

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 特 許 公 報 (B2)

(11) 特許番号

特許第4452426号
(P4452426)

(45) 発行日 平成22年4月21日 (2010. 4. 21)

(24) 登録日 平成22年2月5日 (2010. 2. 5)

(51) Int. Cl.	F I
A 6 1 F 2/08 (2006. 01)	A 6 1 F 2/08
A 6 1 L 27/00 (2006. 01)	A 6 1 L 27/00 V

請求項の数 3 (全 9 頁)

(21) 出願番号	特願2001-570204 (P2001-570204)	(73) 特許権者	502347401
(86) (22) 出願日	平成13年3月22日 (2001. 3. 22)		ドレクセル ユニバーシティー
(65) 公表番号	特表2003-530912 (P2003-530912A)		アメリカ合衆国 ペンシルヴァニア州 1
(43) 公表日	平成15年10月21日 (2003. 10. 21)		9 1 0 4、フィラデルフィア、3 2 ンド
(86) 国際出願番号	PCT/US2001/009079		アンド チェストナット ストリーツ (番
(87) 国際公開番号	W02001/072241		地なし)
(87) 国際公開日	平成13年10月4日 (2001. 10. 4)	(74) 代理人	100102842
審査請求日	平成14年11月25日 (2002. 11. 25)		弁理士 葛和 清司
審判番号	不服2007-14494 (P2007-14494/J1)	(72) 発明者	ローレンチン、カト ティー、
審判請求日	平成19年5月21日 (2007. 5. 21)		アメリカ合衆国 ペンシルヴァニア州 1
(31) 優先権主張番号	60/191, 999		9 0 2 7-3 0 3 2、エルキンズ パーク
(32) 優先日	平成12年3月24日 (2000. 3. 24)		、バレー ロード 1 0 0 1
(33) 優先権主張国	米国 (US)		

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 靱帯置換構造物並びにその製造方法

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

三次元織物編組法を用いて形成される分解性で多孔性の L - ポリ - ラクチド繊維ベース三次元編組骨格から本質的になり、そして前十字宿主細胞が播種され、該細胞の増殖が前記骨格によって支持されている、靱帯のための置換構造物。

【請求項 2】

損傷領域への移植を含むヒトの損傷した靱帯の修復のために用いられることを特徴とする、請求項 1 に記載の置換構造物。

【請求項 3】

(a) 組織培養において、採取した前十字宿主細胞を増殖させることおよび継代すること、および

(b) 三次元織物編組法を用いて形成される分解性で多孔性の L - ポリ - ラクチド繊維ベース三次元編組骨格に、培養された前十字宿主細胞を播種することを含む、該細胞の増殖が前記骨格によって支持されている、靱帯のための置換構造物を製造する方法。

【発明の詳細な説明】

【 0 0 0 1 】

本発明は米国政府からの基金によって一部支援されており (NIH 助成金 No. 5 F31 GM1890 5-02 および AR46117 並びに NSF 大統領助成金 BES9553162/BES981782)、従って、米国政府は本発明のある種の権利を有し得る。

10

20

【 0 0 0 2 】

発明の分野

本発明は、組織工学 (tissue engineering) に有用なマトリックスを設計するための繊維技術の使用に関する。特に、ヒト前十字靭帯 (ACL) の生存可能な置換構造物を提供する。本置換構造物は、宿主ACL細胞を播種した、分解性である、ポリマー性繊維ベース三次元編組骨格 (three-dimensional braided scaffold) を含む。組織工学に基づく設計を伴った本置換構造物の生体適合性は、損傷したACLの治療および修復を促進することが期待できる。

【 0 0 0 3 】

発明の背景

整形外科的な復元において、執刀医は、しばしば、外傷 (trauma)、病理学的変性、または先天的奇形によってもたらされる損傷組織を自家移植で置き換える (Langer, R. and Vacanti, J.P. Science. 1993 260:920)。復元外科は、これらのタイプの障害のある組織を生存可能な機能性代替物と置換することに基づいている。骨格復元における骨の移植は、米国で毎年行なわれる863,200以上の移植例によって、整形外科の執刀医の通常業務になってきた。軟骨置換については、毎年行なわれる1,000,000以上の種々のタイプの例があり、靭帯修復については、毎年行なわれるおよそ90,000の例がある (Langer, R. and Vacanti, J.P. Science. 1993 260:920)。

