

(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
2022年4月14日(14.04.2022)



(10) 国際公開番号

WO 2022/075477 A1

(51) 国際特許分類:

C12N 5/071 (2010.01) A61L 27/36 (2006.01)
A61K 35/12 (2015.01) A61P 27/02 (2006.01)
A61K 35/30 (2015.01)

国立大学法人東京医科歯科大学内 Tokyo (JP).
小林 尚俊(KOBAYASHI Hisatoshi); 〒3050047
茨城県つくば市千現一丁目2番地1 国立研究開
発法人物質・材料研究機構内 Ibaraki (JP).

(21) 国際出願番号: PCT/JP2021/037486

(22) 国際出願日: 2021年10月8日(08.10.2021)

(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 2020-170530 2020年10月8日(08.10.2020) JP

(71) 出願人: 国立大学法人東京医科歯科大学(NATIONAL UNIVERSITY CORPORATION TOKYO MEDICAL AND DENTAL UNIVERSITY) [JP/JP]; 〒1138510 東京都文京区湯島1丁目5番45号 Tokyo (JP). 国立研究開発法人物質・材料研究機構(NATIONAL INSTITUTE FOR MATERIALS SCIENCE) [JP/JP]; 〒3050047 茨城県つくば市千現一丁目2番地1 Ibaraki (JP).

(72) 発明者: 岸田 晶夫(KISHIDA Akio); 〒1138510 東京都文京区湯島1丁目5番45号 国立大学法人東京医科歯科大学内 Tokyo (JP). 橋本良秀(HASHIMOTO Yoshihide); 〒1138510 東京都文京区湯島1丁目5番45号 国立大学法人東京医科歯科大学内 Tokyo (JP). 船本 誠一(FUNAMOTO Seiichi); 〒1138510 東京都文京区湯島1丁目5番45号 国立大学法人東京医科歯科大学内 Tokyo (JP). 根岸 淳(NEGISHI Jun); 〒1138510 東京都文京区湯島1丁目5番45号

(74) 代理人: 正林 真之, 外(SHOBAYASHI Masayuki et al.); 〒1000005 東京都千代田区丸の内1-7-12 サピアタワー 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, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, IT, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, 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, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, WS, 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, ST, 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).

(54) Title: METHOD FOR PRODUCING DRY DECELLULARIZED TISSUE, METHOD FOR STORAGE PRE-TREATMENT OF DECELLULARIZED TISSUE, AND DRY DECELLULARIZED TISSUE

(54) 発明の名称: 乾燥脱細胞化組織の製造方法、脱細胞化組織の保存前処理方法、及び、乾燥脱細胞化組織

(57) Abstract: The present invention addresses the problem of providing a technique for preventing the cloudiness of a decellularized tissue after storage (particularly after reconstruction). The present invention provides a method for producing a dry decellularized tissue, the method comprising an immersion step for immersing a decellularized tissue in a sucrose-containing culture medium and a vacuum drying step for drying the decellularized tissue under a reduced pressure after the immersion step, in which the concentration of sucrose in the sucrose-containing culture medium is 5 to 55% by mass inclusive.

(57) 要約: 本発明の課題は、保存後(特に復元後)の脱細胞化組織の白濁を抑制することができる技術を提供することである。本発明は、脱細胞化組織をスクロース含有培地に浸漬する浸漬工程と、前記浸漬工程後、前記脱細胞化組織を減圧乾燥する減圧乾燥工程と、を含み、前記スクロース含有培地中のスクロース濃度が、5質量%以上55質量%以下である、乾燥脱細胞化組織の製造方法を提供する。

添付公開書類：

一 国際調査報告（条約第21条(3)）

明 細 書

発明の名称：

乾燥脱細胞化組織の製造方法、脱細胞化組織の保存前処理方法、及び、乾燥脱細胞化組織

技術分野

[0001] 本発明は、乾燥脱細胞化組織の製造方法、脱細胞化組織の保存前処理方法、及び、乾燥脱細胞化組織に関する。

背景技術

[0002] 現在の角膜移植医療では、他人の角膜を移植する同種移植が採用されているため、種々の拒絶反応が生じ得るという問題が知られている。そこで、このような問題の解決手段として、人工角膜の開発が待望されている。人工角膜の素材に対しては、生体組織と人工角膜との接合部位における脱落や感染症を防ぐために、生体組織との高い適合性が要求される。

[0003] 生体組織との高い適合性を有する人工角膜として、生体組織から細胞を除去して残存する支持組織である脱細胞化組織を利用する技術が近年開発されている。

[0004] 他方で、脱細胞化組織には、移植後に徐々に透明となるものの、移植してしばらくの間は白濁してしまうという問題があった。脱細胞化組織におけるこのような白濁を抑制するため、特許文献1には、所定の化合物を含む脱細胞化処理液が提案されている。

