化反応を行なう。反応溶液のｐＨは、７以下であることが好ましく、５～６付近であることが特に好ましい。

また、過剰な酸化は糖を分解し、副生成物であるギ酸やホルムアルデヒドなどが発生することが危惧されるため、オリゴ糖の糖ユニットに対する過ヨウ素酸ナトリウムの比率は１：２以下が望ましい。また、反応溶媒としては、例えば、水、水／エタノール混合溶媒、水／ＤＭＦ混合溶媒など各種の溶媒を使用することができるが、水を用いるのが好ましい。

[0017] 反応時間は、糖の種類により適宜決定されるが、通常５分～９６時間で行なうことができ、特に１～６０時間で行なうのが好ましい。反応終了後、過ヨウ素酸酸化により残留しているヨウ素化合物を除去するため、極性溶媒を添加してヨウ素化合物を析出させて除去する。極性溶媒としては、オリゴ糖酸化物の調製過程で減圧除去する必要があることから低沸点溶媒であることが望ましい。また、生体に対する安全性が高い溶媒であることが好ましい。これらの点から、極性溶媒として、エタノール、イソプロパノールなどのアルコール、アセトン、テトラヒドロフランなどを使用することが好ましく、特にエタノールが好ましい。

[0018] 本発明のアルデヒド基を有するオリゴ糖酸化物からなる架橋剤は、後述する通り、側鎖にアミノ基を有するポリペプチド又は多糖類との架橋反応に好適に用いることができる。

[0019] 架橋性組成物

本発明のもう一つの形態は、アルデヒド基を有するオリゴ糖酸化物からな

る架橋剤及び側鎖にアミノ基を有するポリペプチド又は多糖類を含む架橋性組成物である。

[0020] 側鎖にアミノ基を有するポリペプチドには、限定されない例として、天然由来のポリペプチドおよびその機能を模倣や改良した人工合成ポリペプチドや遺伝子組み換えタンパク質などがあげられる。

[0021] 天然由来のポリペプチドには、カイコ由来のフィブロインやセリシン等、及び天然由来の細胞外マトリクス構成要素、例えば、コラーゲン、アテロコラーゲン、ゼラチン、プロテオグリカン、フィブロネクチン、ラミニン、エラスチン、エンタクチン等およびそれらの誘導体があげられる。

[0022] 人工合成ポリペプチドや遺伝子組み換えタンパク質には、限定されない例として、Ｐｏｌｙ（ＰＨＧ）などのオリゴペプチドの脱水縮合体、Ｐｏｌｙ（ＰＨＧ／ＱＧＩＡ）やＰｏｌｙ（ＰＨＧ／ＲＧＤ）、Ｐｏｌｙ（ＰＨＧ／ＹＩＧＳＲ／ＩＫＶＡＶ）等の機能性ペプチド配列との共重合体等（特開２００３－３２１５００）、三洋化成工業製の「プロネクチンＦ」、「プロネクチンＬ」、宝酒造製の「レトロネクチン」などがあげられる。

[0023] 本発明においては、側鎖にアミノ基を有するポリペプチドは、好ましくは、コラーゲン、アテロコラーゲン、ゼラチン、フィブロネクチン、Ｐｏｌｙ（ＰＨＧ／ＲＧＤ）、それらの誘導体及びこれらの混合物であり、より好ましくはコラーゲン、アテロコラーゲン、ゼラチン、フィブロネクチン、それらの誘導体及びこれらの混合物である。特に好ましくは、哺乳動物または魚由来のコラーゲン、アテロコラーゲン、ゼラチン、それらの誘導体及びこれらの混合物である。

[0024] コラーゲンとは、真皮、靭帯、腱、骨、軟骨などを構成するたんぱく質のひとつであり、細胞外マトリックスを構成する要素である。コラーゲンタンパク質のペプチド鎖は、“－（グリシン）－（アミノ酸Ｘ）－（アミノ酸Ｙ）－”と、グリシンが３残基ごとに繰り返す一次構造を有する。多くの型のコラーゲンでは、このペプチド鎖が３本集まり、らせん構造を形成し、トロポコラーゲンと呼ばれる。例えば、Ｉ型コラーゲンの１本のペプチド鎖は１

０１４アミノ酸残基繰返す配列を持っており、分子量は１０万程度である。ヒトのコラーゲンには、３０種類以上あることが知られており、例えば、真皮、靭帯、腱、骨などではＩ型コラーゲンが、関節軟骨ではＩＩ型コラーゲンが主成分である。また、すべての上皮組織の裏打ち構造である基底膜にはＩＶ型コラーゲンが主に含まれている。体内で最も豊富に存在しているのはＩ型コラーゲンである。

[0025] コラーゲンであれば限定されないが、好ましくは可溶性コラーゲンである。より好ましくは水に可溶なコラーゲンである。可溶性コラーゲンには、中性塩（例えば、０．１５～０．５Ｍ ＮａＣｌ ｉｎ ０．０５Ｍ Ｔｒｉｓ＝ＨＣｌ，ｐＨ７．５）溶液に可溶化した中性塩可溶性コラーゲン、酸（例えば、０．５Ｍ酢酸または０．１～０．３Ｍクエン酸緩衝液、ｐＨ３．５～３．７）溶液に可溶化した酸可溶性コラーゲン、酵素（例えば、ペプシン）で可溶化した酵素可溶性コラーゲンなどがある。コラーゲンは、ペプチド化されたコラーゲン（コラーゲンフラグメント）であってもよい。

[0026] アテロコラーゲンとは、コラーゲン分子の両端に存在するテロペプチドを酵素処理で取り外したコラーゲンであり、水に可溶となったコラーゲンである。アテロコラーゲンは、ペプチド化されていてもよい。

[0027] ゼラチンとは、コラーゲンのうち水で長時間加熱することで、水に抽出されたものを意味する。ゼラチンは、ペプチド化されていてもよい。ゼラチンのペプチドは、コラーゲンの場合と同じである。

[0028] ゼラチンは、コラーゲンの熱変性物質であるため、アミノ酸組成はコラーゲンとほぼ同じである。由来にもよるが、酸性基が１２％程度存在し、その約３分の１がアミド化されている。ゼラチンは、水抽出の前処理工程によって、酸処理ゼラチンとアルカリ処理ゼラチンなどが存在する。酸処理ゼラチンは、塩酸や硫酸などの無機酸によって数十時間から数日処理され、脱アミド率が低いのに対し、アルカリ処理ゼラチンは、２～３ヶ月の石灰漬工程で１００％近く脱アミドされている。

[0029] 本発明においては、側鎖にアミノ基を有するポリペプチドとして、前記の

中でも、コラーゲン、アテロコラーゲン、ゼラチン、それらの誘導体又はこれらの混合物から選択されるものが好ましい。

[0030] 本発明において、多糖とは、単糖分子がグリコシド結合によって多数重合した糖のことである。本発明における側鎖にアミノ基を有する多糖類としては、脱アセチル化キチンやキトサン（例えば大日精化製のダイキトサンVL）、スクシニル化キトサン、グリセリル化キトサン、カルボキシメチル化キトサン、ヒドロキシブチルーヒドロキシプロピル化キトサンなどのキトサン誘導体、アミノ化デキストラン、アミノ化デンプン、アミノアルキル化プルラン、アミノ化ヒアルロン酸、アミノ化コンドロイチン硫酸、アミノ化セルロースなどの天然及び半人工多糖類の誘導体が挙げられる。

[0031] 本発明の架橋性組成物において、側鎖にアミノ基を有するポリペプチド又は多糖類、オリゴ糖酸化物の濃度は、それらの種類に応じて、組成物溶液の反応性や粘度などを考慮して適宜設定することができる。例えば、側鎖にアミノ基を有するポリペプチドがコラーゲンの場合、その濃度は好ましくは０．３％以上であり、ゼラチンの場合、その濃度は好ましくは５％以上である。また、例えば、側鎖にアミノ基を有する多糖類がキトサンの場合、その濃度は１％以上が好ましい。また、オリゴ糖酸化物の濃度としては、例えば、ラフィノース酸化物の場合、通常０．０１％以上であり、好ましくは０．０５％以上である。

[0032] 本発明の架橋性組成物は、その他の添加剤、例えば架橋剤の助剤、反応促進剤、遅延剤、分散剤（凝集防止剤）、補強材（繊維、フィラメント、ウィスカー、粒子、微小ゲル）、液滴などを含有することができる。