【 0 0 0 4 】

現在、自家移植 (Friedman et al. Clin. Ortho. 1985 196:9; Jackson et al. Amer. J. Sports Med. 1990 18:1) (患者から採取した組織) および同種移植 (Gadzag et al. J. Amer. Acad Ortho. Surg. 1995 3:1; Shino et al. J. Bone and Joint Surg. 1988 70:11:556; Jackson et al. Arthroscopy 1994 10:442) (死亡者から採取した組織) が、筋骨格の問題点を処置するために、最も一般的な代替物の供給源である。前十字靭帯傷害の修復において、膝蓋腱の断片を頻繁に用いている (Jackson et al. Amer. J. Sports Med. 1990 18:1)。軟骨および骨の修復のために、自家移植の移植術が最適な最新の処置である。

【 0 0 0 5 】

しかしながら、これらの処置に関する種々の問題がある。例えば、自家組織のために、重大な制限は、採取部位の残余組織が移植片の除去により損傷を受け、採取に利用可能な組織の量が制限されているというドナー部位の病的状態 (donor site morbidity) である。同種移植の使用によって、これらの問題を緩和しようとしている。しかしながら、このタイプの移植は、しばしば、組織に対する免疫応答によって、宿主によって拒絶される。同種移植はまた、疾患を伝染し得る。徹底したスクリーニング手法によって、ほとんどの疾患保持組織が排除されるが、この方法は100%効果的なものではない。従来の復元移植材料による制限の結果、執刀医は合成代替物に注目してきた。

【 0 0 0 6 】

合成ACL移植片または移植片支持体は、カーボン繊維、Leeds-Keio靭帯 (ポリエチレンテフタレート)、Gore Texプロテーゼ (prosthesis) (ポリテトラフルオロエチレン)、DacronスリーブにDacronテープを巻きつけて作るStryker-Dacron靭帯プロテーゼおよびポリプロピレンから作るGore-Tex靭帯増強デバイス (LAD) を含む。これらの移植片は、良好な短期間の結果を示すが、長期間の研究では臨床の困難さに直面している。これらの合成ACL移植片の制限は、置換材料の伸長、オリジナルの構造に比べて弱まる機械的強度および摩耗による置換材料の断片化を含む。

【 0 0 0 7 】

理想的なACL置換体は、生分解性、多孔質、生体親和性であり、十分な機械強度を示し、そして靭帯組織の形成を促進する。

多くの研究者が、コラーゲン繊維、生分解性ポリマーおよびそれらの複合材料を含む潜在的なACL構造物を開示している。例えば、ACL由来のフィブロブラストを播種したACL復元のためのコラーゲン骨格および皮膚が記載されている (Dunn et al. The Tissue Engineering Approach to Ligament Reconstruction. Material Research Society Symposium Pr

10

20

30

40

50

ceedings 331, 13-18, 1994, Boston, Materials Research Society; Bellincampi et al. J. Orthop. Res. 1998 16:414-420)。WO 95/2550もまた、コラーゲン系の配置を含む靱帯修復のプロテーゼデバイスを開示している。

【0008】

生体工学の靱帯モデル、これはACLフィブробラストの構造物への添加、架橋剤の不存在、および生体工学組織を固定する骨プラグの使用において他の靱帯モデルとは異なるが、これもまた記載されている (Goulet et al. Tendons and Ligaments. In R.P. Lanza, R. Langer, and W.L. Chick (eds), Principles of Tissue Engineering, pp. 639-645, R. G. Landes Company and Academic Press, Inc. 1997)。

