

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 公 開 特 許 公 報 (A)

(11) 特許出願公開番号
特開2020-6130
(P2020-6130A)

(43) 公開日 令和2年1月16日 (2020.1.16)

(51) Int.Cl.	F 1	テーマコード (参考)
A 6 1 L 27/36 (2006.01)	A 6 1 L 27/36 4 1 0	4 C 0 8 1
A 6 1 L 27/22 (2006.01)	A 6 1 L 27/22	
A 6 1 L 27/50 (2006.01)	A 6 1 L 27/50	

審査請求 未請求 請求項の数 7 O L (全 9 頁)

(21) 出願番号 特願2018-165409 (P2018-165409)	(71) 出願人 000006747
(22) 出願日 平成30年9月4日 (2018.9.4)	株式会社リコー
(31) 優先権主張番号 特願2018-125169 (P2018-125169)	東京都大田区中馬込 1 丁目 3 番 6 号
(32) 優先日 平成30年6月29日 (2018.6.29)	(74) 代理人 100107766
(33) 優先権主張国・地域又は機関 日本国 (JP)	弁理士 伊東 忠重
	(74) 代理人 100070150
	弁理士 伊東 忠彦
	(72) 発明者 鈴木 章悟
	東京都大田区中馬込 1 丁目 3 番 6 号 株
	会社リコー内
	(72) 発明者 篠原 悟史
	東京都大田区中馬込 1 丁目 3 番 6 号 株
	会社リコー内
	F ターム (参考) 4C081 AB11 BA12 BA13 BA16 BC01
	BC02 CD34 CD35 CE11 DA13
	EA02 EA11 EA12 EA13

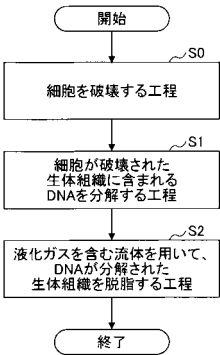
(54) 【発明の名称】 脱細胞化組織の製造方法

(57) 【要約】 (修正有)

【課題】脱細胞化組織の細胞接着性を向上させることが可能な脱細胞化組織の製造方法の提供。 本実施形態の脱細胞化組織の製造方法の一例を示すフローチャート

【解決手段】脱細胞化組織の製造方法は、液化ガスを含む流体を用いて、液化ガスが液体状態を維持する所定の環境下でDNAが分解されている生体組織を脱脂する工程 (S 2) を含むことを特徴とする脱細胞化組織の製造方法。

【選択図】 図 1



【特許請求の範囲】**【請求項 1】**

液化ガスを含む流体を用いて、DNA が分解されている生体組織を脱脂する工程を含むことを特徴とする脱細胞化組織の製造方法。

【請求項 2】

前記工程は、前記液化ガスが液体状態を維持する所定の環境下で実施されることを特徴とする請求項 1 に記載の脱細胞化組織の製造方法。

【請求項 3】

前記所定の環境は、 $1 \sim 40$ 、 $0.2 \sim 5 \text{ MPa}$ であることを特徴とする請求項 2 に記載の脱細胞化組織の製造方法。

【請求項 4】

前記液化ガスは、エーテル類であることを特徴とする請求項 1 乃至 3 のいずれか一項に記載の脱細胞化組織の製造方法。

【請求項 5】

前記エーテル類は、ジメチルエーテルであることを特徴とする請求項 4 に記載の脱細胞化組織の製造方法。

【請求項 6】

細胞が破壊されている生体組織に含まれる DNA を分解する工程を更に含むことを特徴とする請求項 1 乃至 5 のいずれか一項に記載の脱細胞化組織の製造方法。

【請求項 7】

前記脱脂された生体組織を洗浄する工程を更に含むことを特徴とする請求項 1 乃至 6 のいずれか一項に記載の脱細胞化組織の製造方法。

【発明の詳細な説明】**【技術分野】****【0001】**

本発明は、脱細胞化組織の製造方法に関する。

【背景技術】**【0002】**

再生医療において、患者の欠損した器官を再生するための支持組織として、ヒトまたは異種哺乳動物の生体組織から、細胞質成分、細胞質ゾル成分、細胞骨格、細胞膜成分等の細胞成分が除去されている脱細胞化組織が再移植されている。脱細胞化組織は、エラスチン、コラーゲン（I 型、IV 型等）、ラミニン等の細胞外マトリックス成分を主成分とする。

