



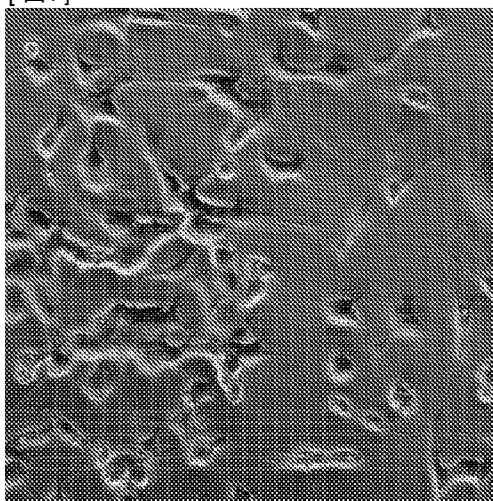
- (51) 国際特許分類 : A61L 27/00 (2006.01)
- (21) 国際出願番号 : PCT/JP20 14/062 149
- (22) 国際出願日 : 2014年5月2日 (02.05.2014)
- (25) 国際出願の言語 : 日本語
- (26) 国際公開の言語 : 日本語
- (30) 優先権データ : 特願 2013-097402 2013年5月7日 (07.05.2013) JP
- (71) 出願人 : 国立大学法人 東京医科歯科大学 (TOKYO MEDICAL AND DENTAL UNIVERSITY) [JP/JP]; 〒1138510 東京都文京区湯島1-5-4 5 Tokyo (JP). 株式会社 A D E K A (ADEKA CORPORATION) [JP/JP]; 〒1168554 東京都荒川区東尾久7丁目2番35号 Tokyo (JP).
- (72) 発明者 : 岸田 晶夫 (KISHIDA, Akio) ; 〒11385 10 東京都文京区湯島1-5-4 5 国立大学法人 東京医科歯科大学内 Tokyo (JP). 木村 剛 (KIMURA, Tsuyoshi); 〒11385 10 東京都文京区湯島1-5-4 5 国立大学法人 東京医科歯科大
- 学内 Tokyo (JP). 根岸 淳 (NEGISHI, Jun); 〒11385 10 東京都文京区湯島1-5-4 5 国立大学法人 東京医科歯科大学内 Tokyo (JP). 日渡 謙一郎 (HIWATARI, Ken-ichiro); 〒1168554 東京都荒川区東尾久7丁目2番35号 株式会社 A D E K A 内 Tokyo (JP). 田崎 晃子 (TASAKI, Akiko); 〒1168554 東京都荒川区東尾久7丁目2番35号 株式会社 A D E K A 内 Tokyo (JP).
- (74) 代理人 : 較島 睦, 外 (SAME JIMA, Mutsumi et al); 〒5300017 大阪府大阪市北区角田町8番1号 梅田阪急ビルオフィスタワー青山特許事務所 Osaka (JP).
- (81) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の国内保護が可能): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JP, KE, KG, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, ML, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK,

[続葉有]

(54) Title: METHOD FOR PRODUCING PARTICULATE DECELLULARIZED TISSUE

(54) 発明の名称 : 粒子状脱細胞化組織の製造方法

[図1]



(57) Abstract: Provided is a particulate decellularized tissue that has a sufficient tissue regeneration effect and shows no cytotoxicity when used as a cell culture material. The particulate decellularized tissue, which shows no cytotoxicity, has a cell induction effect and a differentiation induction effect and also has a high tissue regeneration effect, is obtained by a method for producing a particulate decellularized tissue, said method being characterized by comprising a step for applying a high hydrostatic pressure in a medium to a tissue derived from an animal.

(57) 要約 : 組織の十分な再生効果を有し、細胞培養用材料として使用した場合に細胞毒性を示さない粒子状脱細胞化組織を提供する。動物由来組織に、媒体中で高静水圧を印加する工程を有することを特徴とする粒子状脱細胞化組織の製造方法により、細胞毒性がなく、細胞の誘引効果や分化誘導効果を有し、組織の再生効果が高い粒子状脱細胞化組織が得られる。

WO 2014/181767 A1



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

添付公開書類 :

- 国際調査報告 (条約第 21 条(3))

明 細 書

発明の名称 : 粒子状脱細胞化組織の製造方法

技術分野

[0001] 本発明は、再生医療や細胞培養等に好適に使用できる脱細胞化組織の製造方法に関する。

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。生体組織からの脱細胞方法としては、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）、超高静水圧処理による方法（例えば、特許文献 5 ～ 7 を参照）等が知られている。

[0003] また、このような脱細胞化生体組織を粒状化または粉体化したもの（粒子状脱細胞化組織）も知られており、粒子状脱細胞化組織は、疾患部位に注入して疾患部位の再生・治癒を促したり、成形して移植片として使用されている（例えば、特許文献 8 ～ 10 を参照）。従来知られた粒子状脱細胞化組織は、界面活性剤を使用する方法で製造されているが、超高静水圧処理による方法により製造された粒子状脱細胞化組織は、知られていなかった。

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 2 0 0 2 — 5 0 7 9 0 7 号公報

特許文献4 :特表 2 0 0 3 - 5 2 5 0 6 2 号公報

特許文献5 :特開 2 0 0 4 — 0 9 4 5 5 2 号公報

特許文献6 : 国際公開第 2 0 0 8 / 1 1 1 5 3 0 号パンフレット

特許文献7 :特表 2 0 1 3 - 5 0 2 2 7 5 号公報

特許文献8 :特表平 0 7 — 5 0 9 6 3 8 号公報

特許文献9 :特表 2 0 0 2 - 5 1 8 3 1 9 号公報

特許文献10 :特表 2 0 1 2 - 5 0 5 0 1 3 号公報

発明の概要

発明が解決しようとする課題

[0005] 従来知られた、粒子状脱細胞化組織は、移植片の拒絶反応もなく、疾患部位の再生・治癒に有用であるが、組織の再生効果が十分ではなく、細胞培養用材料として使用した場合には細胞毒性を示す場合があるという問題があった。

