

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第4162378号
(P4162378)

(45) 発行日 平成20年10月8日(2008.10.8)

(24) 登録日 平成20年8月1日(2008.8.1)

(51) Int.Cl. F 1
A 6 1 F 2/26 (2006.01) A 6 1 F 2/26

請求項の数 16 (全 18 頁)

(21) 出願番号	特願2000-518618 (P2000-518618)	(73) 特許権者	596115687
(86) (22) 出願日	平成10年10月30日 (1998.10.30)		チルドレンズ メディカル センター コーポレーション
(65) 公表番号	特表2001-521781 (P2001-521781A)		アメリカ合衆国マサチューセッツ州02115, ポストン, シャタック・ストリート55
(43) 公表日	平成13年11月13日 (2001.11.13)	(74) 代理人	100102978
(86) 国際出願番号	PCT/US1998/022963		弁理士 清水 初志
(87) 国際公開番号	W01999/022677	(74) 代理人	100119507
(87) 国際公開日	平成11年5月14日 (1999.5.14)		弁理士 刑部 俊
審査請求日	平成17年6月30日 (2005.6.30)	(74) 代理人	100128048
(31) 優先権主張番号	60/063, 839		弁理士 新見 浩一
(32) 優先日	平成9年10月31日 (1997.10.31)	(74) 代理人	100129506
(33) 優先権主張国	米国 (US)		弁理士 小林 智彦

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 ペニス再建術

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

軟骨の欠損、損傷又は異常を原因としない解剖学的欠陥であって、隣接組織に構造支持を提供することにより少なくとも部分的に治療することのできる解剖学的欠陥、を有する患者を治療するのに用いる移植可能な構造部材であって、前記構造部材が、所望の支持部材の形状に成形されたポリマ・マトリックスを含み、前記マトリックス上及びマトリックス内部には解離性軟骨形成細胞が沈着しており、それにより、移植すると、制御された生体力学的特性を有する軟骨様構造部材が形成されて、前記欠陥の区域に必要な構造支持が提供され、ここで前記支持部材が、尿道を受容するよう適合された手段を更に含む長寸の筒である、移植可能な構造部材。

【請求項2】

前記ポリマ・マトリックスが、セルロースエーテル、セルロース、セルロースエステル、弗化ポリエチレン、フェノール樹脂、ポリ-4-メチルペンテン、ポリアクリロニトリル、ポリアミド、ポリアミドイミド、ポリアクリレート、ポリベンゾキサゾール、ポリカーボネート、ポリシアノアリアルエーテル、ポリエステル、ポリエステルカーボネート、ポリエーテル、ポリエーテルエーテルケトン、ポリエーテルイミド、ポリエーテルケトン、ポリエーテルスルホン、ポリエチレン、ポリフルオロオレフィン、ポリイミド、ポリオレフィン、ポリオキサジアゾール、ポリフェニレンオキサイド、ポリフェニレンサルファイド、ポリプロピレン、ポリスチレン、ポリサルファイド、ポリスルホン、ポリテトラフルオロエチレン、ポリチオエーテル、ポリトリアゾール、ポリウレタン、ポリビニル、ポ

リ弗化ビニリデン、再生セルロース、シリコン、ユリア - ホルムアルデヒド、又はこれらのコポリマ又は物理的混合物、のうちのいずれかから選択される生体適合性材料を含む、請求項 1 に記載の構造部材。

【請求項 3】

前記ポリマ・マトリックスが生分解性材料を含む、請求項 1 に記載の構造部材。

【請求項 4】

前記生分解性材料がポリグリコール酸ポリマ、ポリグルクテンポリマ、及びこれらの混合物及び複合材のうちのいずれかから選択される、請求項 3 に記載の構造部材。

【請求項 5】

何らかの構造部材の少なくとも一部を液化ポリマでコーティングすることにより強化される、請求項 3 に記載の構造部材。

10

【請求項 6】

前記液化ポリマが 50 : 50 のポリ - DL - ラクチド - コ - グリコリドのコポリマである、請求項 5 に記載の構造部材。

【請求項 7】

前記軟骨形成細胞が軟骨細胞である、請求項 1 に記載の構造部材。

【請求項 8】

尿道を受容するよう適合された前記手段がその長さ方向に沿って長手方向の溝である、請求項 1 に記載の構造部材。

【請求項 9】

20

軟骨の欠損、損傷又は異常を原因としない解剖学的欠陥であって、隣接組織に構造支持を提供することにより少なくとも部分的に治療することのできる解剖学的欠陥、を有する患者を治療するのに用いる移植可能な構造部材であって、前記構造部材が、所望の支持部材の形状に成形されたポリマ・マトリックスを含み、前記マトリックス上及びマトリックス内部には解離性軟骨形成細胞が沈着しており、それにより、移植すると、制御された生体力学的特性を有する軟骨様構造部材が形成されて、前記欠陥の区域に必要な構造支持が提供され、ここで前記支持部材は、壁面厚さ及びその長さ方向に沿った孔を有する中空の筒状チューブである、移植可能な構造部材。