[0033] 架橋体

本発明の更なる形態は、前記架橋性組成物から得られる架橋体である。

本発明の架橋体とは、オリゴ糖酸化物のアルデヒド基とポリペプチド又は多糖類のアミノ基が共有結合しているオリゴ糖酸化物－ポリペプチド複合体（－ポリペプチドーオリゴ糖酸化物－ポリペプチドー）及びオリゴ糖酸化物－多糖類複合体（多糖－オリゴ糖酸化物－多糖）を意味する。ここで、オリ

ゴ糖酸化物－ポリペプチド間の共有結合は、通常、オリゴ糖酸化物のアルデヒド基とポリペプチドの側鎖のアミノ基の共有結合およびオリゴ糖酸化物のアルデヒド基とポリペプチドのアミノ末端のアミノ基の共有結合の混合からなるが、オリゴ糖酸化物のアルデヒド基とポリペプチドの側鎖のアミノ基の共有結合だけからなっていてもよいし、オリゴ糖酸化物のアルデヒド基とポリペプチドのアミノ末端のアミノ基の共有結合だけからなっていてもよい。

[0034] オリゴ糖酸化物のアルデヒド基とポリペプチド又は多糖類のアミノ基が共有結合しているとは、架橋体中に、オリゴ糖酸化物のアルデヒド基とポリペプチド又は多糖類のアミノ基の共有結合が少なくとも１つ存在することを意味する。

[0035] 架橋体には、共有結合に参加していないオリゴ糖酸化物のアルデヒド基とポリペプチド又は多糖類のアミノ基が存在していることが好ましい。血管伸張を誘導するための血管新生因子などを担持するためには、これらの生理活性物質と相互作用するための官能基を必要とする場合がある。例えば電荷が正に偏っているｂＦＧＦは、オリゴ糖酸化物のアルデヒド基と静電相互作用をする。また、良好な細胞接着性や酵素分解性を維持するためには、オリゴ糖酸化物のアルデヒド基とポリペプチド又は多糖類のアミノ基間の共有結合形成によるポリペプチド側鎖構造の破壊や、立体構造変化を最小限にすることが望ましい。

[0036] 本発明の好ましい実施態様は、架橋体がゲル化した状態（以下単に「ゲル」とも言う。）である。ここで、ゲルとは架橋体（架橋性組成物）において流動性が失われた状態にあることをいう。本発明における架橋体とは、上記の通り、オリゴ糖酸化物のアルデヒド基とポリペプチドのアミノ基が共有結合してオリゴ糖酸化物－ポリペプチド複合体、又はオリゴ糖酸化物のアルデヒド基と多糖類のアミノ基が共有結合してオリゴ糖酸化物－多糖類複合体を形成しているものをいい、本発明の架橋体にはゲル化していない場合も含まれるが、本発明においては、前記架橋性組成物をゲル化させることにより、安定した構造を有する大型の再生組織の足場材料を得ることが可能となり特

に好ましい。

[0037] 本発明の架橋体は、生理活性物質を含有することができる。

生理活性物質には、限定されない例として、増殖因子およびサイトカイン、抗体などが挙げられる。増殖因子およびサイトカインには、限定されない例として、血管内皮細胞増殖因子（vascular endothelial growth factor, ＶＥＧＦ）、酸性線維芽細胞増殖因子（acidic fibroblast growth factor, ａ－ＦＧＦ）、塩基性線維芽細胞増殖因子（basic fibroblast growth factor, ｂ－ＦＧＦ）、血小板由来内皮細胞増殖因子（platelet-derived endothelial cell growth factor, ＰＤ－ＥＣＧＦ）、トランスフォーミング増殖因子（transforming growth factor, ＴＧＦ－α、ＴＧＦ－β）、腫瘍壊死因子（angiogenin tumor necrosis factor-α, ＴＮＦ－α）、肝細胞増殖因子（hepatocyte growth factor, ＨＧＦ）、顆粒球マクロファージーコロニー刺激因子（Granulocyte/Macrophage-Colony Stimulating Factor, ＧＭ－ＣＳＦ）、インシュリン、インシュリン様成長因子（Insulin-like growth factor, ＩＧＦ－Ｉ、ＩＧＦ－ＩＩ）、エリスロポエチン（ＥＰＯ）、トロンボポエチン（ＴＰＯ）、上皮細胞増殖因子（epidermal growth factor：ＥＧＦ）、ヘパリン結合性増殖因子（heparin binding growth factor：ｈｂｇｆ）、神経成長因子（nerve growth factor：ＮＧＦ）、筋肉形成因子（muscle morphogenic factor：ＭＭＦ）、骨形成タンパク質（bone morphogenetic protein, ＢＭＰ）等があげられる。抗体には、限定されない例として、抗ＣＤ３抗体や抗ＣＤ２８抗体などの細胞を刺激できる抗体などが挙げられる。好ましくは、塩基性線維芽細胞増殖因子（basic fibroblast growth factor, ｂ－ＦＧＦ）、血管内皮細胞増殖因子（vascular endothelial growth factor, ＶＥＧＦ）、血小板由来内皮細胞増殖因子（platelet-derived endothelial cell growth factor, ＰＤ－ＥＣＧＦ）、肝細胞増殖因子（hepatocyte growth factor, ＨＧＦ）、顆粒球マクロファージーコロニー刺激因子（granulocyte/macrophage-colony stimulating factor, ＧＭ－ＣＳＦ）であり、より好ましくは塩基性線維芽細胞増殖因子（basic fibroblast growth factor

，ｂ－ＦＧＦ）、血管内皮細胞増殖因子（vascular endothelial growth factor，ＶＥＧＦ）である。生理活性物質は、生理活性物質を分泌する細胞であってもよい。

[0038] また、本発明の架橋体は、細胞を含有することができる。

細胞の種類は、限定されないが、好ましくは、軟骨細胞；繊維軟骨細胞；骨細胞；骨芽細胞；破骨細胞；滑膜細胞；骨髄細胞；間葉細胞；間質細胞；脂肪組織由来の前駆細胞；末梢血液前駆細胞；インシュリン産生細胞；Ｂ細胞あるいはハイブリドーマ等の抗体産生細胞；ホルモン産生細胞；肥満細胞；化学伝達物質産生細胞（免疫系細胞）；遺伝子組み替え細胞；幹細胞（ＥＳ細胞、ＥＧ細胞、ｉＰＳ細胞、および成体（組織）幹細胞など）；肝、神経、甲状腺、胸腺、副腎髄質、副腎皮質、腎臓あるいは消化管の生理活性因子を産生する細胞；及びこれらの細胞と他の細胞の組み合わせが挙げられる。細胞は、凝集形態（スフェロイド等）や組織の一部であってもよい。細胞の由来は、限定されないが、好ましくは、哺乳動物、より好ましくは、イヌ、ネコ等の愛玩動物；ヒト；ウシ、ブタ、ウマ、ヒツジ、ヤギ等の家畜動物；サル、ウサギ、マウス、ラット等の実験動物、特に好ましくはヒトである。また、細胞は、免疫による拒絶を避けるために、移植対象由来であることが好ましい。

[0039] また、本発明の架橋体は、更に培養液を含有することができる。

培養液の種類は、細胞の種類や状態、目的によってさまざまに調製され、例えば、純水、生理食塩水、ホストの体液などがあるが、これらに限定されるものではない。

[0040] 本発明の架橋体は、アルデヒド基を有するオリゴ糖酸化物と側鎖にアミノ基を有するポリペプチド又は多糖類を含有する架橋性組成物を調製し、架橋反応を進行させることにより製造することができる。具体的には、側鎖にアミノ基を有するポリペプチド又は多糖類のリン酸緩衝溶液を調製してｐＨを調整し、これにアルデヒド基を有するオリゴ糖酸化物を添加して架橋性組成物とし、所定時間攪拌して反応を進行させる。攪拌を続けると、溶液が増粘

し、更に攪拌すると流動性が失われてゲルを形成することができる。

本発明においては、オリゴ糖酸化物のアルデヒド基とポリペプチド又は多糖類のアミノ基との化学結合反応はアルカリ条件下で顕著に促進されると考えられるため、架橋性組成物のｐＨを好ましくは７．０以上、より好ましくは７．６以上に調整する。

[0041] 本発明の架橋体の製造方法において、反応温度は使用するポリペプチドの種類に応じて設定することができるが、反応温度が高いほどゲル化時間を短くすることができる。また、オリゴ糖酸化物の濃度は使用するポリペプチドの種類などに応じて設定することができるが、オリゴ糖酸化物の濃度が高いほどゲル化時間を短くすることができる。