課題を解決するための手段

[0006] 本発明者らは、上記課題を解決すべく鋭意検討した結果、媒体中で高静水圧を印加することにより脱細胞化した粒子状の動物組織が、細胞の誘引や分化誘導と言った効果を有しており、細胞培養時の細胞毒性もないということを見出し、本発明を完成させた。すなわち、本発明は、動物由来組織に、媒体中で高静水圧を印加する工程を有することを特徴とする粒子状脱細胞化組織の製造方法である。

[0007] 具体的には、本発明は以下を含む。

[1] 動物由来組織に、媒体中で高静水圧を印加する工程を有することを特徴とする粒子状脱細胞化組織の製造方法。

[2] 高静水圧が 2 ~ 1, 5 0 0 M P a であることを特徴とする [1] 記載の粒子状脱細胞化組織の製造方法。

[3] 動物由来組織を粉碎した後に、媒体中で高静水圧を印加することを特徴とする [1] 又は [2] 記載の粒子状脱細胞化組織の製造方法。

[4] 媒体中で高静水圧を印加した動物由来脱細胞化組織を粉砕することを特徴とする [1] 又は [2] 記載の粒子状脱細胞化組織の製造方法。

[5] 媒体中で高静水圧を印加した動物由来脱細胞化組織を、アニオン性界面活性剤及び/又はノニオン性界面活性剤を含有しない洗浄液で洗浄することを特徴とする [1] ~ [4] の何れか 1 項に記載の粒子状脱細胞化組織の製造方法。

[6] [1] ~ [5] の何れか 1 項に記載の粒子状脱細胞化組織の製造方法より製造された粒子状脱細胞化組織。

[7] [6] に記載の粒子状脱細胞化組織を使用した移植用又は治療用の材料。

[8] [6] に記載の粒子状脱細胞化組織を使用した細胞培養用材料。

発明の効果

[0008] 本発明の製造方法により、細胞毒性がなく、細胞の誘引効果や分化誘導効果を有し、細胞毒性がなく、組織の再生効果が高い粒子状脱細胞化組織が得られる。本発明の製造方法により得られた粒子状脱細胞化組織は、粒子状であることから、適用対象となる部位が限定されず、種々の部位に使用可能である。

図面の簡単な説明

[0009] [図1] 神経突起伸長試験の実施例 2 の NGF 未添加の結果を示す。
[図2] 神経突起伸長試験の実施例 3 の NGF 未添加の結果を示す。
[図3] 神経突起伸長試験のブランクの NGF 未添加の結果を示す。
[図4] 神経突起伸長試験のブランクの NGF 添加の結果を示す。
[図5] 皮下埋植試験の実施例 1 の 28 日後の皮下ポケット部 (左図) 及び染色したラットの組織の断面 (右図) を示す。
[図6] 凍傷モデル試験の実施例 1 の、試験前の外観 (左上図)、試験後の外観 (右上図) 及び染色したラット組織の断面 (下図) を示す。
[図7] 凍傷モデル試験のブランクの、試験前の外観 (左上図)、試験後の外観 (右上図) 及び染色したラット組織の断面 (下図) を示す。

発明を実施するための形態

[001 0] 以下、本発明について詳細に説明する。

（生体組織）

本発明の粒子状脱細胞化組織の製造方法に使用する生体組織は、脊椎動物由来の細胞を有する生体組織であれば、特に限定されないが、拒絶反応が少ないことから、哺乳類又は鳥類由来の生体組織が好ましく、入手が容易であることから、哺乳類の家畜、鳥類の家畜またはヒト由来の生体組織が更に好ましい。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、プタ、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、マウス、リス、アライダマ等が挙げられる。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、ウズラ等が挙げられる。これらの中でも、入手の安定性から、プタ、ウサギ、ヒトの生体組織が好ましい。

[001 1] 生体組織の部位としては、細胞外にマトリックス構造を持った部位が使用でき、このような部位としては、例えば、肝臓、腎臓、尿管、膀胱、尿道、舌、扁桃、食道、胃、小腸、大腸、肛門、膵臓、心臓、血管、脾臓、肺、脳、骨、脊髄、軟骨、精巣、子宮、卵管、卵巣、胎盤、角膜、骨格筋、腱、神経、皮膚等が挙げられる。生体組織の部位として、組織再生の効果が高いことから軟骨、骨、肝臓、腎臓、心臓、肺、脳、及び脊髄が好ましい。生体組織は採取後、腐敗や機能の低下を防ぐための処理を行うことが好ましい。このような処理としては、薬剤による殺菌処理、冷凍による凍結処理等が挙げられ、組織へダメージが少ないことから凍結処理が好ましい。

[001 2] 粉砕工程）

本発明の粒子状脱細胞化組織の製造方法では、生体組織を採取し、生体組織に高静水圧を印加し、破壊された細胞を洗浄除去し、粒子状の脱細胞化組織を得るまでの間の、どの段階で生体組織（または脱細胞化組織）を粉砕して粒子状にしてもよいが、破壊された細胞を洗浄除去する場合に、生体組織