【請求項 10】

前記中空の筒状チューブが尿道を受容するよう適合されている、請求項 9 に記載の構造部材。

30

【請求項 11】

前記壁面厚さが長手方向で可変である、請求項 9 に記載の構造部材。

【請求項 12】

前記筒はその長手方向の長さにならって構造強度が可変である、請求項 1 に記載の構造部材。

【請求項 13】

軟骨の欠損、損傷又は異常を原因としない解剖学的欠陥であって、隣接組織に構造支持を提供することにより少なくとも部分的に治療することのできる解剖学的欠陥、を有する患者を治療するのに用いる移植可能な構造部材であって、前記構造部材が、所望の支持部材の形状に成形されたポリマ・マトリックス、および前記インプラントを下行骨盤に取り付けるために、一端に定着手段を含み、前記マトリックス上及びマトリックス内部には解離性軟骨形成細胞が沈着しており、それにより、移植すると、制御された生体力学的特性を有する軟骨様構造部材が形成されて、前記欠陥の区域に必要な構造支持が提供される、移植可能な構造部材。

40

【請求項 14】

少なくとも約 2 . 2 k g の引張り強度を有する、請求項 1 に記載の構造部材。

【請求項 15】

少なくとも約 3 . 7 k g の引張り強度を有する、請求項 1 に記載の構造部材。

【請求項 16】

50

一秒当り500 μ mから一秒当り20,000 μ mの速度で行なわれるサイクル圧縮に耐えることのできる、請求項1に記載の構造部材。

【発明の詳細な説明】

【0001】

発明の背景

1. 発明の分野

本発明は、組織操作された構造支持部材を利用することにより解剖学的欠陥を治療するのに有用な方法及び材料、特に、ペニス再建術に有用な方法及び材料に関するものである。

【0002】

2. 背景の説明

無陰茎症、陰茎發育不全、重度の尿道下裂、外傷又は偽半陰陽が原因の性器形成不全などの状態には、外科的介入が必要である。これらの患者の性行動は、十分な診断的評価と、家族との入念な相談の後で行なわれる。決定は外部生殖器の形態、ホルモン上の性別及び確定された性の役割に基づいてなされる。多くの場合、陰茎再建術の外科的問題及び結果がよくないために、核型に関係なくこの子供は女性として育てられるべきだとの決定がなされる。

【0003】

ペニスは二つの並行な筒状の本体、即ち海綿体と、それらの下にある尿道海綿体とから成り、この中を尿道が貫通する。尿道はペニスの下側に沿って走った後、上に向かって走り、ペニスの先端で蓋のようになった、拡張した円錐型の先端である陰茎亀頭で開放する。緩い皮膚がペニスを覆って収縮可能な包皮又は陰茎包皮を形成する。ペニスの根元は陰茎脚により恥骨の下降部分に付いており、この陰茎脚が海綿体の末端である。

【0004】

インポテンスには数多くの原因がある。器質的なインポテンスは、特定の生理学的過程の干渉を原因とする機能的勃起を起させる又は維持する能力の喪失である。器質的なインポテンスの原因には、脊髄損傷又は骨盤骨折などの外傷、前立腺切除、膀胱切除、外部括約筋切開及び腹部会陰切開などの術後合併症、動脈硬化又は持続勃起症などの血管疾患、末梢ニューロパシ及び多発性硬化症などの神経疾患、糖尿病、性腺機能低下症及び腎不全などの内分泌及び代謝疾患、及び、エストロゲン、副交感神経遮断剤、モルヒネ、及びヘロインなどの投薬が含まれる。