先行技術文献

特許文献

[0005] 特許文献1：特開2013-042677号公報

発明の概要

発明が解決しようとする課題

[0006] ここで、脱細胞化組織は、その製造後移植等の用途に供するまで、保存液

等の溶液に入れて保存することがある。

[0007] しかし、発明者らの検討の結果、脱細胞化組織の溶液中での保存が長期間にわたると、脱細胞化組織が白濁化してしまうことが見出された。例えば、市販の保存液（角膜保存液等の組織の種類に応じた保存液）に脱細胞化組織を入れ、4℃で保存した場合、1週間程度で白濁が認められた。

[0008] また、発明者らは、脱細胞化組織を、溶液中保存ではなく乾燥保存したとしても、白濁させずに復元することが困難であることを見出した。

[0009] したがって、保存後（特に復元後）の脱細胞化組織の白濁を抑制できる技術へのニーズがある。

[0010] 本発明は以上の実情に鑑みてなされたものであり、保存後（特に復元後）の脱細胞化組織の白濁を抑制することができる技術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

[0011] 本発明者らは、脱細胞化組織に対し、所定の培地に浸漬する浸漬処理、及び、減圧乾燥処理をこの順で行うことを含む乾燥脱細胞化組織の製造方法によれば、上記課題を解決できる点を見出し、本発明を完成するに至った。より具体的には、本発明は以下を提供する。

[0012] （１） 脱細胞化組織をスクロース含有培地に浸漬する浸漬工程と、
前記浸漬工程後、前記脱細胞化組織を減圧乾燥する減圧乾燥工程と、
を含み、
前記スクロース含有培地中のスクロース濃度が、5質量%以上55質量%以下である、
乾燥脱細胞化組織の製造方法。

[0013] （２） 前記浸漬工程における浸漬時間が、30分間以上24時間以下である、（１）に記載の製造方法。

[0014] （３） 前記脱細胞化組織が脱細胞化角膜である、（１）又は（２）に記載の製造方法。

[0015] （４） 脱細胞化組織をスクロース含有培地に浸漬する浸漬工程と、

前記浸漬工程後、前記脱細胞化組織を減圧乾燥する減圧乾燥工程と、
を含み、

前記スクロース含有培地中のスクロース濃度が、5質量%以上55質量%
以下である、

脱細胞化組織の保存前処理方法。

[0016] (5) 脱細胞化組織をスクロース含有培地に浸漬する浸漬工程と、

前記浸漬工程後、前記脱細胞化組織を減圧乾燥する減圧乾燥工程と、
を含む方法から得られ、

前記スクロース含有培地中のスクロース濃度が、5質量%以上55質量%
以下である、

乾燥脱細胞化組織。

発明の効果

[0017] 本発明によれば、保存後（特に復元後）の脱細胞化組織の白濁を抑制する
ことができる技術が提供される。

発明を実施するための形態

[0018] 以下、本発明の実施形態について説明するが、本発明はこれに限定されな
い。

[0019] <乾燥脱細胞化組織の製造方法>

本発明の乾燥脱細胞化組織の製造方法（以下、「本発明の製造方法」とも
いう。）は、脱細胞化組織をスクロース含有培地に浸漬する浸漬工程と、該
浸漬工程後、前記脱細胞化組織を減圧乾燥する減圧乾燥工程と、を含み、か
つ、スクロース含有培地中のスクロース濃度が、5質量%以上55質量%以
下である。

[0020] 上記のとおり、本発明の製造方法は、脱細胞化組織に対して所定の処理を
施すことで乾燥脱細胞化組織を得る方法である。

本発明者らの検討の結果、脱細胞化組織をスクロース含有培地によって脱
水させ、次いで減圧乾燥させた乾燥脱細胞化組織は、ドライな状態で保存で
きるだけでなく、培地等を用いて復元させた際の白濁が抑制されていると

いう意外な知見が見出された。

[0021] 他方で、浸漬工程においてスクロース濃度が本発明に規定される範囲外である培地を用いた場合や、浸漬工程及び減圧乾燥工程のうちのいずれか又は両方を行わなかった場合、得られた脱細胞化組織は、その後の工程（保存工程等）の有無や条件にかかわらず白濁や破損が認められた。

[0022] その理由は定かではないが以下のように推測される。

まず、脱細胞化組織の由来となる組織（角膜等）は、通常、溶液（例えば、洗浄液、培地等）中において膨潤し、透明度が低下する。これは、組織（角膜組織等）を構築しているコラーゲン線維の秩序配列が乱れた状態（ただし、基本的にはコラーゲン線維間の間隙が増加するだけで構造自体は壊れていない状態）となり、光を散乱するようになるためである。