【0003】

特許文献 1 には、ポリエチレングリコール水溶液を用いて、生体組織の細胞を破壊する工程と、DNase を用いて、細胞が破壊された生体組織に含まれる DNA を分解させる工程と、PBS を用いて、DNA が分解した生体組織を洗浄する工程を含む脱細胞化組織の製造方法が開示されている（例えば、特許文献 1 参照）。

【発明の概要】**【発明が解決しようとする課題】****【0004】**

しかしながら、上述したような技術では、得られた脱細胞化組織（支持組織）には、脂溶性成分が残存しているため、脱細胞化組織（支持組織）に細胞を接着させようとしても、脱細胞化組織（支持組織）に細胞が接着しにくいという問題があった。

【0005】

本発明の一態様は、脱細胞化組織の細胞接着性を向上させることが可能な脱細胞化組織の製造方法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】**【0006】**

本発明の一態様は、脱細胞化組織の製造方法において、細胞が破壊されている生体組織

10

20

30

40

50

に含まれるDNAを分解させる工程と、液化ガスを含む流体を用いて、該DNAが分解した生体組織を脱脂する工程を含む。

【発明の効果】

【0007】

本発明の一態様によれば、脱細胞化組織の細胞接着性を向上させることが可能な脱細胞化組織の製造方法を提供することができる。

【図面の簡単な説明】

【0008】

【図1】本実施形態の脱細胞化組織の製造方法の一例を示すフローチャートである。

【図2】実施例の細胞破壊装置を示す概略図である。

10

【図3】実施例1及び比較例1の脱細胞化組織の細胞接着性の評価結果である。

【発明を実施するための形態】

【0009】

以下、本発明の実施形態を図面を参照して説明する。

【0010】

(脱細胞化組織の製造方法)

図1に、本実施形態の脱細胞化組織の製造方法の一例を示す。

【0011】

脱細胞化組織の製造方法は、生体組織の細胞を破壊する工程(S0)と、細胞が破壊された生体組織に含まれるDNAを分解する工程(S1)と、液化ガスを含む流体を用いて、DNAが分解された生体組織を脱脂する工程(S2)を含む。このため、DNAが分解した生体組織から脂溶性成分を十分に除去することができ、脱細胞化組織の細胞接着性を向上させることができる。

20

【0012】

本明細書及び特許請求の範囲において、脱脂とは、生体組織より脂溶性成分を除去することである。

【0013】

工程(S0)では、例えば、生体組織に細胞を破壊することが可能な液体を接触させる。

【0014】

細胞を破壊することが可能な液体としては、特に限定されないが、界面活性剤、高圧水、液化ジメチルエーテル又は超臨界二酸化炭素を含む液体が好ましい。

30

【0015】

工程(S1)では、例えば、細胞が破壊されている生体組織に、DNAを分解することが可能な液体を接触させる。

【0016】

DNAを分解することが可能な液体としては、特に限定されないが、酵素又は界面活性剤を含む液体が好ましい。

【0017】

酵素としては、特に限定されないが、DNase(例えば、DNase I)、トリプシン等が挙げられる。

40

【0018】

界面活性剤としては、特に限定されないが、イオン系界面活性剤(例えば、ドデシル硫酸ナトリウム(SDS))、非イオン系界面活性剤(例えば、Triton X-100)等が挙げられる。

【0019】

液体としては、生理的に適合すれば、特に限定されないが、生理食塩水、PBS(リン酸緩衝化生理食塩水)等が挙げられ、二種以上を併用してもよい。これらの中でも、生理食塩水が好ましい。