【0005】

陰茎再建術が最初に試みられたのは自己組織を用いた30年代後期のものである(例えば Goodwin, W.E. et al., Phalloplasty. J. Urol., 68: 903, 1952を参照されたい)。外傷によりペニスを失った患者には肋骨軟骨が硬質化材料として用いられてきている。この方法には複数の段階を経る外科術が含まれ、美容的に満足のいく結果を出していない(Frumppkin, A.P.: Am. Rev. Sov. Med., 2: 14, 1944)1970年代にはシリコン製のプロテーゼが人気を博した(Bretan, P.N.Jr.: In: Genitourinary Prostheses. Montague, D. K. (ed), Philadelphia, W. B. Saunders Co., 1989; Small, M. P. et al., Urology, 5: 479, 1975)シリコン製のペニス用プロテーゼは成人向けの治療様式としては受け容れられているが、びらん及び感染といった合併症が依然問題として残っている(Nukui, F. et al., Int. J. Urol., 4: 52, 1997; Kardar, A. et al., Scan. J. Urol. and Nephrol., 29: 355, 1995)。人工プロテーゼに関して報告された問題には、他にも、尿道を貫通した突出、又は背側陰茎骨幹の沈み込み、リンパ水腫、亀頭冠の刺激、プロテーゼ上の亀頭の滑り、海綿体の感染、脚部の穿孔、中央骨幹中隔の穿孔、及びペニス痛、がある(Small, M. P. et al., Urology, 5: 479, 1975)。

【0006】

シリコン製のペニス用プロテーゼは、ペニス再建術の必要な成人向けの治療様式として受け容れられてはいるが、小児集団にはあまり適用されておらず、その大きな理由はこれらの人工装置に伴う長期的問題である。このように、性器の再建術を必要とする小児で用いることができるかも知れない生体適合性がありかつ弾性のペニス用インプラントが求めら

10

20

30

40

50

れている。

発明の概要 本発明は、組織及び臓器再建用成形構造支持部材における現在の戦略及びデザインに伴った問題及び短所を克服するものである。

【0007】

本発明の一実施例は、軟骨の欠損、損傷、又は異常で起きたものでない解剖学的欠陥を有する患者を治療するのに用いる移植可能な構造部材に関する。当該欠陥は、隣接組織に構造支持を提供することにより少なくとも部分的に治療されるものである。本構造部材は、当該マトリックスを移植したときに軟骨様の構造部材が形成されるよう、解離性軟骨形成細胞をマトリックス上及びマトリックス内部に沈着させた所望の支持部材の形状に成形されたポリマ・マトリックスから形成される。この軟骨様の構造部材は、欠陥部位に必要な構造支持が提供されるような制御された生体力学的性質を有する。

10

【0008】

本発明の別の実施例は、軟骨の欠損、損傷、又は異常で起きたのではない解剖学的欠陥を有する患者を治療する方法に関するものである。当該欠陥は、隣接組織に構造支持を提供することにより少なくとも部分的に治療可能な種類のものである。本方法は、所望の指示部材の形状に成形されたポリマ・マトリックスを提供するステップを含む。解離性軟骨形成細胞は、マトリックス上又はマトリックス内部に沈着してマトリックス/細胞コンストラクトを形成する。このマトリックス/細胞コンストラクトを、制御された生体力学的性質を持つ軟骨様構造部材を形成するよう、構造支持の必要な患者の部位に移植することで、欠陥区域に必要な構造支持を提供する。

20

【0009】

本発明のさらなる実施例は、このような治療を必要とする患者のペニスを再建する方法に関する。構造部材を形成するよう成形されると共に、海綿体に合う又は海綿体に代わるよう採用された、生体適合性の合成又は天然ポリマ・マトリックスが提供される。軟骨形成細胞をポリマ・マトリックス上及びポリマ・マトリックス内部に沈着させて、マトリックス/再棒コンストラクトを形成する。このマトリックス/細胞コンストラクトを、軟骨様構造部材が生体内に、その性質が生体力学的に制御された状態で形成されるよう、患者の海綿体に移植することで、機能的臓器として働くに十分な硬度及び曲げ強さを持った再建されたペニスを提供する。

【0010】

本発明のその他の実施例及び利点は、以下の記載に部分的に述べたものであり、また同記載は、部分的には、本明細書から明白であると共に本発明の実施から学ばれるところである。