米国特許第4,792,336号明細書によって、グリコール酸エステル結合または乳酸エステル結合を含む吸収性成分を含むデバイスが開示されている。このデバイスは、靱帯または腱の修復において平編組 (flat braid) として用いることができる吸収性成分を含む複数の繊維を含む。

本発明は、宿主ACL細胞および分解性ポリマー性繊維ベース三次元編組骨格から構成される、靱帯修復および復元において用いるための移植材料に関する。

【0009】

発明の概要

本発明の目的は、分解性ポリマー性繊維ベース三次元編組骨格を含む置換構造物を提供することである。好ましい態様において、本置換構造物は、前十字宿主細胞 (anterior cruciate host cells) が播種されており、その増殖は骨格によって支持されている。

本発明の他の目的は、組織培養において前十字宿主細胞を採取すること、増殖すること、継代すること (passaging) および分解性ポリマー性繊維ベース三次元編組骨格に培養細胞を播種することを含む、靱帯修復および復元に用いるための、分解性マトリックス中の生存細胞から構成される移植材料を製造する方法を提供することである。

本発明の他の目的は、前十字宿主細胞を播種した分解性ポリマー性繊維ベース三次元編組骨格を損傷領域に移植することを含む、ヒトにおいて損傷した前十字靱帯を修復するための方法を提供することである。

【0010】

発明の詳細な説明

本発明は、組織再生のためのテンプレートとして役立つように生体溶解性 (bioresorbable) の骨格を用いるという原則に基づいた組織修復へのアプローチに関する。特に、本発明は、分解性骨格および、特に、ポリマー性繊維ベース三次元編組骨格に関する。本発明の繊維ベース編組骨格を組織置換の応用のための微繊維不織布マトリックスと比較した。

【0011】

電界紡糸 (electrospinning) 技術が、微繊維不織布マトリックスを加工するために用いられた。この技術の基礎は、反対に荷電したポリマー流体と収集スクリーンの間の電界の発生である。ポリマー液をキャピラリーチップとともにガラスシリンジに添加した。銅のスクリーンに合わせた他の接続とともに液体中に電極を置く。出力を増大すると、ポリマー液は荷電し、スクリーンに付着する。一度、電圧が臨界値に達すると、荷電は滴液の表面張力を乗り越え、微繊維の噴出が生産される。荷電繊維が射出されると、溶媒がすばやく減圧乾燥され、そして繊維は無作為に収集スクリーンの表面に累積する。この結果、ミクロンスケールの繊維の不織布メッシュが生じる。繊維の直径およびメッシュの厚さは、溶液濃度、電圧、スクリーンとチップの間の距離、および電界紡糸の所要時間を含む多数の種々のパラメータによって制御し得る。

【0012】

本発明の3-D編組骨格は、繊維マトリックスを創出するためのトラックアンドコラム法 (track and column method) を用いた4段階法 (4-step process) として知られる織物編組法から形成される。4段階編組装置は、糸巻きと糸送り (yarn carriers) を設置したスロット付トラックからなる。トラック内の糸巻きおよび送りの動きは、3-D構造の垂直コラム

10

20

30

40

50

を創出するために用いられる。編んだ格子における交互性の送りの口ウ (rows) とカラムは、3-D編組を創出するためにシフトされる。3-D編組の形状および繊維構造を決定する幾何学的なパラメータには、編組角配分 (braiding angle distribution)、糸体積分率、送り数および編組糸幅が含まれる。この高度に多目的なシステムによって、種々の構造および機械特性を伴った多様な3-D編組構造の形成を可能にする。

【 0 0 1 3 】

これら繊維技術に基づいて、微繊維不織布メッシュおよび2つの矩形の3-D編組を、細胞培養実験用に加工した。

これら実験において、2つの繊維に基づくマトリックスの階層的構造に対する細胞の応答を比較した。特に、これらマトリックスの細胞骨格を生かす能力をインビトロ環境の中で骨芽細胞およびフィibroプラストを用いて評価した。