【0020】

50

細胞が破壊されている生体組織に、DNAを分解することが可能な液体を接触させる方法としては、特に限定されないが、細胞が破壊されている生体組織と、DNAを分解することが可能な液体を混合して攪拌する方法、細胞が破壊されている生体組織に、DNAを分解することが可能な液体を流通させる方法等が挙げられる。これらの中でも、DNAを分解することが可能な液体と細胞が破壊されている生体組織との接触の効率がよく、効率的にDNAを分解することが可能な点で、細胞が破壊されている生体組織に、DNAを分解することが可能な液体を流通させる方法が好ましい。

【0021】

なお、細胞が破壊されている生体組織と、DNAを分解することが可能な液体を混合して攪拌する場合、DNAを分解することが可能な液体を適宜交換してもよい。

10

【0022】

細胞が破壊されている生体組織に、DNAを分解することが可能な液体を接触させる環境の温度は、4～40であることが好ましい。細胞が破壊されている生体組織に、DNAを分解することが可能な液体を接触させる温度が4以上であると、生体組織に含まれる細胞外マトリックスの氷結晶による損傷を抑制することができ、40以下であると、生体組織に含まれるタンパク質の変性を抑制することができる。

【0023】

工程(S2)では、例えば、工程(S1)により、DNAが分解された生体組織に、液化ガスを含む流体を接触させる。

【0024】

本明細書及び特許請求の範囲において、液化ガスとは、常温常圧(0、1atm(0.101325MPa))で気体である物質の液化物である。

20

【0025】

液化ガスとしては、生体組織を脱脂することが可能であれば、特に限定されないが、ジメチルエーテル、エチルメチルエーテル、ホルムアルデヒド、ケテン、アセトアルデヒド、プロパン、ブタン、液化石油ガス等が挙げられ、二種以上を併用してもよい。これらの中でも、比較的低温低圧で液化する点で、エチルメチルエーテル、ジメチルエーテルが好ましく、ジメチルエーテルが特に好ましい。

【0026】

ジメチルエーテルは、1～40、0.2～5MPa程度で液化するため、装置のコストが安価となる。また、液化ジメチルエーテルは、常温常圧下で容易に気化することから、脱細胞化組織に残留しにくい。

30

【0027】

工程(S2)は、液化ガスの液体状態を維持するため、気密状態の抽出槽内等の飽和蒸気圧以上の環境下で実施される。

【0028】

DNAが分解された生体組織に、液化ガスを含む流体を接触させる方法としては、特に限定されないが、DNAが分解された生体組織を、液化ガスを含む流体に浸漬する方法等が挙げられる。

【0029】

液化ガスを含む流体は、液化ガスとは異なる液体をさらに含んでもよい。

40

【0030】

液化ガスとは異なる液体としては、生理的に適合すれば、特に限定されないが、生理食塩水、PBS(リン酸緩衝化生理食塩水)等が挙げられ、二種以上を併用してもよい。これらの中でも、生理食塩水が好ましい。

【0031】

液化ガスとは異なる液体の添加量は、液化ガス中の溶解度以下となるようにすることが好ましい。これにより、液化ガスを含む流体を均一にすることができる。

【0032】

DNAが分解された生体組織に、液化ガスを含む流体を接触させた後、常温常圧に戻す

50

と、液化ガスは、気化するため、DNAが分解された生体組織から液化ガスが除去される。

【0033】

脱細胞化組織の製造方法は、脱脂された生体組織を洗浄する工程（S3）をさらに含んでいてもよい。

【0034】

本明細書及び特許請求の範囲において、洗浄とは、生体組織から水溶性成分を除去することである。

【0035】

工程（S3）では、例えば、工程（S2）により、脱脂された生体組織に、生体組織を洗浄することが可能な液体を接触させる。

10

【0036】

生体組織を洗浄することが可能な液体としては、生理的に適合すれば、特に限定されないが、生理食塩水、PBS（リン酸緩衝化生理食塩水）等が挙げられ、二種以上を併用してもよい。これらの中でも、生理食塩水が好ましい。