30

【0011】

発明の説明

最も広い態様では、本発明は軟骨の欠損、損傷又は異常を原因としない解剖学的欠陥であって、隣接組織又は当該欠陥を含む組織に構造支持を提供することにより少なくとも部分的に治療することのできる解剖学的欠陥を有する患者を治療する方法及び材料に関するものである。必要となる構造支持は、所定形状であると共に制御された生体力学的性質を有する組織操作された軟骨様構造部材により、本発明に基づき提供することができる。本発明を、原則的にはペニス再建用のロッド形状の部材に関して以下に説明するが、構造支持が、軟骨以外の構造欠陥を修正する又は修正に役立つようなあらゆる身体部分に用いられるよう、あらゆる形状及び横断面の構造部材を考察するところである。

40

【0012】

本発明は、患者の一領域に構造的補強を加えるための軟骨様構造部材の利用に関する。外科的手法及び外傷の結果、しばしば患者の身体構造が脆弱化することがある。例えば、肺又は腎臓などの罹患又は損傷臓器を除去すると、患者には大きな体腔ができる。軟骨様構造部材(CSM)はこのような臓器の除去後に残った体腔に構造支持を提供することができる。CSMの利点の一つは、移植中に外科医が迅速に成形かつモデルできるよう、適当に軟質である材料から形成されている点である。さらに、試験管内でCSMを作製できるため、

50

複数のCSM構造を手術前に予め作製しておくことができる。このように、外科医は大きさと、手術中の構造特性という点で最も適したCSM構造を選択することができる。選択の可能な構造特性には構造強度、曲げ、ねじれへの抵抗、等々がある。

【0013】

本発明の別の実施例は、当該構造を個々の用途に特に誘えられるよう、可変の構造強度を持たせて作製することのできるCSMに関する。このCSMは、位置及び患者の特定のニーズに応じた可変の構造支持程度を提供することができる。例えば、CSM構造は、体腔において構造支持を提供するのに適したシート状、柱状、襷付き柱状、多角形、球形、又はあらゆる複雑な形状に作製してもよい。あるいは、当該CSMを固形の塊として作製し、軟骨細胞による接種前又は接種後に成形してもよい。CSMの形状は、例えば、外科術前に患者のCAT 10 スキャン又はMRI撮像法を行なうことにより決定することができる。作製は手で行っても、又はコンピュータ支援のデザインコンピュータ支援作製(CAD-CAM)システムによって行なってもよい。

【0014】

細胞

軟骨形成細胞は、特にここに参考文献として編入することとする発行済米国特許第5,041,138号に説かれた手法に基づいて分離してもよい。簡単に説明すると、関節軟骨を生後2週間の仔ウシの肩から得た。この肩をポビドン-イオジン10%で洗浄し、この関節の連結表面から取った軟骨を分離して一辺当り5nm未満の大きさの片に切断した。次にこの軟骨を、クラグスブラン(Methods in Enzymology, 58:560, 1979)が説いたように、電 20 解質を加え中性pHに調節したリン酸緩衝生理食塩水(PBS)で二回洗浄し、0.2%のクロストリジウムコラゲナーゼ(ワーシントンCLS 2型、140U/mg)の溶液中で37℃でインキュベートし、一晚攪拌した。次に、この懸濁液を153mgのナイロン製ふるい(10523, N. Y. エルムフォード、テツコ社製)でろ過した。その後この細胞を遠心分離を用いて懸濁液から取りだし、PBS溶液で二回洗浄し、血球計数器で計数した。この溶液を1800rpmで遠心分離し、その細胞懸濁液の上方に浮かんだ上清を、溶液体積が1ミリリットル当り5000万細胞の軟骨細胞濃度になるまで、マイクロ・ピペットを用いて吸引して取り除いた。

【0015】

細胞は軟骨細胞を含むあらゆる組織から分離することができる。軟骨細胞の源として役立つことのできる組織には、例えば、肋骨、鼻、耳、関節、萌出していない歯から取った 30 軟骨、ヒアリン軟骨、弾性軟骨及び線維軟骨がある。最初の軟骨細胞集団を拡張させることができるため、必要なのはごく少量の組織試料である。組織は、局部麻酔をした状態で生検銃を用いれば容易かつ迅速に採集することができる。

【0016】

(自己軟骨細胞などの)軟骨細胞は、必要に応じて、試験管内で培養して、ポリマ・マトリックスの「足場」に接種することのできる軟骨細胞の数を増やしてもよい。同種異系の細胞の利用、より好ましくは自己軟骨細胞の利用が、組織拒絶反応を防ぐためには好ましい。しかしながら、免疫反応がCSMの移植後に被験体で起きないのであれば、その被験体を例えばシクロスポリン又はFK506などの免疫抑制剤で処置して、CSMの拒絶反応が起きる 40 可能性を低くしてもよい。いくつかの実施例では、キメリック細胞、又はトランスジェニック動物を由来とする細胞をポリマ・マトリックスに接種してもよい。