10

【 0 0 1 4 】

3つのマトリックス構造の電子顕微鏡観察を最初に行なった。低倍率画像は、基礎的なマトリックス構造および組織を示した。微繊維マトリックスのSEM分析は、高い多孔性、繊維の無作為配置による繊維構造を示した。PLAGA [50:50]繊維は直径約2~7 μm の範囲であった。3-D編組マトリックスの画像は、3-D編組方法によって高度に組織化された繊維構造を示した。繊維/糸の数の相違は、これら2つの構造においてははっきりと明白であった。30繊維/糸を有する30糸から加工されたブレード#1は、60繊維/糸を伴う60糸から加工されたブレード#2よりも、構造全体を通してより多くの個別の編組を有していた。これらの構造は、繊維の充填密度によるものであるとすることができる。半分の糸あたり繊維数は、30糸のブレード#1は、60糸マトリックスよりもより小さい編組単位セルを、より詰まった構造に充填することができる。これらの構造のSEM評価は、全てのマトリックスが細胞の骨格としての機能に必要な構造的特徴を備えていることを示した。

20

【 0 0 1 5 】

しかしながら、インビトロでの研究の結果によって、細胞応答がマトリックス構造に依存することが明らかとなった。フィibroプラストと骨芽細胞の両方は、微繊維不織布マトリックス上で同じ形態を有していた。微繊維マトリックス上での培養1日後、細胞は紡錘体の形状になり、表面に広がりを見せた。わずかな細胞突起が、細胞本体からマトリックスの表面に伸びているのが見られた。しかしながら、SEMによっては、時点にかかわらず、いずれのサンプルにおいても微繊維構造を示さなかった。1 cm^2 マトリックスに、50,000細胞だけを播いたので、細胞は微繊維構造を覆い隠す表面に完全に広がったと思われる。1日目で観察される突起状の形態は、初期付着を示唆するものであり、細胞単層の形成ではない。

30

【 0 0 1 6 】

劣化研究もまた、組織培養培地の劣化によるマトリックス構造のあらゆる変化をも評価するために行なった。この研究によって、細胞培養培地中のマトリックスが急速に劣化することが明らかになった。DMEMへの暴露によって、微繊維の膨潤および凝集を引き起こすと考えられる。膨潤は、いくつかのサンプルにおいて、その気孔率のほとんど全てが失われるほどに有意であった。したがって、この劣化によって、細胞培養研究の経過の間、多孔性微繊維マトリックスを非孔性のポリマーの塊に変化した。

40

【 0 0 1 7 】

微繊維マトリックスと違って、3-D編組上での細胞形態は、骨芽細胞とフィibroプラストの間で異なった。2週間の実験の経過後は、両方の細胞型は、細胞付着、伸展および増殖で記載される事象の特徴的な並びに従う。しかしながら、これらの事象が起きる率が、骨芽細胞とフィibroプラストで異なった。さらに、細胞付着は、フィibroプラストより骨芽細胞の方がよりはっきりとあらわれた。例えば、3-Dブレード#1上での細胞培養1日目で、骨芽細胞は、表面上に有意な伸展および細胞層の形成を示した。これに対し、1日目のフィibroプラストはまだ初期付着の特徴的な突起状態を保持していた。加えて、フィibroプラストは繊維の長さに沿って組織化された。細胞は、2つの隣接した繊維によって

50

創出されたグローブ (grove) に沿ってともにグループ化した。わずかな細胞質の伸長が並んだ細胞間に見られた。

【 0 0 1 8 】

したがって、これらの実験で観察された細胞応答によって示されたように、階層構造が、細胞形態および組織化に重要な役割を担う。細胞は、不織布微繊維を含む急速に劣化するマトリックスの変化する構造に対し動的に応答した。細胞は、このような構造で組織化されず、特異的な細胞型の形態は類似した。これに対し、3-D編組のゆっくりと劣化する繊維構造において、フィブロブラストは繊維の長さに沿って組織化し、骨芽細胞はフィブロブラストよりもはっきりと異なった形態を示した。