したがって、従来のような保存液中で脱細胞化組織を保存した場合、組織の白濁を抑制することは極めて難しい。

他方で、本発明者らは、スクロースが、組織に対する脱水作用や、組織の凍結時の氷晶形成防止作用を有することを見出した。

スクロースによるこれらの作用により、脱細胞化組織の製造工程において膨潤した組織を、スクロースにより脱水することで、コラーゲン線維の秩序配列の乱れを整えることができ、その結果、光の散乱が抑制され、透明性を改善し得る。

さらに、減圧乾燥を行うことで、スクロースによって透明性が改善した脱細胞化組織をそのままの状態で維持することができる。かかる場合、組織中に自由水がほぼないため、膨潤が生じにくい。また、組織中に糖（スクロース等）が残存していることから復元性が高くなる。

その結果、長期保存を行ったとしても、脱細胞化組織の白濁が抑制された状態で復元が可能になる。

[0023] なお、本発明者らは、スクロースへの浸漬を行わないで脱細胞化組織を凍結すると、氷晶が形成し、組織自体の構造破壊が起こり、復元しても顕著な白濁が生じることを確認した。

[0024] 本発明によれば、保存後（特に復元後）の脱細胞化組織の白濁を抑制することができる。

[0025] 本発明において「脱細胞化組織の保存」とは、本発明の製造方法によって得られた乾燥脱細胞化組織を、組織中の水分量を増加させにくい条件、又は増加させない条件において、任意の手段及び条件で保存することを意味する。

[0026] 保存手段としては、例えば、真空保存、不活性ガス封入保存等が挙げられる。

[0027] 保存温度としては、例えば、 $-80 \sim 30^{\circ}\text{C}$ が挙げられる。

[0028] 保存湿度（相対湿度）としては、例えば、 $0 \sim 30\%$ が挙げられる。

[0029] 本発明において「保存後の脱細胞化組織の白濁が抑制されている」とは、本発明の製造方法によって得られた乾燥脱細胞化組織について、保存後の任意のタイミングでの白濁が抑制されていることを意味する。

[0030] 本発明において「復元後の脱細胞化組織の白濁が抑制されている」とは、本発明の製造方法によって得られた乾燥脱細胞化組織を、組織中の水分量を増加させる条件で脱細胞化組織を復元した際の白濁が抑制されていることを意味する。

例えば、本発明において「復元後の脱細胞化組織」は、該脱細胞化組織の由来となる組織（採取したばかりのもの）により近い透明性を有し得る。

[0031] 本発明において「脱細胞化組織の復元」とは、乾燥脱細胞化組織を乾燥前の状態に近づけることであり、例えば、乾燥脱細胞化組織に適度な量の水分を供給し、各種用途（移植片等）に適用可能な形態にすることが挙げられる。

[0032] 脱細胞化組織が脱細胞化角膜である場合、脱細胞化角膜の透明性は、実施例に示した方法で評価される。

[0033] 以下、本発明の製造方法の詳細について説明する。

[0034] （脱細胞化組織）

本発明の製造方法では、任意の生体組織を用いて従来知られる手段で製造

された脱細胞化組織を用いることができる。

[0035] 脱細胞化組織の由来となる生体組織は、白濁が問題となり得る組織であれば特に限定されないが、角膜組織、小腸粘膜下組織等が挙げられる。

これらのうち、本発明の効果が特に奏されやすいという観点から、脱細胞化組織の由来となる生体組織は角膜が好ましい。換言すれば、本発明における脱細胞化組織は、脱細胞化角膜が好ましい。

[0036] 生体組織の由来となる動物は特に制限されないが、ブタ、ウシ、ウマ、ヤギ、ヒツジ、ウサギ、カンガルー、サル、ヒト等の哺乳類動物を挙げることができる。

[0037] 生体組織の脱細胞化方法は特に限定されないが、例えば、圧力の印加工程、細胞残渣の除去工程、洗浄工程等を含んでいてもよい。

[0038] [印加工程]

印加工程としては、生体組織を任意の脱細胞処理液の中で超高静水压を印加することが挙げられる。この工程により、生体組織内の細胞を破壊できる。

[0039] 印加工程において用いる脱細胞処理液としては、例えば、培地（M199培地、MEM α 培地、及びこれらの混合培地等）が挙げられる。

[0040] 超高静水压とは、軟組織に存在する常在菌、細菌及びウイルスの細胞を破壊できるとされる静水压を意味する。

超高静水压の下限值は、好ましくは2000気圧以上である。

超高静水压の上限値は、好ましくは10000気圧以下である。

[0041] 印加工程においては、超高静水压処理装置（例えば、「Dr. CHEF（型式）」（株式会社神戸製鋼所製））等を用いることができる。

[0042] 印加工程における印加時間は、細胞が良好に破壊される限り特に限定されず、通常合計10～40分程度（例えば、加圧5分、維持10分、減圧5分）であり、印加時の脱細胞処理液の温度は通常5～40℃、好ましくは5～15℃である。

