

【公報種別】特許法第17条の2の規定による補正の掲載

【部門区分】第1部門第1区分

【発行日】平成17年6月23日(2005.6.23)

【公表番号】特表2001-524307(P2001-524307A)

【公表日】平成13年12月4日(2001.12.4)

【出願番号】特願2000-522219(P2000-522219)

【国際特許分類第7版】

C 1 2 N 5/06

A 6 1 K 35/32

A 6 1 P 19/00

A 6 1 P 43/00

【F I】

C 1 2 N 5/00 E

A 6 1 K 35/32

A 6 1 P 19/00

A 6 1 P 43/00 1 0 1

【手続補正書】

【提出日】平成15年9月10日(2003.9.10)

【手続補正1】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】特許請求の範囲

【補正方法】変更

【補正の内容】

【特許請求の範囲】

【請求項1】

ヒト椎間円板細胞をインビトロで増殖させる方法であって、

(a) ヒト椎間円板組織を提供するステップと、

(b) 該ヒト椎間円板組織を切り刻み、ヒト椎間円板細胞を含む切り刻まれた組織片を得るステップと、

(c) 増殖し、ヒト椎間円板細胞の単層を形成する条件下で該切り刻まれた組織片を培養するステップであって、該単層のヒト椎間円板細胞は単離することができ、継代でさらに増殖させることができる、培養するステップを含む方法。

【請求項2】

前記切り刻まれた組織片が、プラスチックメッシュにより固定されている請求項1に記載の方法。

【請求項3】

ヒト椎間円板細胞の単層と、ヒト椎間円板の切り刻まれた組織片とを含み、該ヒト椎間円板細胞の単層の少なくとも一部が、該ヒト椎間円板の切り刻まれた組織片に付着している請求項2に記載の方法により得られるヒト椎間円板細胞培養体。

【請求項4】

前記切り刻まれた組織片が、血清、増殖因子類またはサイトカイン類の存在下で培養される請求項1に記載の方法。

【請求項5】

前記切り刻まれた組織片が、ウシ胎児血清の存在下で培養される請求項4に記載の方法。

【請求項6】

前記切り刻まれた組織片が、トランスフォーミング増殖因子 (TGF-) の存在下で培

養される請求項 4 に記載の方法。

【請求項 7】

ヒト椎間円板細胞の単層と、ヒト椎間円板の切り刻まれた組織片とを含み、該ヒト椎間円板細胞の単層の少なくとも一部が、該ヒト椎間円板の切り刻まれた組織片に付着している請求項 1 に記載の方法により得られるヒト椎間円板細胞培養体。

【請求項 8】

ヒト椎間円板細胞をインビトロの立体構造体中で培養する方法であって、

(a) ヒト椎間円板組織を提供するステップと、

(b) 該ヒト椎間円板組織を切り刻み、ヒト椎間円板細胞を含む切り刻まれた組織片を得るステップと、

(c) 増殖し、ヒト椎間円板細胞の単層を形成する条件下で該切り刻まれた組織片を培養するステップであって、該単層のヒト椎間円板細胞は単離することができ、継代でさらに増殖させることができ、

(d) 該単層から該ヒト椎間円板細胞を分離するステップと、

(e) 該分離された細胞が、キャリア中で分散され、配置されて立体構造体を形成するように、該分離された細胞をキャリアに播種するステップと、

(f) 該分散され、配置された細胞を、立体構造体中で培養するステップとを含む方法。

【請求項 9】

前記立体構造体が、細胞ウェルインサート中で形成される請求項 8 に記載の方法。

【請求項 10】

前記キャリアがアルギナートである請求項 8 に記載の方法。

【請求項 11】

前記キャリアがアガロースである請求項 8 に記載の方法。

【手続補正 2】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0005

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0005】

立体細胞培養は、軟骨細胞や椎間円板細胞集団を構成する少なくともいくつかの細胞に類似している細胞タイプに関しては好適な一つの培養方法であり、アガロース培養体に置かれると、単層培養において脱分化し、特徴のあるタイプIIコラーゲン細胞外マトリックス産生を再発現させることが知られている。これについては、Benya, P.D., Shaffer, J. D.執筆の「アガロースゲルでの培養の場合、脱分化軟骨細胞が分化コラーゲン表現型を再発現させる("Dedifferentiated chondrocytes reexpress the differentiated collagen phenotype when cultures in agarose gels")」、Cell, 30, 215-224 (1982)を参照のこと。

細胞培養手順は、ヒト椎間円板の線維輪(annulus)細胞を培養するために使用しうることが提案されている。細胞は、単層移植片培養体中で確立され、アルギナート化されたアガロースの立体増殖環境に播種することができる。H. E. Gruber, C. Fisher, B. Desai, A. Stasky, G. Hoelscher and E. N. Hanley, Jr., "Human Intervertebral Disc Cells From The Annulus: Three-dimensional Culture In Agarose Or Alginate And Responsiveness To TGF- $\beta$ 1," Experimental Cell Research, 235, 13-21 (1997); and H. E. Gruber, B. Desai, T.A. Loeb, C. Fisher and E. N. Hanley, Jr., "Transforming Growth Factor- $\beta$ 1(TGF- $\beta$ 1) Regulates Proliferation And Proteoglycan Gene Expression In Diseased Human Intervertebral Disc Cells," Journal Of Bone And Mineral Research, Vol. 11, M473 (1996).