【0017】

接種前に細胞に遺伝物質をトランスフェクトしてもよい。有用な遺伝物質は、例えば、宿主における免疫反応を減らす又はなくすことのできる遺伝子配列であってもよい。例えば、クラス1及びクラス2の組織適合抗原などの細胞表面抗原の発現を抑制してもよい。こうすると、移植された細胞が宿主の拒絶反応を受ける可能性を低くすることができるであろう。加えて、トランスフェクションは遺伝子送達に利用してもよい。ポリマ接種の前に軟骨細胞に特定の遺伝子をトランスフェクトしてもよい。細胞-ポリマのコンストラクトは、宿主又は組織操作された新臓器の長期の生存に必要な遺伝子情報を運ぶことができる。例えば糖尿病の治療のためインシュリンを発現するよう細胞にトランスフェクト 50

してもよい。

【0018】

軟骨細胞培養液は細胞分画ステップを行なって又は行なわずに作製してもよい。軟骨細胞の分画は、例えば当業者に公知の蛍光活性化細胞ソーティングなどの技術を用いて行なうことができる。細胞分画は細胞の大きさ、DNA含有量、細胞表面抗原、及び生存率を基に行なってもよい。例えば、軟骨細胞を濃縮し、線維芽細胞などの汚染細胞を減らしてもよい。細胞分画を用いてもよいが、本発明の実施には必要ではない。

【0019】

細胞分画は、例えばドナーが癌又はその他の腫瘍の転移を軟骨に有する場合に好ましいかも知れない。軟骨細胞集団をソーティングして、正常な非癌性の軟骨細胞から悪性腫瘍細胞を分離してもよい。一つ又はそれ以上のソーティング技術により分離した正常な非癌性軟骨細胞を、その後にCSMに利用してもよい。患者の癌を治療した後に、このCSMをペニス再建術に用いてもよい。

10

【0020】

本方法において選択可能なもう一つの手法は凍結保存である。低温保存は、例えば、複数の観血的な外科的手術をする必要性を減じるために有用であろう。軟骨細胞を増幅し、増幅させた細胞の一部を用い、別の一部を凍結保存してもよい。細胞を増幅及び保存することができるため、ドナー細胞の選択に大きな柔軟性を持つことができる。例えば、組織適合ドナーを由来とする細胞を増幅し、二つ以上のレシピエントに用いてもよい。

【0021】

凍結保存の実用性のもう一つの例は、組織バンクである。ドナー細胞を組織適合性データと一緒に凍結保存してもよい。ドナー細胞を例えばドナー組織バンクに保管してもよい。CSMには組織が必要であるため、患者にとって最も組織適合性の高い細胞を選択してもよい。CSMが必要となるかもしれない疾患を持つ又は処置を受けている患者は、軟骨細胞の一集団を凍結保存してもよい。必要に応じて、後日、この凍結保存された軟骨細胞を解冻し、治療用に用いてもよい。例えば、ペニス再建術後に癌が再発した場合には、患者から培養用の組織をさらに分離する必要なく、凍結保存した細胞をペニス再建術に用いることができる。