[0043] [除去工程]

除去工程としては、印加工程後に、生体組織を洗浄液とともに、浸漬させたり、対流又は循環させたりすることによって、細胞残渣の除去を促進することが挙げられる。

[0044] 除去工程において用いる洗浄液は、特に限定されないが、組織の構造や特性の低下を抑制できる任意の洗浄液が挙げられる。

[0045] 洗浄液としては、例えば、公知の細胞培養液（例えば、印加工程と同様の脱細胞処理液）、PBS水溶液、HEPES緩衝液、MES緩衝液等が挙げられる。

破壊された細胞中の核酸の残渣による痛風等の誘発を防止するため、洗浄液にはDNA分解酵素（DNase）が含まれていてもよい。

[0046] 除去工程における温度条件は、好ましくは20～37℃、より好ましくは22～25℃である。

[0047] 除去工程における処理時間は、好ましくは24～72時間、より好ましくは48～72時間程度である。処理時間中、洗浄液は適宜（例えば、1回）交換してもよい。

[0048] 生体組織から得た脱細胞化組織は、そのまま浸漬工程等に供してもよく、冷蔵又は冷凍で保存した後に浸漬工程等に供してもよい。

本発明の効果が奏されやすいという観点から、生体組織から得た脱細胞化組織は、そのまま（すなわち、脱細胞化組織の調製後、その他の工程を経ることなく）浸漬工程等に供することが好ましい。

[0049] （浸漬工程）

浸漬工程は、脱細胞化組織を、スクロース濃度が5質量%以上55質量%以下の培地に浸漬する工程である。

[0050] スクロース濃度が5質量%未満であると、膨潤しやすい。

スクロース濃度が55質量%超であると、脱細胞化組織に収縮が生じ、脱細胞化組織としての機能が損なわれる。

[0051] 浸漬工程において用いるスクロース含有培地のスクロース濃度の下限値は、好ましくは10質量%以上、より好ましくは20質量%以上、さらに好ま

しくは30質量%以上、最も好ましくは35質量%以上である。

浸漬工程において用いるスクロース含有培地のスクロース濃度の上限値は、好ましくは53質量%以下、より好ましくは52質量%以下、さらに好ましくは50質量%以下である。

[0052] 浸漬工程において用いるスクロースを配合する対象である培地としては、脱細胞化組織の構造等に影響しないものであれば特に限定されないが、M199培地、MEM α 培地、及びこれらの混合培地、生理食塩水、並びに緩衝液等が挙げられる。

[0053] 脱細胞化組織をスクロース含有培地に浸漬する時間は、脱細胞化組織中の水を十分に脱水できる時間や、脱細胞化組織中の水をスクロースに十分に置換できる時間であれば特に限定されないが、好ましくは30分間以上24時間以下、より好ましくは1時間以上6時間以下である。

[0054] 脱細胞化組織をスクロース含有培地に浸漬する温度条件は特に限定されないが、通常、浸漬工程は、室温環境下（例えば、4～37℃）で行われる。かかる場合、スクロース含有培地の培地温度は、通常、4～25℃である。

[0055] スクロース含有培地には、スクロース、及び培地のほか、スクロースの作用を阻害しない範囲でその他の成分が含まれていてもよく、含まれていなくともよい。

スクロース含有培地に含まれ得る成分としては、トコフェロール、アスコルビン酸等が挙げられる。これらの成分の配合量は、得ようとする効果等に応じて適宜設定できる。

[0056] （減圧乾燥工程）

減圧乾燥工程は、浸漬工程後、脱細胞化組織を減圧乾燥する工程である。

[0057] 減圧乾燥工程における減圧乾燥の条件等は特に限定されず、減圧下で脱細胞化組織の水分量を低減可能な任意の条件等を採用できる。

[0058] 例えば、減圧乾燥は、プログラムフリーザーを用いて行ってもよい。

[0059] 減圧乾燥の前に、氷晶形成の防止という観点から、液体窒素やスラッシュ窒素によって脱細胞化組織を急速凍結することが好ましい。

[0060] <乾燥脱細胞化組織>

本発明の製造方法によって得られた乾燥脱細胞化組織は、任意の条件下で保存することができる。

[0061] 乾燥脱細胞化組織は、好ましくは、減圧乾燥工程の直後に保存される（すなわち、減圧乾燥工程と保存工程との間に他の工程を含まない。）。

ただし、本発明において、減圧乾燥工程と保存工程との間に他の工程を含む態様は排除されない。かかる場合、このような他の工程としては、乾燥脱細胞化組織の水分含量が過度に増加する工程（洗浄、高湿度下の操作等）を含まないことが望ましい。