[0042] 細胞培養システム

本発明の更なる形態は、本発明の架橋体を用いた細胞培養システム及び細胞を培養する方法に関る。

本発明の細胞の培養方法においては、アルデヒド基を有するオリゴ糖酸化物と側鎖にアミノ基を有するポリペプチド又は多糖類を混合して架橋性組成物を調製し、そのｐＨを調整し、ゲル化を進行させる。そして、ゲル化を進行させる前、進行中、完了後の任意の時点において、細胞、培養液を添加して細胞を培養する。

本発明の一つの態様として、架橋性組成物が増粘したところで、これに細胞を添加し混合して、シャーレ等に細胞混合液を注入して、所定の温度・時間静置してゲル化させて所定の厚み・径を有するディスク状ゲルを培養液で被覆して細胞を培養することができる。

また、別の態様として、架橋性組成物が増粘したところで、これに別工程で細胞を播種して所定期間培養して得たスフェロイドを添加し混合して、所定の温度・時間静置してゲル化させて所定の厚み・径を有するディスク状ゲルを培養液で被覆して細胞を培養することができる。

[0043] 培養液としては、例えば、純水、生理食塩水、リン酸緩衝液、イーグル基礎培地（Ｂａｓａｌ　Ｍｅｄｉｕｍ　Ｅａｇｌｅ：ＢＭＥ）、ダルベッコ改

変イーグル培地（Ｄｕｌｂｅｃｃｏ’ｓ Ｍｏｄｉ ｅｄ Ｅａｇｌｅ’ｓ Ｍｅｄｉｕｍ：ＤＭＥＭ）、ＤＭＥＭ：Ｆ１２培地、グラスゴー最少必須培地（Ｇｌａｓｇｏｗ Ｍｉｎｉｍｕｍ Ｅｓｓｅｎｔｉａｌ Ｍｅｄｉｕｍ：ＧＭＥＭ）、グレース昆虫培地（Ｇｒａｃｅ’ｓ Ｉｎｓｅｃｔ Ｍｅｄｉｕｍ）、ハム培地（Ｈａｍ’ｓ Ｍｅｄｉｕｍ）、イスコフ改変ダルベッコ培地（Ｉｓｃｏｖｅ’ｓ Ｍｏｄｉ ｅｄ Ｄｕｌｂｅｃｃｏ’ｓ Ｍｅｄｉｕｍ：ＩＭＤＭ）、Ｌ－１５（リーボビッツ）培地（Ｌ－１５（Ｌｅｉｂｏｖｉｔｚ）Ｍｅｄｉｕｍ）、マッコイ５Ａ培地（ＭｃＣｏｙ’ｓ ５Ａ Ｍｅｄｉｕｍ）、最小必須培地－イーグル（ＭＥＭ Ｅａｇｌｅ／Ｅ－ＭＥＭ）、１９９培地（Ｍｅｄｉｕｍ １９９）、ＮＣＴＣ－１０９培地（ＮＣＴＣ－１０９ Ｍｅｄｉｕｍ）、リヒター ＣＭ（Ｒｉｃｈｔｅｒ’ｓ ＣＭ）、ＲＰＭＩ１６４０培地（ＲＰＭＩ １６４０ Ｍｅｄｉｕｍ）、昆虫培地、ウェイマス培地（Ｗａｙｍｏｕｔｈ’ｓ Ｍｅｄｉｕｍ）、ウィリアム培地（Ｗｉｌｌｉａｍ’ｓ Ｍｅｄｉｕｍ）、体液などが挙げられるが、これらに限定されない。

[0044] 本発明の細胞培養システム及び細胞の培養方法においては、前記した細胞及びスフェロイド、細胞培養液を使用することができる。また、本発明の細胞培養システムでは、前記した生理活性物質をゲル中に適宜添加することができる。また、ゲルの機械的強度を上げるため、ゲル中に補強材を含有させることができる。

更に、下記の移植システムに記載するような、培養液をゲルに注入するフローシステムを組み込むことができる。

[0045] また、本発明の細胞培養システムは、透明性が高く細胞観察にも適したシステムである。従って、移植を想定した細胞増殖に必要な成分・因子以外にも、細胞の挙動に影響（好影響・悪影響）を与える他の薬剤をゲル中に添加することも可能である。この場合は、本発明のゲルは、薬物担体としての機能を発揮し得る。

[0046] 移植システム

本発明の更なる形態は、本発明の架橋体又は本発明の細胞培養システムで得られる培養細胞を、体内に移植するシステム及び方法である。また、本発明の別の態様は、アルデヒド基を有するオリゴ糖酸化物及び側鎖にアミノ基を有するポリペプチド又は多糖類を含む架橋性組成物から形成されたゲル中に細胞又は細胞組織が包埋されており、被験者の体内に移植されるように用いられる、再生組織を構築するための移植材料である。

[0047] 本発明の移植システムにおいては、細胞を内包した架橋体、スフェロイド等の細胞組織を内包した架橋体（例えば、スフェロイドの周囲を足場材料である架橋体で被覆されたもの）、複数の細胞組織を内包した架橋体（例えば、周囲を架橋体で被覆された複数の細胞組織が二次元又は三次元に配置されたもの）、細胞を含まない架橋体を、宿主母床に移植することができる。

本発明の移植システムで用いられる架橋体は、適度な隙間のあるマトリックス構造を有し、血管壁構成細胞との接着性が良好であるため生体内で安定した構造を保つことができ、一方、血管新生プロテアーゼには分解されるため血管が成長していくためのスペースを確保することができ血管新生を効率的に誘導することが可能である。

[0048] 本発明の移植システムにおいては、前記架橋体が血管新生因子を含有していることが好ましく、架橋体中のポリペプチドに結合していることが特に好ましい。これにより、血管新生因子を架橋体外部に放出せずに、架橋体内部に血管を誘導させることができる。

[0049] また、本発明の移植システムは、移植後の架橋体又は培養細胞に、外部から培養液を供給する手段を備えることもできる。ホスト血管床から血管新生を誘導し架橋体内部に引き込み移植細胞内に血管豊富な肉芽組織を誘導するには数日間かかり、その間中心壊死により細胞数が徐々に低減する傾向にある。培養液を外部から供給することによって、肉芽組織が誘導されるまでの間中心壊死を抑制して細胞を数日間にわたって生存させることが可能となる。

外部から培養液を供給するには、培養液をポンプ等によってゲルの中心（

場合によっては複数点）に加圧的に注入することができる。

[0050] 本発明の移植システムをヒトに対し利用すれば、移植された培養細胞はヒトの生体内で機能を長期間発現することとなり、そのまま人工臓器となる。培養細胞の大きさや形状、もしくは両者で機能の発現量を制御できる。培養細胞として肝実質細胞を用いれば人工肝臓としての役割を示し、例えば肝酵素欠損症、血友病、凝固異常症、肝不全症、劇症肝炎、慢性肝炎、肝硬変、肝切除患者の治療、感染症等で挙げられる各疾患の本質的な治療、もしくは肝機能の補佐を目的に使用される。また、移植される組織（臓器）としては、肝臓、心臓、血管組織、腎臓、肺、膵臓（膵島）、胃腸組織、眼（角膜）、脳、神経組織、骨髄、骨、歯、軟骨、皮膚（毛髪）、筋肉などがある。

[0051] 本発明の移植システムを動物に対し利用すれば、培養細胞移植動物となる。培養細胞の大きさや形状で機能の発現量を制御できる。ここで使用される動物はラット、マウス、モルモット、マーモセット、ウサギ、イヌ、ブタ、チンパンジーあるいはそれらの免疫不全動物等が挙げられるが特に限定されるものではない。このような膵島移植動物は、例えば、被検物質をこの膵島移植動物に投与し、当該被検物質の膵機能への影響を判定する膵機能評価システム等を目的に使用されるが、特に限定されるものではない。

実施例

[0052] 以下に本発明の実施例を説明するが、本発明は、これらの実施例に何ら限定されるものではない。

[0053] アルデヒド基を有するオリゴ糖酸化物の調製

［合成例１］

ラフィノース五水和物（和光純薬、Mw：５９４．５）８００ｍｇ（１．４ｍｍｏｌ、糖ユニットでは４ｍｍｏｌ）を(1)０．１Ｎ水酸化ナトリウム水溶液（１０ｍＬ）または(2)蒸留水（１０ｍＬ）に溶解し、さらに氷冷下で過ヨウ素酸ナトリウム６４０ｍｇ（３ｍｍｏｌ）を添加した。この混合溶液を遮光下２４℃で６０時間撹拌し、酸化反応をおこなった。反応溶液にエタノール（４０ｍＬ）を添加し、１２時間静置した後、析出したヨウ素酸化物の沈