の形状が保たれた状態よりは粒子状である方が、破壊された細胞の洗浄除去が容易に行えることから、少なくとも細胞の洗浄除去の前に、粉碎することが好ましい。

[001 3] 組織を粉碎する方法としては、生体組織をそのまま常温で粉碎する方法、生体組織を冷凍し凍結状態で粉碎する方法等が挙げられ、特に限定されないが、常温では粉碎が困難な生体組織、例えば、腎臓等の軟組織の場合には、凍結状態で粉碎することが好ましい。凍結状態で粉碎する場合、0℃付近の温度では氷の結晶の成長により組織にダメージが残る場合があることから、凍結状態で粉碎する場合の粉碎の温度は-80～-5℃が好ましく、-50～-10℃が更に好ましく、-40～-15℃が最も好ましい。生体組織は凍結して保存することが好ましいことから、保存している凍結状態の生体組織を粉碎すれば工程が簡略化でき、粒子状の生体組織に対して高静水圧処理することができる。

[0014] 生体組織は、粉碎後の分級が容易であることから、乾燥してから粉碎してもよい。生体組織の乾燥方法としては、加熱乾燥、減圧乾燥、凍結乾燥、有機溶媒による脱水等が挙げられ、細胞や核酸の洗浄が容易に行えることから、凍結乾燥、有機溶媒による脱水が好ましく、凍結乾燥が更に好ましい。有機溶媒を用いて脱水する場合の有機溶媒としては、エタノール、アセトン等が挙げられる。その他、生体組織を粉碎することなく脱細胞化し、脱細胞化した生体組織を乾燥して粉碎してもよい。

[001 5] 粉碎方法としては、ボールミル、ビーズミル、コロイドミル、コニカルミル、ディスクミル、エッジミル、製粉ミル、ハンマーミル、ペレットミル、カッティングミル、ローラーミル、ジェットミル等が挙げられ、生体組織へのダメージが少ないことから、カッティングミルが好ましい。

[001 6] 本発明の粒子状脱細胞化組織の大きさがあまりにも小さい場合には、組織再生の効果が低く、またあまりに大きい場合には、移植や治療の基材として使用しにくいことから、本発明の粒子状脱細胞化組織は粒径が0.1～1,000μmが好ましく、0.5～500μmが更に好ましく、1～100μmが

最も好ましい。

[001 7] 高静水圧処理工程)

本発明の製造方法では、生体細胞に媒体中で静水圧を印加ことにより生体組織が脱細胞化される。印加する静水圧が100MPaよりも低い場合には、生体組織からの脱細胞が不十分となる。一方、静水圧の印加には印加に耐えられる圧力容器が必要であり、多大なエネルギーを要する。このため、生体組織に印加する静水圧は、2～1,500MPaが好ましく、10～1,000MPaが更に好ましく、80～500MPaが最も好ましい。

[001 8] また、静水圧の印加に使用する媒体としては、水、生理食塩水、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、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、MES緩衝液等が挙げられる。糖類水溶液の糖類としては、エリトロース、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、ヒアルロン酸等が挙げられる。

[001 9] 高静水圧処理の温度は、氷が生成せず、熱による組織へのダメージがない温度であれば、特に限定されないが、脱細胞処理が円滑に行われ組織への影響も少ないことから5～45℃が好ましく、10～40℃が更に好ましく、15～35℃が最も好ましい。高静水圧処理の時間は、短すぎると細胞の破壊が十分行われず、長い場合にはエネルギーの浪費につながることから、5～60分が好ましく、7～30分が更に好ましい。

[0020] 洗浄工程)

高静水圧が印加された生体組織は、洗浄液により破壊された細胞を洗浄除去される。洗浄液は、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生体組織からの核酸成分、有機溶媒は脂質、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、本発明の粒子化脱細胞組織を疾患部に適用した場合の石灰化を防ぐことができる。

[0021] 有機溶剤としては、脂質の除去効果が高いことから、水溶性の有機溶剤が好ましく、エタノール、イソプロパノール、アセトン、ジメチルスルホキシドが好ましい。キレート剤としては、エチレンジアミン四酢酸 (EDTA)、ニトリロ三酢酸 (NTA)、ジエチレントリミン五酢酸 (DTPA)、ヒドロキシエチルエチレンジアミン三酢酸 (HEDTA)、トリエチレンテトラミン六酢酸 (TTHA)、1,3-プロパンジアミン四酢酸 (PDTA)、1,3-ジアミノ-2-ヒドロキシプロパン四酢酸 (DPTA-OH)、ヒドロキシエチルイミノ二酢酸 (HIDA)、ジヒドロキシエチルグリシン (DHEG)、グリコールエーテルジアミン四酢酸 (GEDTA)、ジカルボキシメチルグルタミン酸 (CMGA)、3-ヒドロキシ-2,2'-イミノジコハク酸 (HIDA)、ジカルボキシメチルアスパラギン酸 (ASDA) 等のイミノカルボン酸系キレート剤またはその塩；クエン酸、酒石酸、リンゴ酸、乳酸等のヒドロキシカルボン酸系キレート剤またはその塩が挙げられ、これらのキレート剤の塩としては、ナトリウム塩又はカリウム塩が挙げられる。

[0022] なお、洗浄液にアニオン性界面活性剤やノニオン性界面活性剤を含有させると、破壊された細胞組織や核酸、脂質等の除去効率上がるが、細胞毒性が出たり、脱細胞化組織の組織再生効果が下がる場合があることから、このような界面活性剤は使用しないことが好ましい。洗浄する場合には、高静水圧処理された粒子状組織を洗浄液に浸漬するが、必要に応じて、洗浄液を振盪または攪拌してもよい。