20

【0022】

ポリマ・マトリックス材料

生体適合性材料、特に生分解性材料が本ポリマ・マトリックスの構造には好適な材料である。生体適合性のある、とは、生物学的機能に有毒又は有害な作用のない材料を言う。生分解性のある、とは、患者の体内で吸収又は分解の可能な材料を言う。生分解性のある材料の例には、例えば吸収性縫合糸がある。生分解性の構造を形成するための代表的な材料には、制御された速度で加水分解されると共に再吸収されるような、例えばコラーゲンや、ポリ(乳酸)、ポリ(グリコール酸)、ポリオルトエステル及びポリ無水物などのポリ(アルファエステル)などの、天然又は合成のポリマ、及びそれらのコポリマが含まれる。これらの材料では、分解能力、操作性、大きさ及び形状を最大限に制御できる。好適な生分解性ポリマ材料には、吸収性の合成縫合糸材料として開発されたポリグリコール酸及びポリグラクチンが含まれる。ポリグリコール酸及びポリグラクチンファイバはメーカが提供したまま用いてもよい。その他の生分解性材料には、セルロースエーテル、セルロース、セルロースエステル、弗化ポリエチレン、フェノール樹脂、ポリ-4-メチルペンテン、ポリアクリロニトリル、ポリアミド、ポリアミドイミド、ポリアクリレート、ポリベンゾキサゾール、ポリカーボネート、ポリシアノアリアルエーテル、ポリエステル、ポリエステルカーボネート、ポリエーテル、ポリエーテルエーテルケトン、ポリエーテルイミド、ポリエーテルケトン、ポリエーテルスルホン、ポリエチレン、ポリフルオロオレフィン、ポリイミド、ポリオレフィン、ポリオキサジアゾール、ポリフェニレンオキサイド、ポリフェニレンサルファイド、ポリプロピレン、ポリスチレン、ポリサルファイド、ポリスルホン、ポリテトラフルオロエチレン、ポリチオエーテル、ポリトリアゾール、ポリウレタン、ポリビニル、ポリ弗化ビニリデン、再生セルロース、シリコン、ユリア-ホルム

30

40

50

アルデヒド、又はこれらの材料のコポリマ又は物理的混合物が含まれる。当該材料を適した抗菌剤と一緒に含浸させてもよく、また可視性を高め、外科的手法の助けとなるよう着色剤で着色してもよい。

【0023】

いくつかの実施例では、基底膜成分、寒天、アガロース、ゼラチン、アラビアゴム、コラーゲン、フィブロネクチン、ラミニン、グリコサミノグリカン、これらの混合物や、細胞培養における当業者に公知の生物学的マトリックス分子に類似の性質を有するその他の材料などの化合物で当該ポリマをコーティングすることにより、ポリマに対する細胞の付着を高める。力学的及び生化学的パラメータにより、その後の成長及び増殖で細胞にとって十分な支持を当該ポリマが確実に提供するようにすることができる。栄養物質、成長因子、分化又は逆分化の誘導物質、分泌生成物、免疫修飾物質、炎症阻害剤、退行因子、リンパ網又は神経線維の内植を高める又は可能とするような生活性の化合物、及び薬剤を含む因子を、マトリックス中に取り入れても、又はマトリックスと関連させて提供してもよい。同様に、付着ペプチドRGD (Arg-Gly-Asp) などのペプチドを含むポリマを合成して、マトリックスを形成する際に用いることもできる。

10

【0024】

現在、好適な生体適合性のあるポリマはポリグラクチン及びポリグリコール酸である。ポリグラクチンはビクリルが撚り合わされた吸収性縫合糸（ニュージャージー州サマービル、エシコン社製）（Craig P. H., Williams J. A., Davis K. W., et al.: A Biological Comparison of Polyglactin 910 and Polyglycolic Acid Synthetic Absorbable Suture s. Surg. 141; 1010, (1975)）として製造された、グリコリド及びラクチドが90:10のコポリマである、吸収性の合成縫合材料として開発された。ポリグラクチン及びポリグリコール酸ファイバはメーカーが提供したままの状態で利用することができる。生体適合性のあるポリマは、例えば溶媒鑄造、圧縮成形、フィラメント引き、メッシング、リーチング、ウィーピング及びコーティングなどの方法を用いて成形してもよい。溶媒鑄造では、一つ又はそれ以上のポリマを例えば塩化メチレンなどの適した溶媒に溶かした溶液をブランチング・パターンのレリーフ構造として鑄造する。溶媒を蒸発させた後で薄膜を得る。圧縮成形では、ポリマを適したパターンに1平方インチ当り最大30,000ポンドの圧力で圧縮する。フィラメント引きは、溶融ポリマから引き出すステップを含み、メッシングはファイバをフェルト様の物質に圧縮することによりメッシュを形成するステップを含む。リーチングでは、二つの材料を含有する溶液を、マトリックスの最終形に近い形に広げる。次に、溶媒を用いて構成要素の一方を溶解させて細孔を形成する（例えばここに参考文献として編入することとするMikosの米国特許第5,514,378号を参照されたい）。核生成法では、マトリックスの形状の薄膜を放射性核分裂生成物に曝露することで、材料が放射線で損傷することによって軌跡を生じさせる。次に、ポリカーボネートのシートを酸又は塩基で食刻し、放射線で材料が損傷したことで生じた軌跡を細孔に変化させる。最終的に、レーザを用いて、数多くの材料を貫通している個々の孔を成形及び焼成して、均一な大きさの細孔を持つマトリックス構造を形成してもよい。