殿物を濾過にて除去した。濾液を減圧下にて濃縮乾固し、ラフィノース酸化物を得た（収量：５８０ｍｇ）。

[0054] ［合成例２］

スクロース（和光純薬、Ｍｗ：３４２．３）６９０ｍｇ（２ｍｍｏｌ、糖ユニットでは４ｍｍｏｌ）を(1)０．１Ｎ水酸化ナトリウム水溶液（１０ｍＬ）または(2)蒸留水（１０ｍＬ）に溶解し、さらに氷冷下で過ヨウ素酸ナトリウム６４０ｍｇ（３ｍｍｏｌ）を添加した。この混合溶液を遮光下２４℃で６０時間撹拌し、酸化反応をおこなった。反応溶液にエタノール（４０ｍＬ）を添加し、１２時間静置した後、析出したヨウ素酸化物の白色沈殿物を濾過にて除去した。濾液の含水エタノールを減圧下、共沸によって蒸発させることで、スクロース酸化物を濃縮乾固物として得た（収量：６４０ｍｇ）。

[0055] ［合成例３］

グルコース（和光純薬、Ｍｗ：１８０．２）７３０ｍｇ（４ｍｍｏｌ）を(1)０．１Ｎ水酸化ナトリウム水溶液（１０ｍＬ）または(2)蒸留水（１０ｍＬ）に溶解し、さらに氷冷下で過ヨウ素酸ナトリウム６４０ｍｇ（３ｍｍｏｌ）を添加した。この混合溶液を遮光下２４℃で６０時間撹拌し、酸化反応をおこなった。反応溶液にエタノール（４０ｍＬ）を添加し、１２時間静置した後、析出したヨウ素酸化物の白色沈殿物を濾過にて除去した。濾液の含水エタノールを減圧下、共沸によって蒸発させることで、グルコース酸化物を濃縮乾固物として得た（収量：７３０ｍｇ）。

[0056] ［合成例４］

マルトース一水和物（和光純薬、Ｍｗ：３６０．３）７３０ｍｇ（２ｍｍｏｌ、糖ユニットでは４ｍｍｏｌ）を(1)０．１Ｎ水酸化ナトリウム水溶液（１０ｍＬ）または(2)蒸留水（１０ｍＬ）に溶解し、さらに氷冷下で過ヨウ素酸ナトリウム６４０ｍｇ（３ｍｍｏｌ）を添加した。この混合溶液を遮光下２４℃で６０時間撹拌し、酸化反応をおこなった。反応溶液にエタノール（４０ｍＬ）を添加し、１２時間静置した後、析出したヨウ素酸化物の白色沈殿物を濾過にて除去した。濾液の含水エタノールを減圧下、共沸によって蒸発

させることで、マルトース酸化物を濃縮乾固物として得た（収量：６１０ｍｇ）。

[0057] ［合成例５］

フルクトース（和光純薬、Ｍｗ：１８０．２）７３０ｍｇ（４ｍｍｏｌ）を(1)０．１Ｎ水酸化ナトリウム水溶液（１０ｍＬ）または(2)蒸留水（１０ｍＬ）に溶解し、さらに氷冷下で過ヨウ素酸ナトリウム６４０ｍｇ（３ｍｍｏｌ）を添加した。この混合溶液を遮光下２４℃で６０時間撹拌し、酸化反応をおこなった。反応溶液にエタノール（４０ｍＬ）を添加し、１２時間静置した後、析出したヨウ素酸化物の白色沈殿物を濾過にて除去した。濾液の含水エタノールを減圧下、共沸によって蒸発させることで、フルクトース酸化物を濃縮乾固物として得た（収量：５８０ｍｇ）。

[0058] ［実施例１］

（１）コラーゲン溶液のゲル化

氷上（４℃）にて０．８％アテロコラーゲン（新田ゼラチン、コラーゲンＢＭ、ブタ由来、Ｔｙｐｅ－Ｉ）リン酸緩衝溶液（ｐＨ７．６）を調製した。この溶液をエッペンチューブに０．３ｍＬずつ分注し、合成例１～５の条件(1)、(2)で調製した糖酸化物水溶液（３％）を０．０８ｍＬ添加して撹拌し、１８℃で静置した。定期的に溶液をガラス棒で接触し、酸化糖を添加してから流動性が失われるまでに要した時間をゲル化時間とした。また、比較のため過ヨウ素酸酸化処理をしていない糖についても実験を行なった。

[0059]

[表1]

表１

試験Ｎｏ	糖の種類	糖の酸化条件	ゲル化	ゲル化時間（ｈ）
１（比較例）	ラフィノース	—	×	—
2	ラフィノース酸化物	合成例１(1)	○	3
3		合成例１(2)	△	—
４（比較例）	スクロース	—	×	—
5	スクロース酸化物	合成例２(1)	○	１２
6		合成例２(2)	△	—
７（比較例）	グルコース	—	×	—
8	グルコース酸化物	合成例３(1)	○	１４４
9		合成例３(2)	×	—
１０（比較例）	マルトース	—	×	—
１１	マルトース酸化物	合成例４(1)	○	６４
１２		合成例４(2)	×	—
１３（比較例）	フルクトース	—	×	—
１４	フルクトース酸化物	合成例５(1)	○	１４４
１５		合成例５(2)	×	—

○：一週間以内にゲル化、△：増粘、×：一週間たってもゲル化・増粘が認められない

[0060] 糖水溶液に過ヨウ素酸を添加（調製条件(2)）するとｐＨ２～３程度になる。この状態で酸化反応を行うと、反応初期に発熱し、次第に溶液が黄褐色となり、さらに黒紫色のヨウ素の微結晶が析出した。得られた糖酸化物は褐色となった。同様の反応を０．１Ｎ水酸化ナトリウム水溶液（調製条件(1)）で行うと、ｐＨ５～６程度となり、溶液の褐色化やヨウ素の析出は生起しなかった。

コラーゲン溶液に糖の過ヨウ素酸酸化物を添加したところ、ゲル化は単糖であるグルコース酸化物、フルクトース酸化物と比較してオリゴ糖由来であるスクロース酸化物、ラフィノース酸化物、マルトース酸化物のほうが早いことが分かった。

また、糖酸化物の調製条件によってゲル化に違いが見られ、ｐＨ５～６程度で酸化した（調製条件(1)）糖酸化物をコラーゲン溶液に添加した場合はゲル化し易い傾向がみられた。

[0061] （２）ゲル調製時の温度によるゲル化時間への影響

氷上（４℃）にて０．３ｍＬの０．８％アテロコラーゲン（新田ゼラチン、コラーゲンＢＭ）リン酸緩衝溶液（ｐＨ７．６）を調製した。この溶液に

０．０８ｍＬの３％（５０ｍＭ）ラフィノース酸化物またはラフィノースの水溶液を添加して撹拌し、４℃、１８℃、２４℃、３７℃で静置した。

[0062] [表2]

表２

試験Ｎｏ	糖の種類	糖の酸化条件	ゲル調製時の温度	ゲル化時間	ゲルの状態
１６（比較例）	ラフィノース	—	３７℃	２０分	白濁
１７	ラフィノース酸化物	合成例１(1)	４℃	７時間	無色透明
１８			１８℃	４時間	無色透明
１９			２４℃	２時間	無色透明
２０			３７℃	５０分	無色透明

[0063] ｐＨを中性付近に調製したコラーゲン溶液は、温度上昇に伴って疎水性相互作用等の影響によって線維化し、ゲル化する。ラフィノースを添加したコラーゲン溶液は、３７℃において２０分程度で線維化し白濁したゲル状態となった。一方、コラーゲン溶液にラフィノース酸化物を添加した場合、３７℃でも線維化は認められず、無色透明のまま１時間程度でゲル化した。これはラフィノース酸化物によるコラーゲン分子の架橋化が、コラーゲン同士の会合・凝集を制限したため、線維化が抑制され、無色透明なゲルが得られたと考えられる。調製温度が４℃の場合にはゲル化時間が７時間と遅く、温度が高くなるにつれてゲル化時間が短縮する傾向がみられた。

[0064] （３）コラーゲン溶液のｐＨによるゲル化への影響

氷上（４℃）にて０．３ｍＬの０．８％アテロコラーゲン（新田ゼラチン、コラーゲンＢＭ）リン酸緩衝溶液（ｐＨ７．２、ｐＨ７．６、ｐＨ８．０）を調製した。この溶液に０．０８ｍＬの３％（５０ｍＭ）酸化ラフィノース水溶液を添加して撹拌し、１８℃で静置した。