[0023] 本発明の粒子状脱細胞化組織が適用される疾患部位は、細胞組織を有する疾患部位であれば、特に限定されず使用できる。また、原料となった生体組

織と同様の疾患部位に適用してもよいし、異なる部位に適用してもよい。たとえば、本発明の粒子状脱細胞化組織が、肝臓由来の脱細胞化組織である場合には、肝臓に使用してもよいし、異なる部位、例えば、腎臓、心臓、肺、脳、脊髄等に適応してよい。

[0024] 本発明の粒子状脱細胞化組織は、疾患部位にそのまま適用してもよいし、生理食塩水、5%ブドウ糖液、リンゲル液等に分散して適用してもよいし、フィブリノゲン等によりゲル状にして適用してもよい。また、本発明の粒子状脱細胞化組織は、単独で適用してもよいし、疾患部位の再生・治療効果のある他の成分とともに適用してもよい。このような他の成分としては、成長因子、プロテオグリカン又はグリコサミノダリカン、細胞、 β -1,3-グルカン、メバロン酸等が挙げられる。

[0025] 成長因子としては、インシュリン類似成長因子 (IGF)、塩基性繊維芽細胞成長因子 (bFGF)、酸性繊維芽細胞成長因子 (aFGF)、形質転換成長因子- α (TGF- α)、形質転換成長因子- β (TGF- β)、骨形成タンパク質 (BMP)、血小板由来成長因子 (PDGF)、角質細胞成長因子 (KGF)、表皮細胞成長因子 (EGF)、血管内皮細胞成長因子 (VEGF)、造血促進因子 (EPO)、顆粒大食細胞成長因子 (GM-CSF)、顆粒大食細胞成長因子 (G-CSF)、神経細胞成長因子 (NGF)、ヘパリン結合因子 (EGF)等が挙げられる。プロテオグリカン又はグリコサミノダリカンとしては、コンドロイチン硫酸、ヘパラン硫酸、ケラタン硫酸、デルマタン硫酸、ヒアルロン酸、ヘパリン等が挙げられる。

[0026] 細胞は、再生医療に使用可能な細胞であれば、特に限定されない。このような細胞としては、たとえば、神経幹細胞、造血幹細胞、間葉系幹細胞、肝幹細胞、膵幹細胞、皮膚幹細胞、筋幹細胞、生殖幹細胞等の幹細胞；筋芽細胞、骨芽細胞、象牙芽細胞、神経芽細胞腫、線維芽細胞、軟骨芽細胞、網膜芽細胞腫、エナメル芽細胞、セメント芽細胞等の芽細胞等が挙げられる。細胞は自家細胞であることが好ましいが、疾患部位に適用した場合に拒絶反応が起こらなければ他家細胞でもよい。

[0027] 本発明の粒子状脱細胞化組織は、細胞の分化促進効果及び誘引効果を有しており、疾患部位の治療・再生効果が高いことから、皮膚の創傷や凍傷の治療等の皮膚科的な用途；手術や事故等により組織が除去された場合、事故や病気によりが損傷を受けた場合の、組織の再生又は置換等の外科的な用途；組織の再建、補正等の美容外科的な用途等に用いることができる。本発明の粒子状脱細胞化組織を疾患部位に適用する場合は、疾患部位に塗布、付着、噴霧、埋入又は注射器等を用いて注入すればよい。

[0028] 本発明の粒子状脱細胞化組織は、細胞毒性が少なく、細胞の分化促進効果及び誘引効果を有していることから、疾患の治療材、組織移植の補助剤、再生医療の足場材料、細胞培養の基材等として好ましく使用できる。本発明の粒子状脱細胞化組織を疾患の治療材、組織移植の補助剤、再生医療の足場材料として使用する場合には、そのまま患部に適用してもよいし、ゲル状物、シート状物、三次元構造物等に加工してから適用してもよい。また、本発明の粒子状脱細胞化組織を用いて細胞培養したものを、患部に適用してもよい。

[0029] 以下、実施例により本発明を更に説明するが、本発明はこれらの実施例によって限定されるものではない。尚、特に限定のない限り、実施例中の「部」や「%」は質量基準によるものである。

[0030] 実施例 1)

ブタの肝臓を冷凍し、 -20°C で、フードプロセッサーを用いて粉碎し、ふるいを用いて直径 $500\mu\text{m}$ 以上の粒子を除去して、ブタの肝臓の微細粒子（平均粒径 $50\mu\text{m}$ 、粒径 $1\mu\text{m}$ 未満の成分は 5% 以下）を得た。ポリエチレン製チャック付き袋に、この微細粒子 5g と、高静水圧処理の媒体として生理食塩水 15g とを入れ、研究開発用高圧処理装置（神戸製鋼製、商品名：Dr. CHEF）を用いて、 $1,000\text{MPa}$ の静水圧を 15 分間印加した。この後、高静水圧処理した粉末を滅菌カップに移し、洗浄液として生理食塩水 20g を入れて、 25°C で 5 時間振盪し、洗浄液を更新して更に 2 時間浸透して、実施例 1 の粒子状脱細胞化組織を得た。

[0031] 実施例 2)

プタの肝臓をプタの脳に変えた以外は、実施例 1 と同様の操作を行い実施例 2 の粒子状脱細胞化組織を得た。

[0032] 実施例 3)

プタの肝臓をプタの脊髄に変えた以外は、実施例 1 と同様の操作を行い実施例 3 の粒子状脱細胞化組織を得た。

[0033] 比較例 1)