【 0 0 1 9 】

したがって、繊維技術の組織工学での使用によって、多数の非繊維3-D構造に対し、いくつかの利点を有する。重要なことに、マトリックスに対する高いレベルの構造的組織化を伝える能力は、マトリックス構造の正確な制御を可能にする。3-Dに編まれたマトリックスおよび不織布マトリックスは、設計され、生産される3-D繊維構造の範囲の典型である。編まれたマトリックスは、3-D構造中に、高度に組織化されたPLAGA系織物からなる。不織布マトリックスは、無作為に方向付けられた微繊維の結果であるが、構造は高度に均一であった。したがって、4段3-D編組法および電界紡糸方法の両方が、種々の組織工学の応用に対する高いレベルの汎用性を示す有用な形成方法である。種々の異なるマトリックスを製造する能力およびマトリックス形成の正確な制御を維持することは、組織工学的な骨格の設計に極めて重要である。

【 0 0 2 0 】

例えば、ヒトの膝は、腿節と脛節をつなぎ、そして動作制御に関与し、関節運動の安定器として作用する前十字靭帯 (ACL) などの大きな靭帯を含む。ACLは、ACL傷害と診断される毎年250,000以上の患者で最も一般的に置換される膝の靭帯である。このタイプの傷害は、しばしばスポーツおよび体操の間に起こり、たびたび永続的および患者を無力にし得る障害をもたらす。

【 0 0 2 1 】

3-D編組骨格は、これら骨格が分解性、多孔性、生体親和性であり、十分な強度を示し、靭帯組織の形成を促進する場合、ヒトの膝におけるACL靭帯などの靭帯の置換構造物として特に有用であるだろうと考えられる。骨格の繊維ベースの設計は、自然の靭帯と張り合い、そして編組構造は、機械的強度をもたらすとともに、細胞の付着および内部伸長のための気孔率を必要とした。PLAGA繊維を本明細書に記載の実験において編組骨格に用いる一方で、限定されないが、ポリ乳酸、ポリグリコール酸およびそれらのコポリマーなどを含むポリ (ヒドロキシ) エステルをベースにした任意の分解性ポリマー繊維を用いることができる。

【 0 0 2 2 】

ACL置換のための3-D構造の編組に用いるためのポリマー繊維の選択を助けるため、3タイプのポリマー繊維の束の劣化の特徴およびこれらポリマーの長期の機械特性についての劣化の効果を試験した。試験した3つのポリマーは、10マルチ繊維の束に織りませたL-ポリ-ラクチド (PLA、70デニール)、ポリ-グリコリド (PGA、60デニール) およびこれらの82:18のコポリマー (PLAGA、70デニール) の多繊維であった。全てのポリマーの質量保持率 (mass retention) および機械特性は、リン酸緩衝液 (PBS) および細胞培養培地 (MEM) の両方での浸漬時間が増加するにしたがって低減した。しかしながら、PGAの束は、強度、質量および系の完全性の最も急速な損失を示し、そしてこのポリマーは、2週間後に大部分が分解し、小さな繊維に離散した。PLAの束およびPLAGAの束は、その機械強度、質量保持率および分子量の減少に反映したように、よりゆっくりと分解した。4週間後、PLAはPLAGAよりも高い最大引張荷重を維持した。ポリマー質量保持率が機械強度および分子量の変化に独立していることが見出された。

【 0 0 2 3 】

PLAGAの分子量は MEM中での2週間の浸漬後、その元の値の半分まで減少しており、これ

10

20

30

40

50

は靱帯の治癒が起こるには速すぎるかもしれない。ポリマーが分解した場合、PBSのpHは、酸性分解産物が放出されるにつれて低くなった。pHの初期低下が MEMで測定された一方で、溶液は後に管理値に戻った。これはおそらく、タンパク質吸着および MEMの高い緩衝能力によるもので、インビボでのポリマーの分解をモデル化するより現実的な溶液が提供されている。