[0065]

[表3]

表３

試験Ｎｏ	糖の種類	糖の酸化条件	ゲル調製時のｐＨ	ゲル化時間
２１	ラフィノース酸化物	合成例１(1)	６．８	×
２２			７．２	１６時間
２３			７．６	４時間
２４			８．０	１時間
２５		合成例１(2)	８．０	４時間

[0066] 中性よりも低いｐＨでは反応が十分進行せず、ｐＨが７．６以上の場合に、ゲル化は早く進行した。また、ｐＨが５以下で過塩素酸酸化をしたラフィノース酸化物（合成例１(2)）を使用した場合であっても、ゲル調製時におけるコラーゲン溶液のｐＨが高い場合には、ゲル化することが確認された。

[0067] ［実施例２］

ゼラチン溶液のゲル化

（１）ブタ由来ゼラチンの糖酸化物によるゲル化

４０℃にてゼラチン（和光純薬社製０７７－０３１５５、ブタ由来）の水溶液を作製し、リン酸緩衝溶液を添加し、最終的に１５％ゼラチン溶液（ｐＨ７．６）を調製した。この溶液０．３ｍＬに３％糖酸化物の水溶液０．０６ｍＬを添加して撹拌し、４０℃で静置した。

[0068] [表4]

表４

試験Ｎｏ	糖の種類	糖の酸化条件	ゲル化	ゲル化時間
２６	ラフィノース酸化物	合成例１(1)	○	４時間３０分
２７	スクロース酸化物	合成例２(1)	○	５時間
２８	グルコース酸化物	合成例３(1)	×	—
２９	マルトース酸化物	合成例４(1)	×	—
３０	フルクトース酸化物	合成例５(1)	×	—

○：５日以内にゲル化、×：５日たってもゲル化・増粘が認められない

[0069] ブタ由来ゼラチンは室温で可逆性の物理ゲルを形成することから、上記ゲルの作製試験は、ゼラチン溶液が融解する４０℃で行った。ラフィノース酸化物とスクロース酸化物を添加した場合にはゲル化したが、グルコース酸化

物、マルトース酸化物、フルコトース酸化物ではゲル化は認められなかった。４０℃においては、コラーゲンの熱劣化と糖酸化物による架橋反応が同時に進行すると予想されるため、ゲルを調製するには速やかな架橋反応が必要と考えられる。上記の糖酸化物はいずれも架橋構造は形成すると考えられるが、ラフィノース酸化物とスクロース酸化物は、効率良くゲル化する能力が認められた。

[0070] （２）ゼラチン溶液のｐＨによるゲル化への影響

４０℃にてゼラチン（和光純薬社製０７７－０３１５５、ブタ由来）の水溶液を作成し、リン酸緩衝溶液を添加し、最終的に１５％ゼラチン溶液（ｐＨ８、ｐＨ９）を調製した。この溶液０．３ｍＬに３％ラフィノース酸化物または３％スクロース酸化物の水溶液０．０６ｍＬを添加して撹拌し、４０℃で静置した。

[0071] [表5]

表５

試験Ｎｏ	糖の種類	糖の酸化条件	ゲル調製時のｐＨ	ゲル化	ゲル化時間
３１	ラフィノース酸化物	合成例１(1)	８	○	３時間
３２			９	○	２時間
３３	スクロース酸化物	合成例２(1)	８	○	４時間
３４			９	○	２時間３０分

[0072] ｐＨが中性付近ではゲル化が十分進行しないことが確認された。また、ゼラチン溶液のｐＨが高い場合には、ゲル化時間が短縮する傾向が認められた。

[0073] （３）糖酸化物の添加濃度によるゼラチン溶液のゲル化への影響

４０℃にてゼラチン（和光純薬社製、０７７－０３１５５、ブタ由来）の水溶液を作成し、リン酸緩衝溶液を添加し、最終的に１５％ゼラチン溶液（ｐＨ９）を調製した。この溶液０．３ｍＬに３％、６％、９％ラフィノース酸化物または３％、６％、９％スクロース酸化物の水溶液０．０６ｍＬを添加して撹拌し、４０℃で静置した。

[0074] [表6]

表６

試験Ｎｏ	糖の種類	糖の酸化条件	糖酸化物濃度	ゲル化時間
３５	ラフィノース酸化物	合成例１(1)	０．６％	２時間
３６			１．２％	３０分
３７			１．８％	２０分
３８	スクロース酸化物	合成例２(1)	０．６％	２時間３０分
３９			１．２％	１時間２０分
４０			１．８％	５０分

[0075] 糖酸化物の添加濃度が高くなるにつれて、ゼラチン溶液のゲル化時間が短縮する傾向が認められた。

[0076] （４）魚由来ゼラチンの糖酸化物によるゲル化

１８℃にてゼラチン（ＳＩＧＭＡ社製、Ｇ７０４１－１００Ｇ、魚由来）の水溶液を作製し、リン酸緩衝溶液を添加し、最終的に１５％ゼラチン溶液（ｐＨ７．６）を調製した。この溶液０．３ｍＬに３％糖酸化物の水溶液０．０６ｍＬを添加して撹拌し、１８℃で静置した。

[0077] [表7]

表７

試験Ｎｏ	糖の種類	糖の酸化条件	ゲル化	ゲル化時間
４１	ラフィノース酸化物	合成例１(1)	○	４８時間
４２	スクロース酸化物	合成例２(1)	○	６４時間
４３	グルコース酸化物	合成例３(1)	×	—
４４	マルトース酸化物	合成例４(1)	×	—
４５	フルクトース酸化物	合成例５(1)	×	—

○：５日以内にゲル化、×：５日たってもゲル化・増粘が認められない

[0078] 魚由来ゼラチンはおよそ４℃以下で可逆性の物理ゲルを形成することから、上記のゲルの作製試験は室温付近（１８℃）で行った。ラフィノース酸化物とスクロース酸化物を添加した場合にはゲル化したが、グルコース酸化物、マルトース酸化物、フルコトース酸化物ではゲル化は認められなかった。

[0079] （５）キトサン誘導体のラフィノース酸化物によるゲル化

２４℃にてカルボキシメチルキトサン（大日精化製、ＣＭキトサン）の２％水溶液（ｐＨ８）を調製した。この溶液０．３ｍＬに９％ラフィノース酸化物の水溶液０．０６ｍＬを添加して撹拌し、２４℃にて静置した。

[表8]

表８

試験No	糖の種類	糖の酸化条件	ゲル調製時のｐＨ	ゲル化時間
４６	ラフィノース酸化物	合成例１(1)	８	６０時間

カルボキシメチルキトサンは分子中に反応性のアミノ基を有する水溶性の多糖類である。調製した水溶液は弱アルカリ性を示した。この水溶液にラフィノース酸化物を添加したところ、次第に増粘しゲル化した。

[0080] ［実施例３］

細胞培養試験

４℃で０．８％アテロコラーゲン（新田ゼラチン、コラーゲンＢＭ）リン酸緩衝溶液（ｐＨ７．６、１ｍＬ）に３％酸化ラフィノース水溶液（合成例１(1)の酸化条件）（０．２ｍＬ）を添加して撹拌した。この混合溶液を１８℃で４時間静置し、増粘したところで１２０μＬを分取し、各細胞を添加して混合した。シャーレに密着した厚さ２ｍｍのビニールシートに穴（φ８ｍｍ）をあけ、その中に細胞混合液を注入し、湿潤下１８℃で１時間静置してゲル化させた。ディスク状ゲル（厚さ２ｍｍ，φ８ｍｍ）を培養液で被覆して培養した。

[0081] （１）正常ヒト臍帯静脈内皮細胞（ＨＵＶＥＣ）

上記のディスク状ゲル（１２０μＬ）１つ分にＧＦＰ－ｅｘｐｒｅｓｓｉｎｇ　ＨＵＶＥＣ（Ａｎｇｉｏ－Ｐｒｏｔｅｏｍｉｅ社）が6×10^{6}細胞混入するように調製した。培養液はＥＧＭ－２（Ｌｏｎｚａ社）を用いた。

培養を開始して５日目の顕微鏡での観察結果を図１に示す。

[0082] （２）肝細胞

肝細胞はウイスターラット（３００ｇ）の肝よりコラーゲナーゼ灌流法にて採取した。Ｐｒｉｍｅ－Ｓａｒｆａｅ２４穴プレート（住友ベークライト）に肝細胞（8×10^{4}細胞／穴）を播種し、４日間培養した後にスフェロイドになったところで２４穴分をディスク状ゲル（１２０μＬ）に添加した。