[0062] 本発明において「乾燥」とは、脱細胞化組織中の水分が十分に低いこと（例えば、脱細胞化組織の質量に対する水分含量が5質量%以下）を意味する。

脱細胞化組織中の水分含量は、赤外線／ハロゲン水分計によって特定される。

[0063] 保存方法は特に限定されないが、乾燥脱細胞化組織を容器（バイアル瓶、プラスチック容器等）に入れ、保存してもよい。

[0064] 保存温度は特に限定されないが、脱細胞化組織の構造等に影響を与えない観点から、通常、4～10℃である。

[0065] 保存時間は特に限定されず、本発明によれば、保存時間が長期間にわたっても、復元後の脱細胞化組織の白濁が抑制される。

保存時間は、例えば、1日以上2年以下であってもよい。

[0066] <乾燥脱細胞化組織の復元>

保存期間完了後、脱細胞化組織を任意の方法で復元することで、脱細胞化組織の由来となる組織の種類に応じた所望の用途（移植等）に利用できる。

[0067] 脱細胞化組織の復元方法としては特に限定されないが、脱細胞化組織中に水分等を供給できる任意の方法（単純浸漬、真空含浸、真空加圧含浸等）を用いることができる。

[0068] 脱細胞化組織の復元に用いる溶液としては特に限定されないが、糖（デキ

ストラン 70 等) 溶液、任意の緩衝液、生理食塩水、及び組織保存液として知られる任意の保存液（例えば、角膜組織保存液として知られる「Optisol-GS」）等が挙げられる。

[0069] 脱細胞化組織の復元の温度条件としては特に限定されないが、室温（例えば 4℃以上 25℃以下）が好ましい。

[0070] 脱細胞化組織の復元の時間（脱細胞化組織を溶液に浸漬する時間）としては特に限定されないが、組織の膨潤やそれによる白濁を抑制する観点から、10分以上 120分以下が好ましい。

[0071] <脱細胞化組織の保存前処理方法>

本発明における浸漬工程及び減圧乾燥工程を組み合わせることで脱細胞化組織を処理することにより、復元後の白濁が抑制された乾燥脱細胞化組織が得られる。

したがって、本発明における浸漬工程及び減圧乾燥工程を組み合わせる方法は、脱細胞化組織の保存前に行われる前処理方法として有用である。

[0072] <移植片>

本発明における乾燥脱細胞化組織は、動物に移植される移植片、又は移植片の部分として有用である。

例えば、脱細胞化組織が脱細胞化角膜である場合、以下の構成を有する移植片としての応用があり得る。

脱細胞化角膜及び上皮（部分角膜移植片）

脱細胞化角膜及び内皮（部分角膜移植片）

脱細胞化角膜、内皮、及び上皮（全層移植片）

実施例

[0073] 以下に、実施例により本発明をさらに詳しく説明するが、本発明はこれらの実施例に限定されるものではない。

[0074] <<試験 1：脱細胞化角膜の作製及び評価－1>>

以下の方法で脱細胞化角膜を作製し、乾燥処理を行った後に復元し、復元後の透明性を評価した。

[0075] <脱細胞化角膜の作製>

以下の方法で、ブタの角膜を用いて脱細胞化角膜を作製した。

- (1) 成体ブタの眼球から眼科用メスを用いて強角膜片を採取した。
- (2) 得られた強角膜片を、M199培地及びMEM α 培地の等量混合培地（以下、該混合培地を「M α 溶液」ともいう。）に10質量%グリセロール添加した溶液（グリセロール添加M α 溶液）を用いて洗浄した。
- (3) 洗浄後の強角膜片をグリセロール添加M α 溶液に浸した状態でポリエチレン製バッグ入れ、ヒートシールし、サンプリングバッグを作製した。
- (4) サンプルバッグに対し、冷間等方加圧装置（商品名「Dr. CHEF」、株式会社神戸製鋼所製）を用いて、600MPaでの高静水圧印加を10℃で10分間行った。

加圧／減圧速度は、120MPa/minに設定した。

- (5) 印加後、強角膜片をポリカーボネート製ストレージボトル（容量150mL）に清潔環境下で移し、洗浄用M α 溶液を100mL加え、25℃で48時間振盪洗浄（60rpm）することで、細胞残渣を除去し、脱細胞化角膜を得た。