【0024】

したがって、ポリマー分解時の分子量の変化、機械強度および質量保持率の実験に基づいて、PLA (PLAGA 82:18またはPGAに比較して) は、本発明の編まれた組織工学的3-D ACL置換構造物に使用するのに特別な利点を有する。その促進される分解および機械特性の損失によって、PGA単独は、ACL置換のためには適切ではないだろう。

10

【0025】

機械試験は、3-D繊維構造の応力 - ひずみ関係を特徴付けるために用いられ得る。ウサギACLに対する同様の応力 - ひずみ関係は繊維ベースの吸収性の骨格の3-D編組を用いた階層設計で設計することができると考えられる。したがって、ウサギ靱帯をモデル化する構造が創出され得る。この合成靱帯は、全ゲージ長1 cmを有すべきである。機械試験は、好ましくは、各特定の試験についてサンプル数6で行われる。

【0026】

引張試験は、好ましくは、ひずみ速度0.01%/s、2.2%/sおよび50%/sで行われ、これは材料がひずみ速度依存か否かを決定するのに役立つ。食品医薬品局の示唆するように18のサンプル規模で試験するのが好ましい(Guidance Document for the Preparation of Investigational Device Exemptions and Premarket Approval Applications for Intra-Articular Prosthetic Knee Ligament Devices, 1987)。

20

【0027】

本発明の好ましい態様において、編組構造は、腿節と脛節とに対する構造の付着のために指定された2つの端面および置換ACLとして利用される中間領域を備えた3つの領域から構成される。この態様において、中間領域は、サイズ、編組角、気孔率および機械強度において、2つの末端領域と異なる。置換構造物の長さおよび幅は、必要に応じてカスタマイズすることができる。

【0028】

ACL修復および復元のため、3-D編組骨格にACL宿主細胞を播種する。ACL宿主細胞は、最初に採取され、組織培養で増殖および継代される。次いで、生存細胞および分解性マトリックスから構成される移植材料を産生するため、培養細胞を3-D編組骨格に播種する。次いで、この移植材料は、損傷したACLの治癒および修復を促進するために靱帯損傷位置で患者に移植することができる。編組構造の付加的な利点は、従来の繊維の束から用意された構造物と比べて、移植の容易さが増したことを含む。

30

【0029】

ポリマーの組成および初代ACL細胞の3-D編組構造への応答などの設計パラメータを試験した。体内で見出される多くの豊富な細胞外接着タンパク質の1つであるフィブロネクチン(FN)は、靱帯形成の間、上方調節されと考えられている。その結果、これらの実験の間、初期細胞接着を増大するため構造物をFNで予め被覆した。種々の特性を備えた3つの型の分解性ポリマー上でのACL細胞の付着および増殖を試験した。

40

【0030】

骨格気孔率は、54%~63%の範囲であり、PLA構造物は気孔率53.5±6.9%を有し、PGAは気孔率63.3±7.3%を有し、そしてPLAGA構造物は気孔率62.9±3.6%を有する。平均的な孔の直径は、PLAGA構造物とPLA構造物の間では同じ(235~250 μm)であったが、PGAについては最も小さかった(177 μm)

【0031】

初期のACL靱帯様細胞は、半卵形のフィブロblast様形態を示し、コンフルエントのときに、特異的な増殖方向に多核の培養物を形成した。細胞の増殖および形態はポリマー組成と気孔率に依存した。細胞の広範囲のシートが、3つ全ての型のポリマー上で観察され

50

たが、形態および細胞の広がり、PLAGA骨格からPLA骨格まで異なっていた。細胞の広がり、PLAGAではより少ないことがわかり、一方で、PGAおよびPLAの両方の表面はより滑らかで、細胞の束がより少なかった。定量的な細胞増殖（ $n = 4$ ）はまた、PGAと比較して、PLAGAおよびPLAでより多くの細胞数が示された。構造物をフィブロネクチンで予め被覆することによって、増殖における増大をもたらした。これは、被覆しない構築物、および細胞またはフィブロネクチンのない対照と比較した場合に、溶液pHのより急速な低下を反映している。フィブロネクチンが、構築物へ付着する初期の細胞数を増大し、その結果、長期培養での細胞増殖および代謝を増大すると思われる。したがって、ACL細胞応答は、ポリマー組成および気孔率に依存した。さらに、構造物をフィブロネクチンで予め被覆することは、これら骨格への細胞付着および増殖を増大した。