滅菌カップに、実施例 1 と同様の方法で粉碎したプタの肝臓の微細粒子 5 g と、脱細胞溶液として 0.5 % のドデシル硫酸ナトリウムを含有するハンクスの平衡塩溶液 15 g を入れ、25℃で5時間保存した。この後、脱細胞溶液を除去し、洗浄液として界面活性剤を含有しないハンクスの平衡塩溶液 20 g を入れて、25℃で5時間振盪し、洗浄液を更新して更に2時間振盪することにより、比較例 1 の粒子状脱細胞化組織を得た。

[0034] 比較例 2)

プタの肝臓をプタの脳に変えた以外は、比較例 1 と同様の操作を行い比較例 2 の粒子状脱細胞化組織を得た。

[0035] 比較例 3)

プタの肝臓をプタの脊髄に変えた以外は、比較例 1 と同様の操作を行い比較例 3 の粒子状脱細胞化組織を得た。

[0036] 細胞遊走性試験)

L929細胞 (マウス繊維芽細胞) をMEM培地を用いて、37℃で24時間培養し、飢餓状態にした。24 well plate dishに5%の粉末化脱細胞化組織を含有するMEM培地 1 mL を添加し、セルカルチャーインサート (孔径 8 μm) を各wellにセットした。インサート内に、MEM培地で培養したL929細胞を播種し (1.0×10^5 細胞/well)、37℃で1~3時間培養し、インサート下のwell部に移動した細胞数を計測した。細胞数の計測は、DAPIで染色した後、蛍光顕微鏡を用いて行い、5のwell部の平均数を求めた。なお、粉末化脱細胞化組織を使用しないものを

プランクとした。結果を表 1 に示す。

[0037] [表 1]

	1時間後	2時間後	3時間後
実施例 1	688	1523	1520
比較例 1	642	612	628
プランク	782	516	505

[0038] 細胞遊走性試験では、本発明の粉末化脱細胞化組織で高い細胞遊走性が見られた。これは、本発明の粉末化脱細胞化組織が、細胞の誘引効果を有することを示すものである。なお、比較例 1 では一部の細胞に細胞死が見られた。

[0039] 神経突起伸長試験)

コラーゲンコート 24 well plate dish に、10% の Horse serum と 5% の ウシ胎児血清 (FBS) を含有する RPMI 培地を用いて、PC12 細胞 (ラットの副腎髄質由来の褐色細胞腫) を播種 (1.0×10^4 細胞/well) し、37℃ で 24 時間培養した。培地を 0.1% の Horse serum を含有する RPMI 培地に変更し、セルカルチャーインサート (孔径 $8 \mu\text{m}$) を各 well にセットした。インサート内に 5% の脱細胞化粉末を含有する生理食塩水を 200 μL 添加し、神経細胞成長因子 (NGF) を 50 ng 添加した場合と添加しない場合について 24 時間培養した。位相差顕微鏡で細胞を観察し、以下の基準で神経突起伸長効果を評価した。結果を表 2 に示す。

◎ : 明らかな神経突起伸長効果が見られる。

○ : 一部に神経突起伸長効果が見られる。

△ : 神経突起伸長効果が見られない。

X : 一部または全部の細胞に、細胞死が観察された。

[0040]

[表2]

	NGF添加	NGF未添加
実施例 2	◎	◎
実施例 3	◎	◎
比較例 2	○,×	△,×
比較例 3	○,×	△,×
プランク	◎	△

[0041] 神経突起伸長試験では、本発明の粉末化脱細胞化組織は、NGFを添加しない場合でも明らかな神経突起伸長効果が見られた。これは本発明の粉末化脱細胞化組織が、細胞の分化誘導効果を有することを示すものである。比較例では、細胞死が観察され、比較例の粉末化脱細胞化組織が細胞毒性を有することが示唆された。

[0042] 皮下埋植試験)

ラット (wi star rat、オス、8～12週齢) を麻酔処理し、背部を剃毛し、剃毛部をポビドンヨード溶液で消毒した。このラットの背部をハサミで約1.5cm切開して皮下ポケットを作成した。この皮下ポケットに脱細胞化粉末約20mgを埋入し、縫合糸を用いて切開部を縫合し、縫合部をポビドンヨード溶液で再度消毒した。28日後に、ラットの皮下ポケット部を回収し、ヘマトキシリン・エオシン染色により染色して組織学的評価を行った。なお、脱細胞化粉末を埋入せずに縫合したものをプランクとした。結果を表3に示す。

○ :炎症反応が見られず、細胞の誘引が確認できる。

△ :炎症反応は見られないが、細胞の誘引が明確でない。

× :炎症反応が見られ、細胞の誘引も確認できない。

[0043] 凍傷モデル試験)

ラット (wi star rat、オス、8～12週齢) を麻酔処理し、背部を剃毛し、剃毛部をポビドンヨード溶液で消毒した。このラットの背部に、真皮中層までの欠損 (直径15mm) を作成し、更に、液体窒素で冷却した金属体を60秒間押し付けて、凍傷した創傷を作成した。この創傷に、実施例1又は

比較例 2 の脱細胞化粉末を塗布し、創傷部を絆創膏で被覆し、さらにラットの胴体全周をガーゼを用いて被覆した。7 日後、創傷部を回収し、ヘマトキシリン・エオシン染色により染色して組織学的評価を行った。なお、脱細胞化粉末を塗布せずに絆創膏で被覆したものをプランクとした。結果を表 3 に示す。

- ◎ :組織の再生が認められ、拘縮は認められない。
- :組織の再生が認められるが、やや拘縮が認められる。
- △ :組織の再生が認められるが、明らかな拘縮が認められる。
- X :患部の悪化が認められる。

[0044] [表3]