なお、「洗浄用M α 溶液」とは、M α 溶液に下記を加えたものである：3.5質量% デキストラン 70、200 μ g/mL DNase I、10 μ g/mL ゲンタマイシン硫酸塩、500 μ g/mL L-アスコルビン酸2-リン酸エステル三ナトリウム。

[0076] <脱細胞化角膜への浸漬処理及び減圧乾燥処理>

上記で得られた脱細胞化角膜に対し、以下の方法で浸漬処理及び減圧乾燥処理を行った。

- (1) 脱細胞化角膜を、浸漬用M α 溶液（10mL）に浸漬した。この工程は「浸漬処理」に相当する。

なお、「浸漬用M α 溶液」とは、M α 溶液に下記を加えたものである：0、20、35、40、又は50質量%のスクロース。

また、浸漬処理における処理時間は60分に設定した。浸漬処理における

処理温度は、表1の「処理温度」の項に示すとおりである。浸漬処理中、脱細胞化角膜を60rpmで振盪し続けた。

(2) スクロース置換した脱細胞化角膜を、滅菌バイアル瓶(容量5mL)に移し、液体窒素により急速凍結した。

(3) 凍結後、プログラムフリーザーを用いて、減圧下(<3Pa)にて、-40℃で24時間、次いで-15℃で72時間の一次乾燥後を行った後、10℃に温度を上昇させ1時間以上の2次乾燥を行った。この工程は「減圧乾燥処理」に相当する。

(4) 減圧乾燥後、得られた乾燥脱細胞化組織を、真空下にてバイアル瓶に入れて密栓し、4℃で、6ヶ月保存した。

[0077] <脱細胞化角膜の復元>

6ヶ月保存後の各乾燥脱細胞化角膜の全体を、室温下で、生理食塩水(5mL)に1時間浸漬し、脱細胞化組織を復元した。

[0078] <参考試験：保存液を用いた脱細胞化組織の保存>

参考として、上記<脱細胞化角膜への浸漬処理及び減圧乾燥処理>に示した方法の代わりに、脱細胞化角膜を保存液中に浸漬して、4℃で1週間又は2週間保存した組織も準備した。

保存液としては、Mα溶液に下記を加えたものを用いた：3.5質量%デキストラン 70、10μg/mL ゲンタマイシン硫酸塩、500μg/mL L-アスコルビン酸2-リン酸エステル三ナトリウム。

[0079] <透明性の評価>

復元後の各乾燥脱細胞化角膜について、その透明性を以下の方法で評価した。

[0080] 24ウェルプレートに各試料を入れて、400~700nmにおける角膜中央の吸光度を1nm刻みで測定した。その後、Lambert-Beerの法則に基づき透過率を算出し、400~700nmにおける透過率の平均を特定した。

[0081] また、以下の未処理の角膜又は各脱細胞化角膜についても同様に400~

700nmにおける透過率の平均を特定した。

(1) 未処理：脱細胞化処理を施していない、採取したばかりの角膜。

(2) HHP直後：＜脱細胞化角膜の作製＞において高静水圧印加を完了した直後の角膜。

(3) 脱細胞化直後：＜脱細胞化角膜の作製＞の全操作を終えた直後の脱細胞化角膜

(4) 4（2年保存後）：＜脱細胞化角膜への浸漬処理及び減圧乾燥処理＞において保存を2年行った点以外は、サンプル番号4と同様に得られた乾燥脱細胞化角膜

(5) 溶液保存（1週間）：＜参考試験：保存液を用いた脱細胞化組織の保存＞において1週間の保存を行った脱細胞化角膜

(6) 溶液保存（2週間）：＜参考試験：保存液を用いた脱細胞化組織の保存＞において2週間の保存を行った脱細胞化角膜

[0082] 得られた透過率の各値を、「未処理」に対する相対値として示し、各試料の透明性を評価した。その結果を表1の「未処理に対する相対値」の項に示す。「未処理に対する相対値」の項に示す数値が高いほど、白濁が抑制され、透明性が高いことを意味する。

[0083] [表1]

サンプル番号	スクロース濃度 (質量%)	処理温度 (℃)	未処理に対する 相対値(%)
1	20	4	55.7
2	20	25	54.0
3	35	4	59.9
4	40	25	57.5
5	50	4	54.7
6	50	25	57.1
7	0	4	7.6
未処理	—	—	100.0
HHP直後	—	—	85.3
脱細胞化直後	—	—	47.3
4(2年保存後)	40	25	79.2
溶液保存(1週間)	—	—	1.0
溶液保存(2週間)	—	—	3.9