10

以下、本発明をさらに示すために、これらに限定されない例を提供する。

【0032】

例

例1：微繊維マトリックス

およそ厚さ0.5 mmの生分解性の不織布繊維骨格を製造するために電界紡糸技術を用いた。この方法において、PLAGA(50:50)を、1:4（重量：容積）溶液を作るために、塩化メチレンに溶解した。電界紡糸方法において、20 kVの電位を、ポリマー溶液および電界を創出するための収集スクリーンに印加した。次いでポリマー溶液を収集スクリーンに30分間スプレーした。これによって均一な不織布微繊維マトリックスがスクリーンに付着した。マトリックスを除去し、1 cm²断片に切った。

20

【0033】

例2：三次元繊維編組

三次元繊維マトリックスは、Textile Structural Composites, eds. Chou, T.W. and Ko, F.K. (Elsevier, Amsterdam, 1989)においてKo, F.K.によって記載された3-D編組方法を用いて加工した。この方法において、PLAGA繊維（5:95 PLAGA）を糸あたり30および60繊維の繊維密度の糸を製造するために織りませた。次いで、糸は6×12の送り配列を備えた特別に作られた編組織機に配置した。送り（交互のロウとコラム）の一続きの動作によって、2つの矩形の3-D編組（30糸編組（ブレード#1）および60糸編組（ブレード#2））の形成をもたらす。

【0034】

例3：インビトロでの細胞培養

フィブロブラストおよび初代培養の骨芽細胞を用いた2週間細胞培養研究でマトリックスを評価した。全てのマトリックスは、細胞培養に先立ち、一面あたり24時間、UV滅菌した。新生児ラットの頭蓋冠殻単離した初代培養の骨芽細胞を、Jarcho, M. Clin. Ortho. 1981 157:259に記載のように、12%ウシ胎仔血清（FBS）添加Ham's F-12培地（GIBCO）でコンフルエントまで増殖させた。マウスフィibroブラスト細胞（ATCC（バージニア州アーリントン）から購入したBALB/C C7）を10%FBS添加DMEMでコンフルエントまで増殖した。細胞をUV滅菌したマトリックスに、 5×10^5 細胞/マトリックスの密度で播種した。細胞をマトリックス上で1日、3日、7日、10日および14日の間培養し、DMEM（10%FBS）で維持した。異なる時点で、細胞をグルタルアルデヒドに固定し、一連のエタノール希釈を介して脱水した。走査電子顕微鏡（SEM）用サンプルは金で被覆したスパッタ（Denton Desk-1 Sputter Coater）であった。マトリックスおよび細胞の構造は上昇電圧20 kVでSEM（Amray 3000）によって視覚化した。

40

【0035】

例4：種々のポリマーの劣化特性

L-ポリ-ラクチド（PLA、70デニール）、ポリ-グリコリド（PGA、60デニール）およびこれらの82:18コポリマー（PLAGA、70デニール）の多繊維を劣化研究に用いるための10個の多繊維の束に織りませた。束は、6 cmの長さに切り、そして70%アルコールと続くUV照射によって滅菌した。ポリマーの束を、10 mlのリン酸溶液（PBS、pH = 7.3）および10 mlの細胞培養培地（MEM、pH = 7.3；10%ウシ胎仔血清、L

50

-グルタミンおよび1%抗生物質添加)に浸した。サンプルは浸され、3週間までウォーターバスで37℃に維持した。両方の溶液に対する浸漬割合は次の通りである：PLAは0.6 mg/ml、PLAGAは0.8 mg/mlおよび0.7 mg/ml。溶液は毎週替え、1、2、3、4週でpH (n = 8) を測定し、高速液体クロマトグラフィー (HPLC) で溶液中のモノマー量を定量した。