【0037】

脱脂された生体組織に、生体組織を洗浄することが可能な液体を接触させる方法としては、特に限定されないが、脱脂された生体組織と、生体組織を洗浄することが可能な液体を混合して攪拌する方法、脱脂された生体組織に、生体組織を洗浄することが可能な液体を流通させる方法等が挙げられる。これらの中でも、効率的に洗浄することが可能な点で、脱脂された生体組織に、生体組織を洗浄することが可能な液体を流通させる方法が好ましい。

20

【0038】

なお、脱脂された生体組織と、生体組織を洗浄することが可能な液体を混合して攪拌する場合、生体組織を洗浄することが可能な液体を適宜交換してもよい。

【0039】

脱脂された生体組織に、生体組織を洗浄することが可能な液体を接触させる環境の温度は、4～40であることが好ましい。脱脂された生体組織に、生体組織を洗浄することが可能な液体を接触させる環境の温度が4以上であると、生体組織に含まれる細胞外マトリックスの氷結晶による損傷を抑制することができ、40以下であると、生体組織に含まれるタンパク質の変性を抑制することができる。

30

【0040】

（生体組織の細胞破壊方法）

生体組織の細胞を破壊する際には、例えば、生体組織に、細胞を破壊することが可能な液体を接触させる。

【0041】

細胞を破壊することが可能な液体としては、特に限定されないが、液化ガスを含む液体、界面活性剤を含む液体等が挙げられる。これらの中でも、脱細胞化組織に、実質的に損傷がなく、液化ガスが残留しにくくなる点で、液化ガスを含む液体が好ましい。

【0042】

ここで、液化ガスを含む液体は、細胞膜成分を溶解するため、生体組織の細胞を破壊することができる。

40

【0043】

液化ガスとしては、生体組織の細胞を破壊することが可能であれば、特に限定されないが、ジメチルエーテル、エチルメチルエーテル、ホルムアルデヒド、ケテン、アセトアルデヒド、プロパン、ブタン、液化石油ガス等が挙げられ、二種以上を併用してもよい。これらの中でも、比較的低温低圧で液化する点で、エチルメチルエーテル、ジメチルエーテルが好ましく、ジメチルエーテルが特に好ましい。

【0044】

ジメチルエーテルは、1～40、0.2～5 MPa程度で液化するため、装置のコス

50

トが安価となる。また、液化ジメチルエーテルは、常温常圧下で容易に気化することから、脱細胞化組織に残留しにくい。

【0045】

液化ガスを含む液体を生体組織に接触させる場合は、液化ガスの液体状態を維持するため、気密状態の抽出槽内等の飽和蒸気圧以上の環境下で実施される。

【0046】

細胞を破壊することが可能な液体を生体組織に接触させる方法としては、特に限定されないが、細胞を破壊することが可能な液体に生体組織を浸漬する方法等が挙げられる。

【0047】

液化ガスを含む液体は、液化ガスとは異なる液体をさらに含んでもよい。

10

【0048】

液化ガスとは異なる液体としては、特に限定されないが、エタノール、水、生理食塩水、PBS（リン酸緩衝化生理食塩水）等が挙げられ、二種以上を併用してもよい。

【0049】

液化ガスとは異なる液体の添加量は、液化ガス中の溶解度以下となるようにすることが好ましい。これにより、液化ガスを含む液体を均一にすることができる。

【0050】

液化ガスの温度は、1～40℃であることが好ましく、10～30℃であることがさらに好ましい。

【0051】

20

液化ガスの圧力は、0.2～5MPaであることが好ましく、0.3～0.7MPaの範囲内であることがさらに好ましい。

【0052】

液化ガスを含む液体を生体組織に接触させた後、常温常圧に戻すと、液化ガスは、気化するため、液化ガスを簡便に除去することができる。

【0053】

なお、液化ガスを含む液体を生体組織に接触させる工程を複数回繰り返してもよい。

【0054】

（生体組織）

生体組織としては、細胞壁を有する植物、菌類、古細菌、真正細菌、もしくは細胞壁を有しない動物のいずれかから得られる組織のことを意味する。特に限定されないが、葉、枝、樹木、花卉、茎、根、果肉、果皮及び種子や、ヒトまたは異種哺乳動物由来の皮膚、血管、心臓弁膜、角膜、羊膜、硬膜等を含む軟組織またはその一部、心臓、腎臓、肝臓、脾臓、脳等を含む臓器またはその一部等、骨、軟骨、腱またはその一部等が挙げられる。