[0084] 上記のとおり、本発明の製造方法から得られる乾燥脱細胞化組織は、復元後の透明性が良好だった。

具体的には、「脱細胞化直後」と同等か、それ以上の透明性を有していた。

[0085] これに対し、従来のように溶液中で保存した脱細胞化組織は、1又は2週間の保存後に白濁し、さらには顕著な膨潤が認められた。

[0086] 本発明における浸漬工程（スクロース含有培地による浸漬処理）を経ない場合、減圧乾燥工程中に脱細胞化組織が割れたり、復元後に顕著な白濁が認められたりした。

[0087] なお、本発明の製造方法によって得られた、6ヶ月保存後に復元した脱細胞化角膜は高い透明性を有することも確認された。

この脱細胞化角膜をウサギに移植して3ヶ月経過観察したところ、有害事象（血管新生、重篤な炎症反応等）は認められなかった。

[0088] <<試験2：脱細胞化角膜の作製及び評価－2>>

脱細胞化角膜の浸漬処理におけるスクロース濃度及び温度条件を表2に示した条件に設定した点、及び、透明性の評価を以下の方法で行った点以外は、上記「試験1」と同様の方法で脱細胞化角膜を作製及び評価した。

[0089] 透明性の評価においては、脱細胞化角膜の中心を直径6mmに打ち抜いた後、96well ガラスボトムプレートに入れ、400～700nmの吸光度を測定した。その後、L a m b e r t - B e e rの法則に基づき透過率を算出し、400～700nmにおける透過率の平均を特定した。

[0090] 結果を表2の「未処理に対する相対値」の項に示す。なお、復元後の脱細胞化角膜の収縮を目視観察した結果を「収縮の有無」の項に示す。

[0091]

[表2]

サンプル番号	スクロース濃度 (質量%)	処理温度 (°C)	未処理に対する 相対値(%)	収縮の有無
8	0	4	51.3	なし
9	5		57.7	なし
10	10		54.6	なし
11	20		71.3	なし
12	30		85.4	なし
13	35		95.2	なし
14	40		92.7	なし
15	50		98.5	なし
16	60		102.7	あり
未処理	—	—	100.0	—
脱細胞化直後	—	—	92.5	なし
14(2年保存後)	40	4	69.4	なし

[0092] 上記のとおり、本発明の製造方法から得られる乾燥脱細胞化組織は、復元後の透明性が良好だった。スクロース濃度が30～50質量%であると、特に良好な効果が得られた。

[0093] スクロース濃度が、本発明の要件を満たしていると、白濁が良好に抑制されていた。

[0094] これに対し、スクロース濃度が、本発明における下限よりも低いと、膨潤し白濁が十分に抑制されなかった。

[0095] これに対し、スクロース含有培地中のスクロース濃度が、本発明における上限よりも高いと、脱細胞化組織に顕著な収縮が生じ、脱細胞化組織として機能しなかった。

請求の範囲

- [請求項1] 脱細胞化組織をスクロース含有培地に浸漬する浸漬工程と、
前記浸漬工程後、前記脱細胞化組織を減圧乾燥する減圧乾燥工程と、
、
を含み、
前記スクロース含有培地中のスクロース濃度が、5質量%以上55質量%以下である、
乾燥脱細胞化組織の製造方法。
- [請求項2] 前記浸漬工程における浸漬時間が、30分間以上24時間以下である、請求項1に記載の製造方法。
- [請求項3] 前記脱細胞化組織が脱細胞化角膜である、請求項1又は2に記載の製造方法。
- [請求項4] 脱細胞化組織をスクロース含有培地に浸漬する浸漬工程と、
前記浸漬工程後、前記脱細胞化組織を減圧乾燥する減圧乾燥工程と、
、
を含み、
前記スクロース含有培地中のスクロース濃度が、5質量%以上55質量%以下である、
脱細胞化組織の保存前処理方法。
- [請求項5] 脱細胞化組織をスクロース含有培地に浸漬する浸漬工程と、
前記浸漬工程後、前記脱細胞化組織を減圧乾燥する減圧乾燥工程と、
、
を含む方法から得られ、
前記スクロース含有培地中のスクロース濃度が、5質量%以上55質量%以下である、
乾燥脱細胞化組織。

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2021/037486

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C12N 5/071(2010.01)i; **A61K 35/12**(2015.01)i; **A61K 35/30**(2015.01)i; **A61L 27/36**(2006.01)i; **A61P 27/02**(2006.01)i
 FI: C12N5/071; A61P27/02; A61K35/30; A61L27/36 100; A61L27/36 400; A61L27/36 300; A61K35/12

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)

C12N5/071; A61K35/12; A61K35/30; A61L27/36; A61P27/02

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Published examined utility model applications of Japan 1922-1996
 Published unexamined utility model applications of Japan 1971-2021
 Registered utility model specifications of Japan 1996-2021
 Published registered utility model applications of Japan 1994-2021