【0036】

浸漬後2および4週で、束 (n = 5) の分子量、質量保持率および機械特性を測定した。劣化に関連する形態変化を走査電子顕微鏡を用いて試験した。質量保存率の測定のために、束を洗浄し、24時間凍結乾燥した。乾燥重量を記録し (n = 4)、そして同一サンプルを分子量 (MW) 測定に用いた。PLAおよびPLAGA (82:18) に対する分子量 (n = 3) をポリスチレン標品を用い、テトラヒドロフラン中のゲル透過クロマトグラフィーによって測定した。張力下の糸の機械特性を、染色率毎秒2%で、500 N 負荷セル (ゲージ長 = 3 cm) を用いて、インストロンマシン (Instron machine (Model 4442, Instron Inc., MA)) で試験した。

【0037】

例5：ポリマー構造物の前十字靱帯細胞の形態および増殖への効果

繊維骨格は、例2で記載の3-D編組方法を用いて加工した。L-ポリ-ラクチド (PLA、70デニール)、ポリ-グリコリド (PGA、60デニール) およびポリ-ラクチド-コ-グリコリド 82:18 (PLAGA、70デニール) の繊維を10繊維/糸の束に織りませ、次いでこれらの糸を3-D環状編組機 (3-D circular braiding machine) を用いて編んだ。24糸の環状3-D編組を形成し、これらの実験について1.5 cmで切断した。ダクロン構造物を同様に形成し、対照として用いた。

【0038】

構造物の気孔率、孔の直径および全孔領域をAutopore III porosimeter (Micromimetics) を用いて測定した。走査電子顕微鏡 (SEM) を孔の配分を確認するためおよび孔のジオメトリを試験するために用いた。サンプルは培養に先立ちUV滅菌した。構造物をそれぞれ再構成したヒトフィブロネクチン (10 µg/ml) で30分間覆った。

【0039】

初代ACL細胞を1 kgのニュージーランドホワイトウサギから単離した。摘出したACLを0.1%コラゲナーゼを用いて消化し、4回の消化から集めた細胞だけを研究に選んだ。細胞は、37℃、5% CO₂ で、MEM + 10% ウシ胎仔血清、L-グルタミンおよび1% 抗生物質で培養した。ACL細胞を80,000細胞/骨格の密度で骨格に播種し、28日目まで増殖させた。組織培養プラスチックおよびダクロンを対照群に利用した。培地は、2日ごとに交換し、各時点でpHを測定した。細胞増殖を細胞 - 力価 96 アッセイ (cell-titer 96 assay) を用いて測定した。骨格上の細胞形態および増殖をSEMを用いて画像化した。

フロントページの続き

- (72)発明者 クーパー, ジェームズ エー.
アメリカ合衆国 ペンシルヴァニア州 19150-2002、フィラデルフィア、ファイエット
ストリート 8272
- (72)発明者 コ, フランク ケイ.
アメリカ合衆国 ペンシルヴァニア州 19124-1741、フィラデルフィア、カスター ア
ベニュー 5144
- (72)発明者 ルー, ヘレン エイチ.
アメリカ合衆国 ペンシルヴァニア州 19130-3601、フィラデルフィア、アパートメン
ト 1110、ベンジャミン フランクリン パークウェイ 2200
- (72)発明者 アッタウィア, モハメッド エー.
アメリカ合衆国 マサチューセッツ州 02021、カントン、キャリッジ レーン 11

合議体

審判長 亀丸 広司

審判官 豊永 茂弘

審判官 安井 寿儀

- (56)参考文献 特開平7-148243(JP, A)
特表平7-505326(JP, A)
特表平9-500298(JP, A)
米国特許第6077989(US, A)
特表平11-506611(JP, A)
特表2001-505917(JP, A)
特表平10-505250(JP, A)
特開平1-168934(JP, A)
米国特許第5376118(US, A)

- (58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

A61F 2/08

A61L 27/00