培養液は吉里らの方法に従って調製して用いた。

スフェロイドをゲルに添加してから３日目の顕微鏡での観察結果を図２に示す。

[0083] （３）心筋細胞

心筋細胞は生後１日のウイスターラットの子供から採取した。Ｐｒｉｍｅ－Ｓａｒｆａｅ２４穴プレート（住友ベークライト）に心筋細胞（８×１０^{4}細胞／穴）を播種し、４～６日間培養した後にスフェロイドになったところで６穴分をディスク状ゲル（１２０μＬ）に添加した。培養液はＲＣＢＭ（Ｒａｔ Ｃａｒｄｉａｃ Ｍｙｏｃｙｔｅ Ｂａｓａｌ Ｍｅｄｉｕｍ，Ｌｏｎｚａ社）を用いた。

スフェロイドをゲルに添加してから３日目の顕微鏡での観察結果を図２に示す。

[0084] 上記（１）～（３）の実験において、得られたゲルは透明性が高く、ゲル内部における細胞の三次元的な増殖過程を経時的に観察することが可能であった。ゲルの細胞毒性は問題なく、肝細胞スフェロイドの場合、図２の矢印で示すように、球状の細胞塊から新たな細胞が萌芽する過程が観察された。ＨＩＵＶＥＣや心筋細胞ではゲル内培養翌日には細胞の分岐構造が観察され、数日後には三次元的な網目構造が構築された。心筋細胞では細胞個々の拍動から次第に連動した拍動に移行し、最終的にはゲル全体が拍動した（図３中矢印で示した部分）。

[0085] ［実施例４］

ラットへの移植実験

氷上（４℃）にて０．３ｍＬの０．８％アテロコラーゲン（新田ゼラチン、コラーゲンＢＭ）リン酸緩衝溶液（ｐＨ７．６）を調製した。この溶液に０．０６ｍＬの３％（５０ｍＭ）ラフィノース酸化物水溶液を添加して撹拌した。輪切りにしたｅＰＴＦＥ人工血管（高さ１ｍｍ、内径φ３ｍｍ）に１４μＬずつ分注し、１８℃で４時間３０分静置してゲル化させた。ゲルにＨＡＮＫＳ緩衝液を被覆してゲル化の進行を抑制し、３７℃、湿潤下で一晩静

置した。

得られたゲルをＷｉｓｔｅｒ系オスラット（８週齢、体重３００－６００ｇ）腹部に皮下埋植し、５日後に摘出した。Ｈｅｍａｔｏｘｙｌｉｎ－ｅｏｓｉｎ（Ｈ－Ｅ）染色を施し、光学顕微鏡下で組織学的に観察した。図４に移植実験の概略フロー図を示す。

[0086] 図５に光学顕微鏡での観察結果を示す。移植したゲル（写真中央部の黄色破線で囲まれた部分）は、５日間で血管豊富な肉芽組織に置き換わったことが分かる。また、ゲルを足場として血管のみが侵入している場合も見られ、血管を誘導する効果も期待される。

請求の範囲

[請求項1] アルデヒド基を有するオリゴ糖酸化物、及び側鎖にアミノ基を有するポリペプチド又は多糖類を含む架橋性組成物。

[請求項2] オリゴ糖酸化物がオリゴ糖の過ヨウ素酸酸化から生成された、請求項１に記載の架橋性組成物。

[請求項3] 前記ポリペプチドが、コラーゲン、アテロコラーゲン、ゼラチン、それらの誘導体又はこれらの混合物から選択される、請求項１又は２に記載の架橋性組成物。

[請求項4] 前記多糖類が、脱アセチル化キチン又はキトサン、スクシニル化キトサン、グリセリル化キトサン、カルボキシメチル化キトサン、ヒドロキシブチルーヒドロキシプロピル化キトサン、アミノ化デキストラン、アミノ化デンプン、アミノアルキル化プルラン、アミノ化ヒアルロン酸、アミノ化コンドロイチン硫酸、アミノ化セルロース、それらの誘導体又はこれらの混合物から選択される、請求項１又は２に記載の架橋性組成物。

[請求項5] 前記オリゴ糖が、スクロース、マルトース、ラフィノース、これらの誘導体及びこれらの２以上の混合物からなる群から選択される、請求項１～４のいずれか１項に記載の架橋性組成物。

[請求項6] 請求項１～５のいずれか１項に記載の架橋性組成物から得られる架橋体。

[請求項7] 前記オリゴ糖酸化物のアルデヒド基と前記ポリペプチド又は多糖類のアミノ基が共有結合している、請求項６に記載の架橋体。

[請求項8] ゲル化した状態にある、請求項６又は７に記載の架橋体。

[請求項9] 血管新生因子を含有する、請求項６～８のいずれか１項に記載の架橋体。

[請求項10] 細胞又は細胞組織を含有する、請求項６～９のいずれか１項に記載の架橋体。

[請求項11] 細胞培養液を含有する、請求項１０に記載の架橋体。

[請求項12] 請求項６～１１のいずれか１項に記載の架橋体を用いた、細胞培養システム。

[請求項13] 請求項６～１１のいずれか１項に記載の架橋体を被験者の体内に移植するシステム。

[請求項14] 請求項１２に記載の細胞培養システムで得られる培養細胞を、被験者の体内に移植するシステム。

[請求項15] （ａ）請求項１～５のいずれか１項に記載の架橋性組成物を調製する工程、

（ｂ）前記架橋性組成物のｐＨを７．０以上に調整する工程

を含む、前記架橋性組成物のゲルを調製する方法。

[請求項16] （ａ）請求項１～５のいずれか１項に記載の架橋性組成物を調製する工程、

（ｂ）前記架橋性組成物のｐＨを７．０以上に調整する工程、

（ｃ）前記架橋性組成物をゲル化させる工程

を含み、（ｃ）の工程前、工程中または工程後の時点で、前記架橋性組成物に細胞又は細胞組織を添加する、細胞を培養する方法。

[請求項17] 前記（ｃ）の工程前、工程中または工程後の時点で前記架橋性組成物に培養液を添加する、請求項１６に記載の細胞を培養する方法。

[請求項18] 請求項１５に記載の方法で得られるゲルを被験者の体内に移植する方法。

[請求項19] 請求項１６又は１７に記載の方法で得られる培養細胞を被験者の体内に移植する方法。

[請求項20] アルデヒド基を有するオリゴ糖酸化物及び側鎖にアミノ基を有するポリペプチド又は多糖類を含む架橋性組成物から形成されたゲル中に細胞又は細胞組織が包埋されており、被験者の体内に移植されるように用いられる、再生組織を構築するための移植材料。