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII); Cplus/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS (STN)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	JP 2013-42677 A (TOKYO MEDICAL AND DENTAL UNIVERSITY) 04 March 2013 (2013-03-04) claims, paragraphs [0026]-[0070]	5
Y	claims, paragraphs [0026]-[0070]	1-5
Y	WO 2013/032009 A1 (FCOM CO., LTD.) 07 March 2013 (2013-03-07) claims, paragraphs [0021]-[0053]	1-5
Y	木村剛他. 人工角膜としての脱細胞化角膜の創製. 東京医科歯科大学学生体材料工学研究所年報. 03 March 2007, vol. 40, pp. 16-19 (KIMURA, Takeshi et al. Preparation of decellularized cornea as artificial cornea. Annual Reports of the Institute of Biomaterials and Bioengineering.) 1., 3., 4.	1-5
A	CN 105343934 A (GUANGZHOU YUEQING REGENERATION MEDICINE TECHNOLOGY CO., LTD.) 24 February 2016 (2016-02-24) claims	1-5



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

06 December 2021

Date of mailing of the international search report

21 December 2021

Name and mailing address of the ISA/JP

**Japan Patent Office (ISA/JP)
 3-4-3 Kasumigaseki, Chiyoda-ku, Tokyo 100-8915
 Japan**

Authorized officer

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2021/037486**C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT**

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	HUANG, Yan-Yan et al. Various changes in cryopreserved acellular nerve allografts at -80°C. Neural Regeneration Research. 2018 (intake date), vol. 13, no. 9, pp. 1643-1649, doi:10.4103/1673-5374.237138 abstract	1-5

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/JP2021/037486

Patent document cited in search report			Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)	Publication date (day/month/year)
JP	2013-42677	A	04 March 2013	(Family: none)	
WO	2013/032009	A1	07 March 2013	US 2015/0157667 A1 claims, paragraphs [0034]-[006 6] EP 2752192 A1 CN 103987392 A CN 110841112 A	
CN	105343934	A	24 February 2016	(Family: none)	

A. 発明の属する分野の分類（国際特許分類（IPC）） C12N 5/071(2010.01)i; A61K 35/12(2015.01)i; A61K 35/30(2015.01)i; A61L 27/36(2006.01)i; A61P 27/02(2006.01)i FI: C12N5/071; A61P27/02; A61K35/30; A61L27/36 100; A61L27/36 400; A61L27/36 300; A61K35/12		
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）） C12N5/071; A61K35/12; A61K35/30; A61L27/36; A61P27/02		
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 1971-2021年 日本国実用新案登録公報 1996-2021年 日本国登録実用新案公報 1994-2021年		
国際調査で利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） JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII); CPlus/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS (STN)		
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
X	JP 2013-42677 A (国立大学法人 東京医科歯科大学) 04.03.2013 (2013-03-04) 特許請求の範囲、[0026] - [0070]	5
Y	特許請求の範囲、[0026] - [0070]	1-5
Y	WO 2013/032009 A1 (株式会社エフコム) 07.03.2013 (2013-03-07) 請求の範囲、[0021] - [0053]	1-5
Y	木村剛他, 人工角膜としての脱細胞化角膜の創製, 東京医科歯科大学学生体材料工学研究所年報, 2007.03.03, Vol. 40, p. 16-19 1.、3. - 4.	1-5
A	CN 105343934 A (GUANGZHOU YUEQING REGENERATION MEDICINE TECHNOLOGY CO., LTD.) 24.02.2016 (2016-02-24) 特許請求の範囲	1-5
A	HUANG, Yan-Yan et al., Various changes in cryopreserved acellular nerve allografts at -80° C, Neural Regeneration Research, 2018 (受入日), Vol. 13, No. 9, p. 1643-1649, doi:10.4103/1673-5374.237138 Abstract	1-5
☐ 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、一般的な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抵触するものではなく、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 06.12.2021		国際調査報告の発送日 21.12.2021
名称及びあて先 日本国特許庁(ISA/JP) 〒100-8915 日本国 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号		権限のある職員（特許庁審査官） 山本 晋也 4N 3341 電話番号 03-3581-1101 内線 3488

国際調査報告
 パテントファミリーに関する情報

国際出願番号

PCT/JP2021/037486

引用文献			公表日	パテントファミリー文献	公表日
JP	2013-42677	A	04.03.2013	(ファミリーなし)	
WO	2013/032009	A1	07.03.2013	US 2015/0157667 A1	
				Claims, [0034]-[0066]	
				EP 2752192 A1	
				CN 103987392 A	
				CN 110841112 A	
CN	105343934	A	24.02.2016	(ファミリーなし)	