30

【実施例】

【0055】

以下に、本発明の実施例を説明するが、本発明は、実施例に限定されない。

【0056】

〔実施例1〕

（細胞が破壊されたラットの由来の脳組織のDNA分解、脱脂及び洗浄）

40

細胞が破壊されたラット由来の脳組織を、DNase I（ロシュ・ダイアグノスティックス社製）、MgCl₂（和光純薬工業社製）を含む生理食塩水に入れた後、振とうさせ、細胞が破壊されたラット由来の脳組織に含まれるDNAを分解した。次に、DNAが分解されたラット由来の脳組織を、液化ジメチルエーテルに接触させ、脱脂した。次に、脱脂されたブタ由来の脳組織を、生理食塩水に入れた後、振とうさせ、洗浄した。その結果、ラット由来の脳組織の脱細胞化組織を得た。

【0057】

〔比較例1〕

DNAが分解されたラット由来の脳組織を脱脂する際に、液化ジメチルエーテルの代わりに、エタノールを用いた以外は、実施例1と同様にして、ラット由来の脳組織の脱細胞

50

化組織を得た。

【 0 0 5 8 】

次に、脱細胞化組織の細胞接着性を評価した。

【 0 0 5 9 】

[脱細胞化組織の細胞接着性]

実施例 1 及び比較例 1 のラット由来の脳組織の脱細胞化組織と、ラット由来の脳組織に、神経細胞を播種し、7 日経過した後、神経細胞の存在位置において蛍光を発する蛍光色素を導入したサンプルの断面を、光学顕微鏡を用いて観察した。

【 0 0 6 0 】

図 3 に、脱細胞化組織の細胞接着性の評価結果を示す。なお、図 3 の左側がラット由来の脳組織の脱細胞化組織であり、右側がラット由来の脳組織である。

10

【 0 0 6 1 】

図 3 から、実施例 1 のラット由来の脳組織の脱細胞化組織は、比較例 1 のラット由来の脳組織の脱細胞化組織に比べて、蛍光を発する領域（図中、点線部）が大きいことから、液化ジメチルエーテルを用いて、DNA が分解されたラット由来の脳組織を脱脂することで、脱細胞化組織の細胞接着性が向上していることがわかる。

【 0 0 6 2 】

[実施例 2]

（ブタ由来の大動脈組織の細胞破壊）

図 2 に示す細胞破壊装置を用いて、ブタ由来の大動脈組織 5 5 の細胞を破壊した。

20

【 0 0 6 3 】

具体的には、抽出槽 5 4 に、ブタ由来の大動脈組織 5 5 を仕込んだ。次に、分離槽 6 0 を予めジメチルエーテルで置換し、バルブ 5 2、5 3、5 6、5 8、5 9 を閉状態とした。次に、背圧弁 5 7 の設定圧力を 0 . 7 M P a とし、バルブ 5 2、5 3、5 6、5 8 を開状態とし、ポンプ 5 1 を用いて、液化ジメチルエーテルを流通させ、液化ジメチルエーテルで抽出槽 5 4 が満たされたところで、バルブ 5 3、5 6 を閉状態とし、ブタ由来の大動脈組織 5 5 を液化ジメチルエーテルに浸漬し、リン脂質等の細胞膜成分を抽出した。次に、バルブ 5 3、5 6 を開状態とし、液化ジメチルエーテルの流量を 1 m L / m i n に調整して、抽出液を分離槽 6 0 で回収した。次に、バルブ 5 8 を閉状態とし、分離槽 6 0 を装置から取り外し、ドラフト内で大気圧として、液化ジメチルエーテルを揮発させた。