	皮下埋植試験	凍傷モデル試験
実施例 1	○	◎
比較例 1	△	X
プランク	△	△

[0045] 皮下埋植試験及び凍傷モデル試験から本発明の粉末化脱細胞化組織に高い再生・治癒効果があることがわかる。

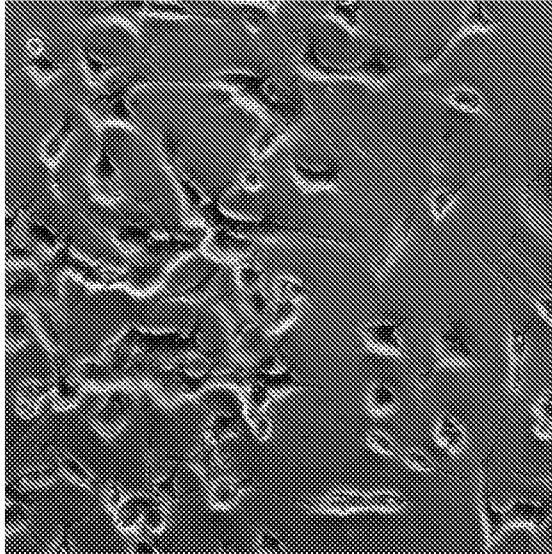
産業上の利用可能性

[0046] 本発明の粒子状脱細胞化組織は、細胞毒性が少なく、細胞の分化促進効果及び誘引効果を有していることから、疾患の治療材、組織移植の補助剤、再生医療の足場材料、細胞培養の基材等として好ましく使用できる。本発明の粒子状脱細胞化組織を疾患の治療材、組織移植の補助剤、再生医療の足場材料として使用する場合には、そのまま患部に適用してもよいし、ゲル状物、シート状物、三次元構造物等に加工してから適用してもよい。また、本発明の粒子状脱細胞化組織を用いて細胞培養したものを、患部に適用してもよい。

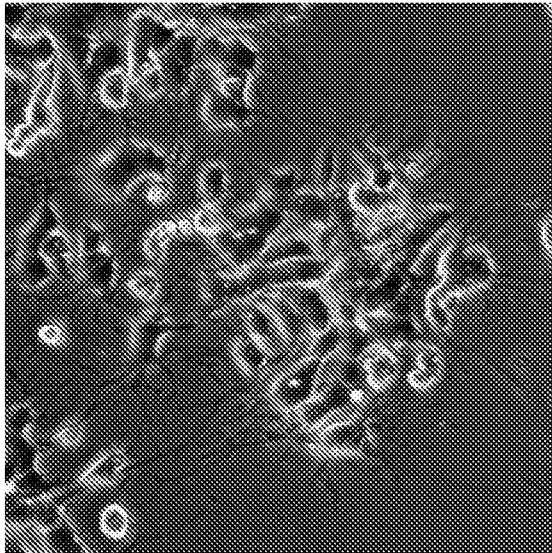
請求の範囲

- [請求項1] 動物由来組織に、媒体中で高静水圧を印加する工程を有することを特徴とする粒子状脱細胞化組織の製造方法。
- [請求項2] 高静水圧が2～1,500MPaであることを特徴とする請求項1記載の粒子状脱細胞化組織の製造方法。
- [請求項3] 動物由来組織を粉砕した後に、媒体中で高静水圧を印加することを特徴とする請求項1又は2記載の粒子状脱細胞化組織の製造方法。
- [請求項4] 媒体中で高静水圧を印加した動物由来脱細胞化組織を粉砕することを特徴とする請求項1又は2記載の粒子状脱細胞化組織の製造方法。
- [請求項5] 媒体中で高静水圧を印加した動物由来脱細胞化組織を、アニオン性界面活性剤及び/又はノニオン性界面活性剤を含有しない洗浄液で洗浄することを特徴とする請求項1～4の何れか1項に記載の粒子状脱細胞化組織の製造方法。
- [請求項6] 請求項1～5の何れか1項に記載の粒子状脱細胞化組織の製造方法より製造された粒子状脱細胞化組織。
- [請求項7] 請求項6に記載の粒子状脱細胞化組織を使用した移植用又は治療用の材料。
- [請求項8] 請求項6に記載の粒子状脱細胞化組織を使用した細胞培養用材料。

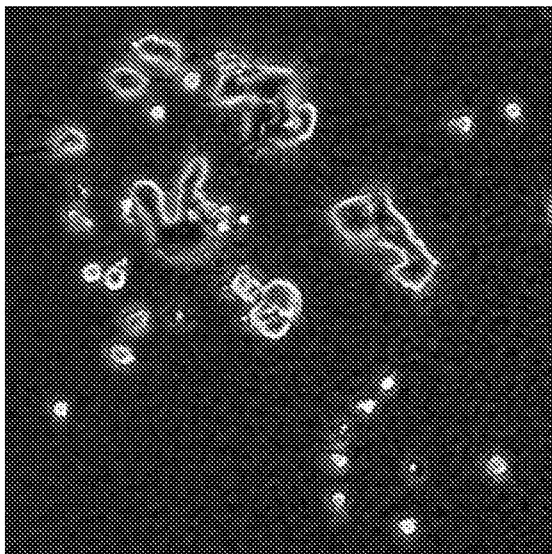
[図1]