[請求項21] アルデヒド基を有するオリゴ糖酸化物からなり、側鎖にアミノ基を有するポリペプチド又は多糖類との架橋反応に用いられる架橋剤。

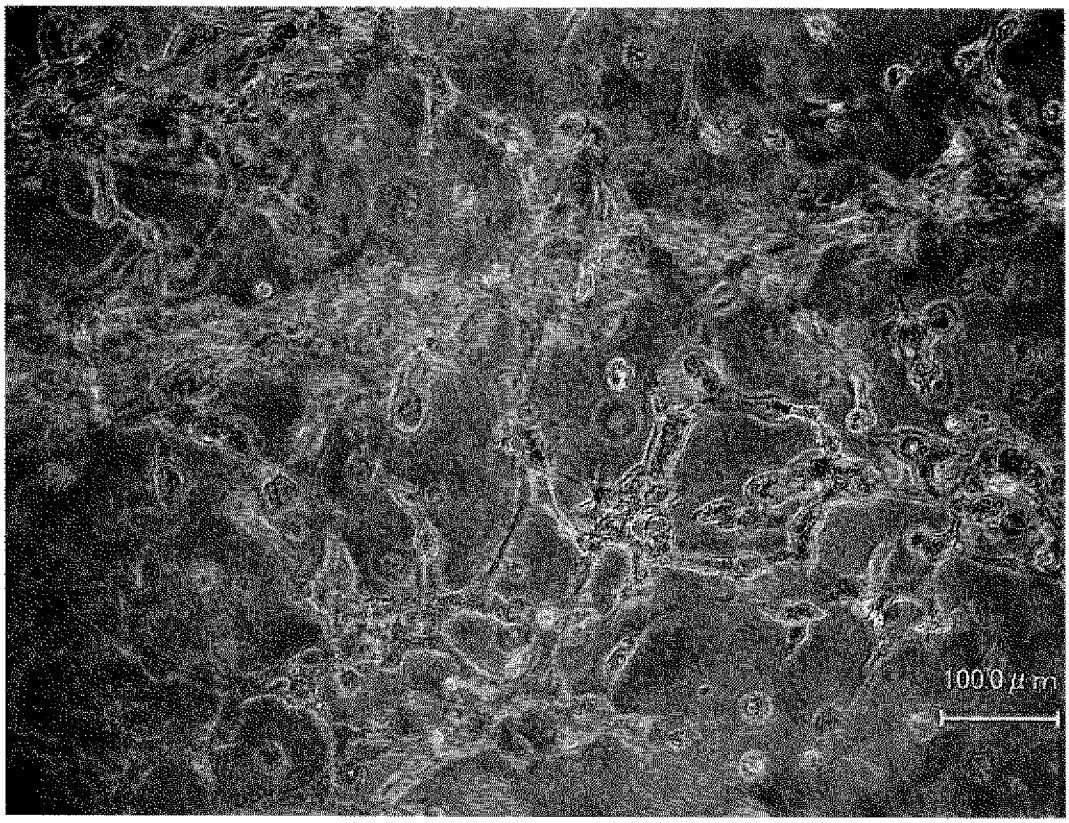
［請求項22］ オリゴ糖酸化物がオリゴ糖の過ヨウ素酸酸化から生成される、請求項２１に記載の架橋剤。

［請求項23］ 前記オリゴ糖が、スクロース、マルトース、ラフィノース、これらの誘導体及びこれらの２以上の混合物からなる群から選択される、請求項２１又は２２に記載の架橋剤。

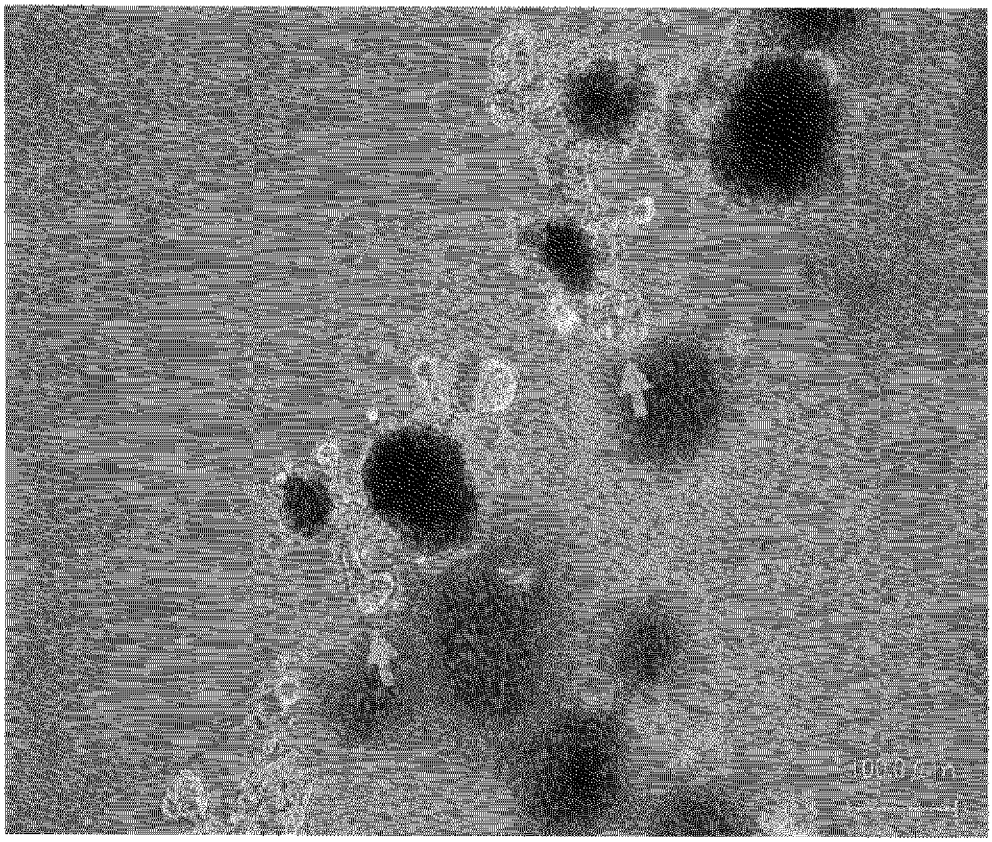
［請求項24］ 側鎖にアミノ基を有するポリペプチドが、コラーゲン、アテロコラーゲン、ゼラチン、それらの誘導体又はこれらの混合物から選択される、請求項２１～２３のいずれか１項に記載の架橋剤。

［請求項25］ 側鎖にアミノ基を有する多糖類が、脱アセチル化キチン又はキトサン、スクシニル化キトサン、グリセリル化キトサン、カルボキシメチル化キトサン、ヒドロキシブチルーヒドロキシプロピル化キトサン、アミノ化デキストラン、アミノ化デンプン、アミノアルキル化プルラン、アミノ化ヒアルロン酸、アミノ化コンドロイチン硫酸、アミノ化セルロース、それらの誘導体又はこれらの混合物から選択される、請求項２１～２３のいずれか１項に記載の架橋剤。

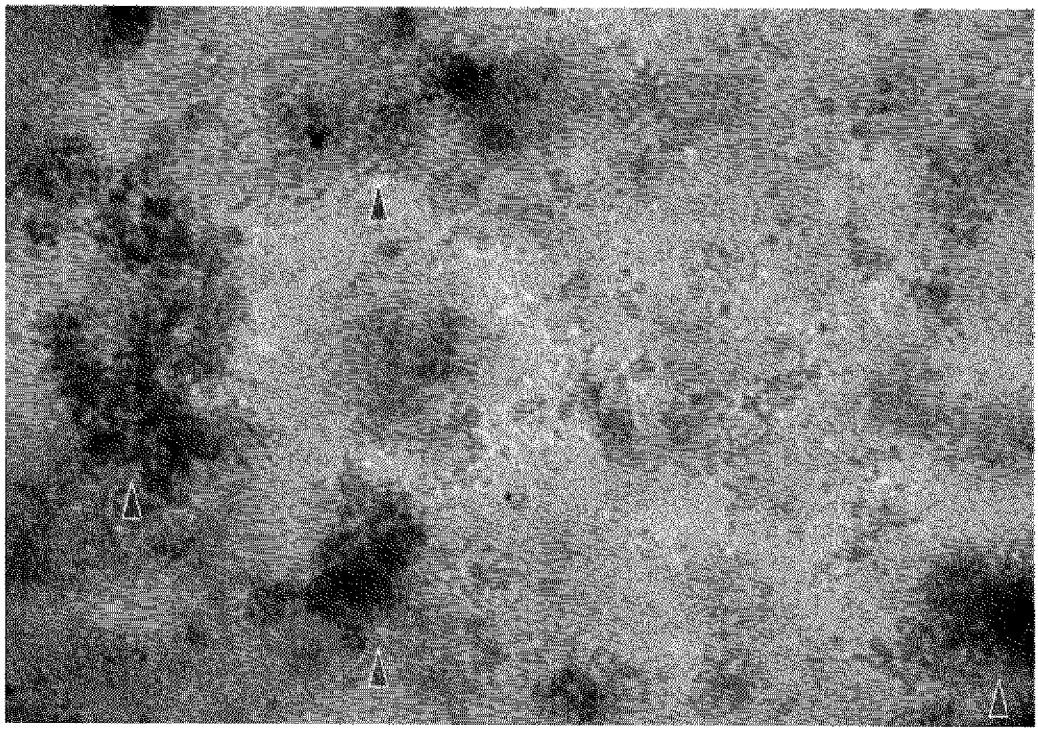
[図1]