30

【 0 0 6 4 】

上記の操作により、液化ジメチルエーテル 6 0 m L とブタ由来の大動脈組織 5 5 を接触させた後、バルブ 5 3 を閉状態とし、バルブ 5 6、5 8、5 9 を開状態とし、抽出槽 5 4 内の圧力を大気圧とし、抽出槽 5 4 内の液化ジメチルエーテルを揮発させて排気した。その結果、細胞が破壊されたブタ由来の大動脈組織を得た。

【 0 0 6 5 】

（細胞が破壊されたブタ由来の大動脈組織の DNA 分解、脱脂及び洗浄）

細胞が破壊されたブタ由来の大動脈組織を、0 . 2 m g / m L の D N a s e I（ロシュ・ダイアグノスティックス社製）、0 . 0 5 M の M g C l 2（和光純薬工業社製）を含む生理食塩水に入れた後、振とうさせ、細胞が破壊されたブタ由来の大動脈組織に含まれる DNA を分解させた。次に、DNA が分解したブタ由来の大動脈組織を、液化ジメチルエーテルに接触させ、脱脂した。次に、脱脂されたブタ由来の大動脈組織を、生理食塩水に入れた後、振とうさせ、洗浄した。その結果、ブタ由来の大動脈組織の脱細胞化組織を得た。

40

【 0 0 6 6 】

[比較例 2]

DNA が分解されたラット由来の脳組織を脱脂する際に、液化ジメチルエーテルの代わりに、エタノールを用いた以外は、実施例 2 と同様にして、ブタ由来の大動脈組織の脱細胞化組織を得た。

【 0 0 6 7 】

50

〔実施例 3 ～ 6〕

生体組織として、ブタ由来の大動脈組織の代わりに、ブタ由来の海綿骨組織、ブタ由来の皮膚組織、ブタ由来の骨組織、ブタ由来の軟骨組織を用いた点以外は、実施例 2 と同様にして、脱細胞化組織を得た。

【0068】

〔比較例 3 ～ 6〕

生体組織として、ブタ由来の大動脈組織の代わりに、ブタ由来の海綿骨組織、ブタ由来の皮膚組織、ブタ由来の骨組織、ブタ由来の軟骨組織を用いた点以外は、比較例 2 と同様にして、脱細胞化組織を得た。

【0069】

実施例 2 ～ 6 及び比較例 2 ～ 6 の脱細胞化組織の細胞接着性を評価したところ、いずれの組織においても、液化ジメチルエーテルを用いて、DNA が分解されたブタ由来の生体組織を脱脂することで、脱細胞化組織の細胞接着性が向上していることがわかった。

【先行技術文献】

【特許文献】

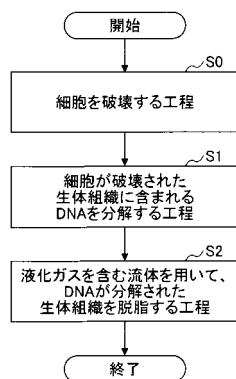
【0070】

【特許文献 1】特表 2005 - 531355 号公報

10

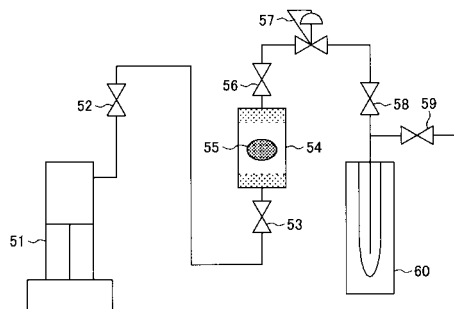
【図 1】

本実施形態の脱細胞化組織の製造方法の一例を示すフローチャート



【図 2】

実施例の細胞破壊装置を示す概略図



【 図 3 】

実施例1及び比較例1の脱細胞化組織の細胞接着性の評価結果