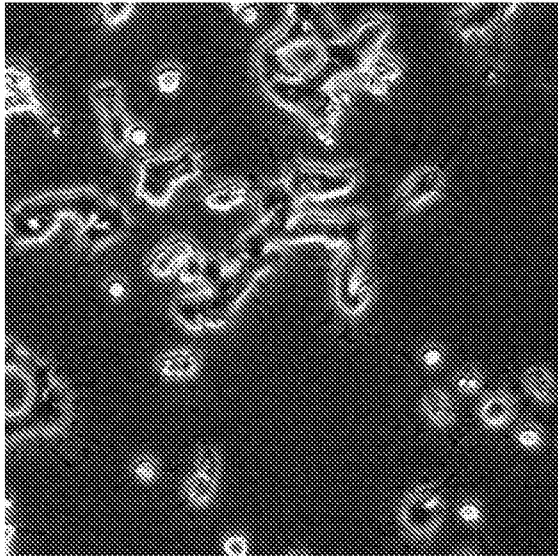
[図2]



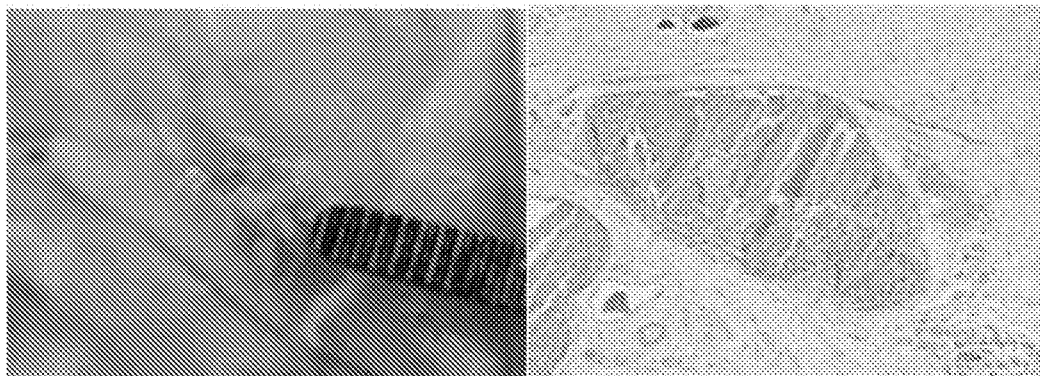
[図3]



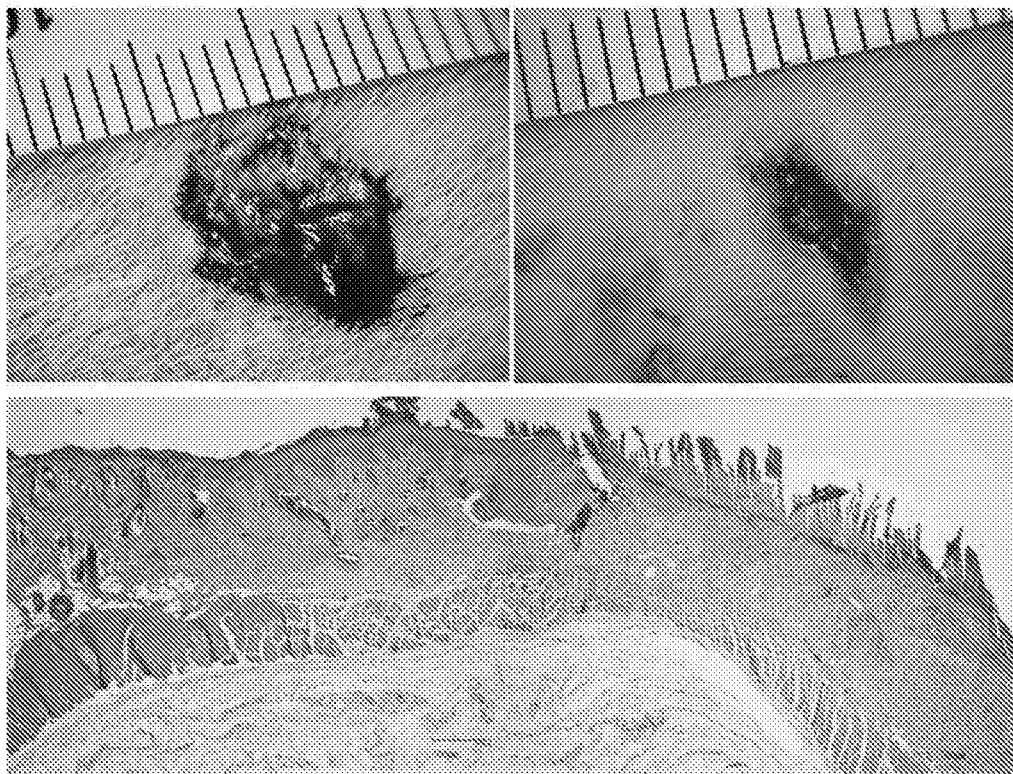
[図4]