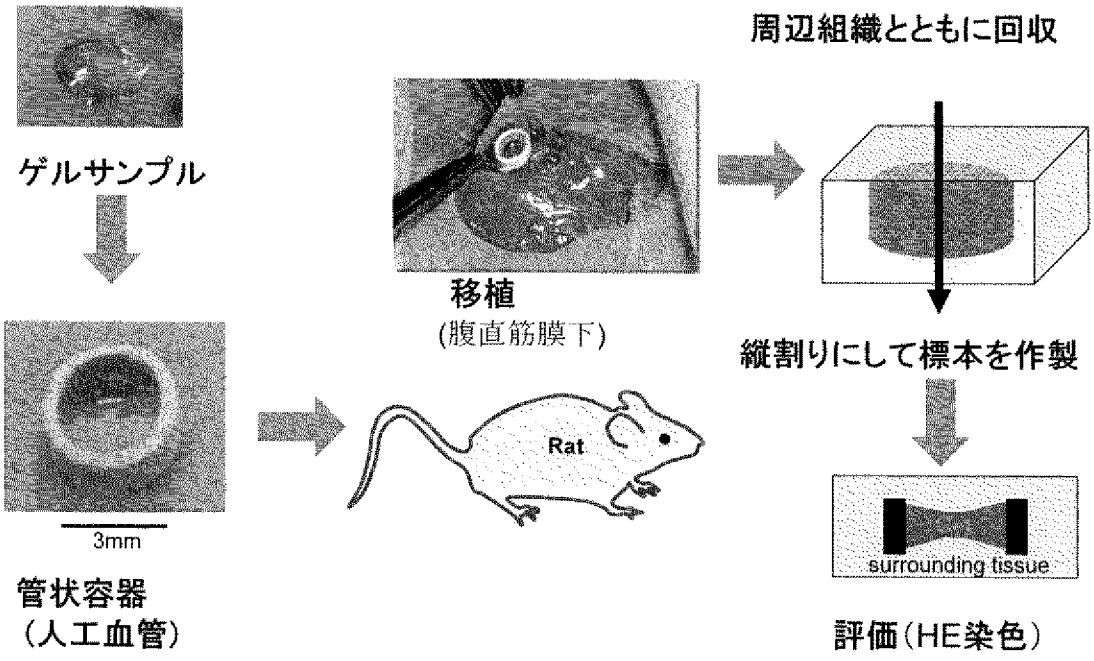
[図2]



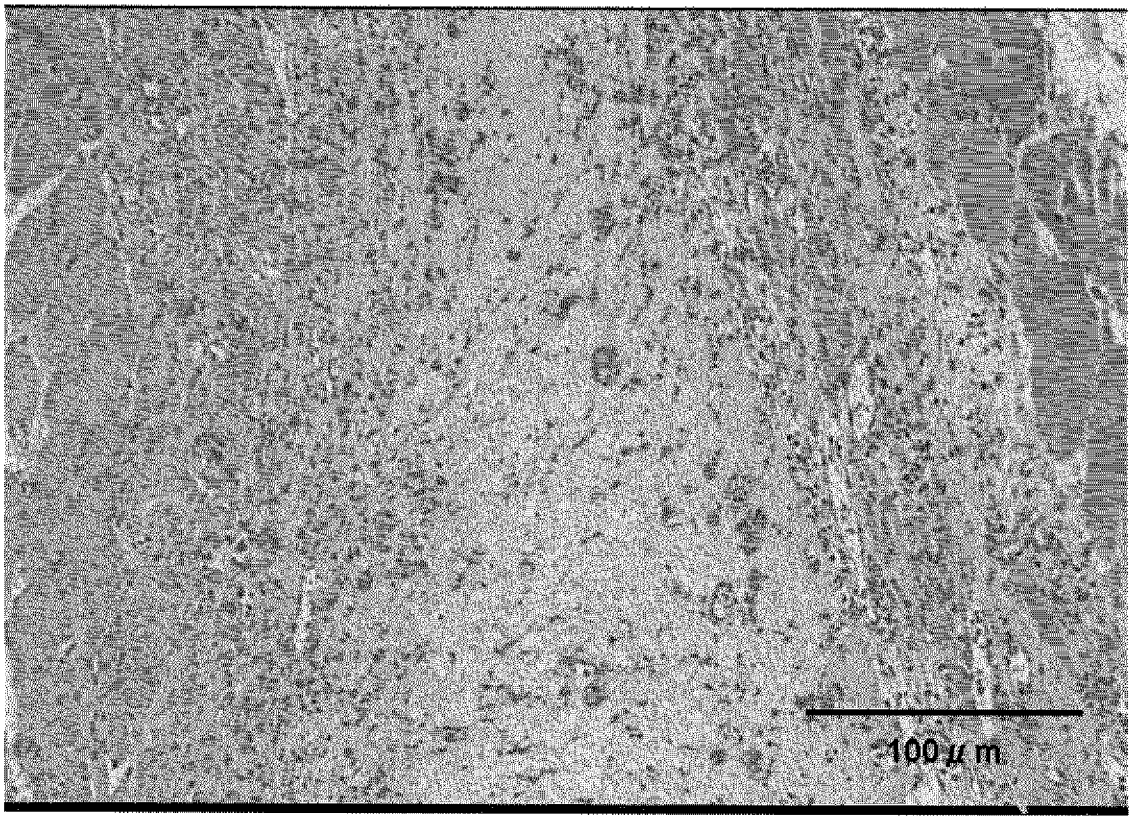
[図3]



[図4]


ゲルサンプル
3mm
管状容器
（人工血管）
移植
(腹直筋膜下)
Rat
周辺組織とともに回収
縦割りにして標本を作製
surrounding tissue
評価（HE染色）

[図5]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/JP2013/064433

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
C08L89/00(2006.01)i, *A61L27/00*(2006.01)i, *C08K5/1545*(2006.01)i, *C08L5/00*(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)
C08L89/00-89/06, A61L27/00, C08K5/00-5/59, C08L5/00-5/16

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/REGISTRY(STN), JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamIII)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	JP 2011-160817 A (The University of Tokyo), 25 August 2011 (25.08.2011), entire text (Family: none)	1-25
A	WO 2009/057802 A1 (Osaka City University, Daiso Co., Ltd.), 07 May 2009 (07.05.2009), entire text & US 2010/0316719 A1 & EP 2210917 A1	1-25
A	WO 2010/075010 A1 (Genzyme Corp.), 01 July 2010 (01.07.2010), entire text & JP 2012-512313 A & US 2011/0300120 A1 & EP 2465542 A1 & CA 2747230 A & MX 2011006347 A & CN 102369023 A	1-25

☒ 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	Date of mailing of the international search report
27 June, 2013 (27.06.13)	09 July, 2013 (09.07.13)
Name and mailing address of the ISA/ Japanese Patent Office Facsimile No.	Authorized officer Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/JP2013/064433

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
P,A	Wataru KAMIMURA, Hiroyuki KOYAMA, Tetsuro MIYATA, Tsuyoshi TAKATO, "Ishoku-yo Sanjigen Saibo Baiyo System: Oligo-To Sankabutsu Kakyo Collagen Gel no Kaihatsu", Regenerative Medicine, 01 June 2012 (01.06.2012), vol.11, special extra issue, 203	1-25

国際調査報告

国際出願番号　ＰＣＴ／ＪＰ２０１３／０６４４３３

Ａ．　発明の属する分野の分類（国際特許分類（ＩＰＣ））

Int.Cl.　C08L89/00(2006.01)i, A61L27/00(2006.01)i, C08K5/1545(2006.01)i, C08L5/00(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（ＩＰＣ））

Int.Cl.　C08L89/00-89/06, A61L27/00, C08K5/00-5/59, C08L5/00-5/16

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　　１９７１－２０１３年
日本国実用新案登録公報　　１９９６－２０１３年
日本国登録実用新案公報　　１９９４－２０１３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/REGISTRY(STN), JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamIII)

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
A	JP 2011-160817 A (国立大学法人東京大学) 2011.08.25, 文献全体 (ファミリーなし)	1-25
A	WO 2009/057802 A1 (公立大学法人大阪市立大学、ダイソー株式会社) 2009.05.07, 文献全体 & US 2010/0316719 A1 & EP 2210917 A1	1-25
A	WO 2010/075010 A1 (ジェンザイム・コーポレーション) 2010.07.01, 文献全体 & JP 2012-512313 A & US 2011/0300120 A1 & EP 2465542 A1 & CA 2747230 A & MX 2011006347 A & CN 102369023 A	1-25

☑　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	国際調査報告の発送日
２７．０６．２０１３	０９．０７．２０１３

国際調査機関の名称及びあて先
日本国特許庁（ＩＳＡ／ＪＰ）
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）　４Ｊ　４５１５
岡▲崎▼　忠
電話番号　０３－３５８１－１１０１　内線　３４５７

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
ＰＡ	上村渉、小山博之、宮田哲郎、高戸毅，移植用三次元細胞培養システム：オリゴ糖酸化物架橋コラーゲンゲルの開発，再生医療，2012.06.01，Vol.11、増刊号，203	1-25