20

30

【0025】

コーティングとは、ポリマ構造に、例えば液化コポリマ（ポリ-DL-ラクチド、コグリコリド50:50、80mg/mlの塩化メチレン）などの材料をコーティング又は浸透させてその力学的特性を変化させることを言う。コーティングは、所望の力学的特性が達成されるまで、一層又は複数の層で行なってもよい。これらの成形技術を組み合わせて利用してもよく、例えばポリマ・マトリックスを編み、圧縮成形し、相互に接着してもよい。さらに、異なるプロセスで成形される異なるポリマ材料を相互に接合して複合形状を形成してもよい。この複合形状は層状構造でもよい。例えば、ポリマ・マトリックスを一つ又はそれ以上のポリマ・マトリックスに付着させて複数層のポリマ・マトリックス構造を形成してもよい。この付着は、例えば液体ポリマを用いた接着、ステープリング、縫合、又はこれらの方法の組合せなど、いかなる適した手段で行なってもよい。加えて、ポリマ・マトリックスを固形の塊として形成し、レーザ又はその他の標準的機械加工技術で、所望の最終

40

50

形状に成形してもよい。レーザ成形とは、レーザを用いた材料の除去加工を言う。

【0026】

ポリマは、力学的特性に付いては例えばインストロン・テスタを用いた引張り強度、ポリマ分子量についてはゲル透過クロマトグラフィ(GPC)、示差走査熱量計(DSC)によるガラス遷移温度、及び赤外(IR)分光による接着構造、毒性学的にはエームス・アッセイ及び試験管内奇形発生性アッセイを含む初期スクランニング試験、免疫抗原性、炎症、放出及び分解実験のための動物における移植実験、で特徴付けることができる。試験管内での細胞接着及び生存率は、放射性同位体を用いた走査電子顕微鏡法、組織学、及び定量評価により評価することができる。

【0027】

ある一つの好適な実施例では、本ポリマ・マトリックスをポリグリコール酸で形成し、その平均密度を1立方センチメートル当たり約58ミリグラムとする。不織布メッシュは接種前で直径15 μ m及び95%を超える多孔度になるようファイバを含んでいてもよい。ある好適な実施例では、ポリマの足場は加水分解により約6から約8週間かけて分解するよう設計する。ポリマ・マトリックスを酸化エチレンで滅菌し、使用するまで無菌条件で保管してもよい。

【0028】

ポリマ・マトリックスを移植前に(ポリマ・マトリックスに細胞を接種する前又は後に)添加剤又は薬剤で処置して、例えば移植後の新組織の形成を促進することもできる。このように、例えば成長因子、サイトカイン、細胞外マトリックス成分、及びその他の生活性物質をポリマ・マトリックスに加えて、移植片の治癒及び新組織の形成を促進してもよい。このような添加剤は、一般には、再構築又は増強しようとする組織又は臓器に基づき、確実に適切な新組織が移植を受けた臓器又は組織で形成されるよう選択されることであろう(例えば骨の治癒を促進するのに用いられるこのような添加剤の例については、例えばKirker-Head, C.A. Vet. Surg. 24 (5): 408-19 (1995)を参照されたい)。例えば、ポリマ・マトリックス(選択的に内皮細胞を接種したもの)を用いて血管組織を増強しようとする場合は、血管内皮成長因子(VEGF、例えばここに参考文献として編入することとする米国特許第5,654,273号を参照されたい)を利用して、新しい血管組織の形成を促進することができる。成長因子及びその他の添加剤(例えば表皮成長因子(EGF)、ヘパリン結合表皮様成長因子(HBGF)、線維芽細胞成長因子(FGF)、サイトカイン、遺伝子、たんぱく質、等々)を、ポリマ・マトリックスに接種された細胞が産生すると考えられるこのような成長因子(もしあれば)の量よりも過剰に添加することが、もしこの添加細胞を利用するのであれば、可能である。このような添加剤は、修復又は増強しようとする組織又は臓器にとって適した種類の新組織の形成を(例えば宿主細胞の移植片への浸潤を起させる又は加速することにより)促進するのに十分な量、提供することが好ましい。その他の有用な添加剤には抗生物質などの抗菌剤が含まれる。

【0029】

好適な支持マトリックスの一つは、細胞支持マトリックスを移植すると、短い距離にわたって栄養物質を拡散させることにより細胞生存を可能にできるような交差フィラメントから成るものである。