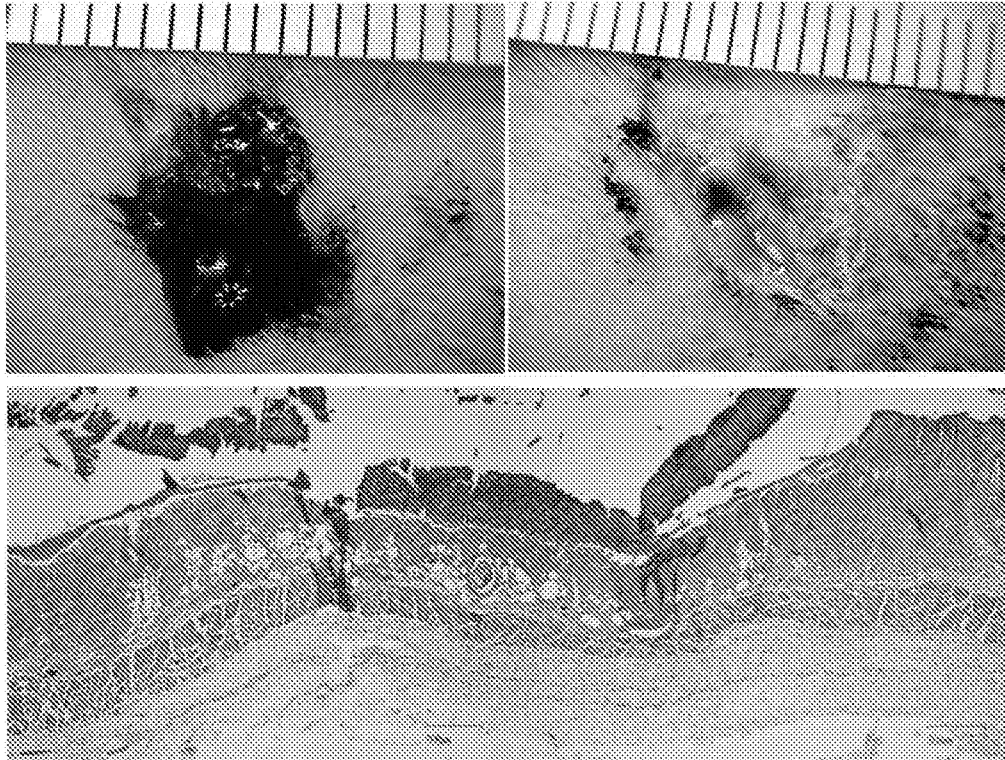
[図5]



[図6]



[図7]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2014/062149

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER A61 L 2 7/0 0 (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) A 6 1 L 1 5 / 0 0 - 3 3 / 1 8		
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 1996-2014 Kokai Jitsuyo Shinan Koho 1971-2014 Toroku Jitsuyo Shinan Koho 1994-2014		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and where practicable, search terms used) CAplus /MEDL INE /EMBASE / BIOS IS (STN) , JSTPlus / JMEDPlus / JST 7580 (JDreaml ⅠⅠ) , WPI		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	JP 2012-505013 A (Ajo University Industry-Academic Cooperation Foundation), 01 March 2012 (01.03.2012), claims ; paragraph [0038] & US 2011/0195107 A1 claims ; paragraph [0039] & EP 2345435 A2 & WO 2010/044577 A2	1 - 8
Y	JP 2010-227246 A (Tokyo Medical and Dental University), 14 October 2010 (14.10.2010), claims ; paragraphs [0029] to [0030] (Family: none)	1 - 8
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/> 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	"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
"E"	earlier application or patent but published on or after the international filing date	"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
"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)	"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
"O"	document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	"&" document member of the same patent family
"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 01 August , 2014 (01.08.14)	Date of mailing of the international search report 12 August , 2014 (12.08.14)	
Name and mailing address of the ISA/ Japanese Patent Office	Authorized officer	
Facsimile No.	Telephone No.	

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2014/062149

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	JP 2002-518319 A (Life cell Corp.), 25 June 2002 (25.06.2002), claims & US 2005/0159822 A1 & EP 1087756 A1 & WO 1999/065470 A1	1-8
A	JP 07-509638 A (Tissue Engineering, Inc.), 26 October 1995 (26.10.1995), claims & US 5800537 A & EP 656939 A1 & WO 1994/003584 A1	1-8
A	US 2013/0028981 A1 (DECELL TECHNOLOGIES INC.), 31 January 2013 (31.01.2013), claims & EP 2538988 A2 & WO 2011/132089 A2	1-8
A	JP 2013-042677 A (Tokyo Medical and Dental University), 04 March 2013 (04.03.2013), claims (Family : none)	1-8

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC)) IntCl. A61X27/00 (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)) IntCl. A61L15/00-33/18		
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- 日本国公開実用新案公報 1971-2 1 日本国実用新案登録公報 1996-2 1 日本国登録実用新案公報 1994-0 1		
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) CPlus/MEDLINE/EMBASE/ BiosIS(STN), JSTPlus/JIEDPlus/JST7580 (JDreamE), WPI		
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 2012- 505013 A (アジユウ ユニバーシティー インダストリー アカデミック コーアペレイション ファウンデーション) 2012. 03. 01, 特許請求の範囲、【0038】 & US 2011/0195107 AI, Claims, [0039] & EP 2345435 A2 & WO 2010/044577 A2	1-8
Y	JP 2010-227246 A (国立大学法人 東京医科歯科大学) 2010. 10. 14, 特許請求の範囲、[0029] ~ [0030] (ファミリーなし)	1-8
<input checked="" type="checkbox"/> C欄の続きにも文献が列挙されている。		
<input type="checkbox"/> 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日の後に公表された文献 F」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 01. 08. 2014	国際調査報告の発送日 12. 08. 2014	
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) 常見 優 電話番号 03-3581-1101 内線 3452	4C 3340

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
A	JP 2002-518319 A (ライフセル コーポレーション) 2002. 06. 25, 特許請求の範囲 & US 2005/0159822 AI & EP 1087756 AI & wo 1999/065470 AI	1-8
A	JP 07- 509638 A (ティシュー エンジニアリング, インコーポレイ テッド) 1995. 10. 26, 特許請求の範囲 & US 5800537 A & EP 656939 AI & wo 1994/003584 AI	1-8
A	US 2013/0028981 AI (DECELL TECHNOLOGIES INC.) 2013. 01. 31, Claims & EP 2538988 A2 & wo 2011/132089 A2	1-8
A	JP 2013-042677 A (国立大学法人 東京医科歯科大学) 2013. 03. 04, 特許請求の範囲 (ファミリーなし)	1-8