【0030】

ポリマ・マトリックス構造

ポリマ・マトリックスは上述したように制御された細孔構造を持たせて作製してもよい。細孔の大きさを利用して細胞の分布を決定してもよい。例えば、ポリマ・マトリックス上の細孔は、当該構造の内部に軟骨細胞が移動できるような大きさとしてもよい。

【0031】

ポリマ・マトリックスは、あらゆる数の全体的システム、幾何学的配置又は空間上の制限を満たすような軟骨様構造部材(CSM)を構築できるよう、あらゆる数の所望の形状に成形してもよい。例えば、ペニス再建用のポリマ・マトリックスを利用する際には、CSMは長寸の筒状形状であってもよい。好ましくは、寸法に付いては、長さが直径の少なくとも

10

20

30

40

50

約3倍であるとよい。本CSMは固形のロッド又は中空のロッドでもよい。中空のロッドは尿道の配置に適合するような空間を有していてもよい。尿道は天然でも、人工でも、又は操作された新尿道でもよい。一方又は両方の陰茎海綿体に置き換わるようCSMを成形してもよい。ペニス再建にCSMを利用する場合、このCSMはそれが置き換わる予定の解剖学的部分に大まかに似ていなければならない。CSMを陰茎海綿体に支持を提供する又は置き換わるよう移植する場合は、当該CSMを陰茎海綿体と同様な形状に成形してもよい。つまり、CSMを二つの長寸の筒状に成形してもよい。より本格的なペニス再建の場合には、CSMを長寸のロッドに似るように成形してもよい。両方の陰茎海綿体に置き換わるよう設計する場合には、当該CSMに、腎臓型の横断面を有する長寸の筒状形状を持たせてもよい。

【0032】

構造強度が変化しているCSMを有することも好ましい場合があるかも知れない。例えば、ペニス用インプラントの構造強度が身体から遠位では強力であり、身体に近くなるほど相対的に弱くなるようにすることも好ましいかも知れない。このようにすると、再建されたペニスは性交にとっては十分な構造強度を持ちながらも、その他の時には十分な柔軟性を維持することができよう。別の実施例では、本CSMが、身体に相対的に近位で強く、身体から遠位で相対的に弱くなっていてもよい。加えて、本CSMは両端で相対的に強く、中間で弱くかつより柔軟になっていてもよい。本CSMの圧縮及び曲げ強度は通常の作成技術を用いて変えることができる。例えば、曲げ強度は固形のCSMを厚くする又は薄くする（弱くする）ことにより増加又は減少させてもよい。同様に、中空のCSMの壁面を厚くする又は薄くすると、同様な効果が得られるであろう。長さ方向の畝、横断方向の畝、斜めの畝、八ニカム及び気泡質構造を、構造強度を変えるために用いてもよい。材料の構造強度を成形により変える方法は、力学的操作の研修を積んだ当業者であれば知るところであり、同方法をCSMの構築に取り入れてもよい。可撓性ポリマ製足場を構築するための方法の選択肢の一つは、予め形成したポリマの足場の一部又は全部を、更なる液化コポリマ、例えばポリ-DL-ラクチド-コ-グリコリド50:50（即ち50%:50%）でコーティングすることによりそれを強化する方法である。

【0033】

ペニス用プロテーゼの重要な特徴の一つは、その形状を維持するのに必要な剛性である。成人集団では、当該プロテーゼは性交が可能であるよう特定の圧力に耐えることができなければならない。本発明に基づく、操作された軟骨ロッドは十分な生体力学的パラメータを示した。行なった圧縮、引張り及び曲げ実験の結果、本軟骨ロッドは容易に弾性であり、高い圧力に耐えることができるものであることが実証された。

【0034】

本ポリマ・マトリックスは所望の最終形状、構造及び機能に応じて可撓性になるよう作製しても又は剛性になるよう作製してもよい。線維状のマトリックスを用いることの明白な利点は、移植時に当該構造を容易に再成形及び再調整できる点である。

【0035】

本ポリマ・マトリックスは、使用前にいかなる公知の方法を用いて滅菌してもよい。利用する方法はポリマ・マトリックスに用いられた材料に応じる。滅菌方法の例には蒸気、加圧蒸気、乾燥熱、放射線、酸化エチレンなどのガス、ガス及び煮沸が含まれる。

【0036】

接種

ポリラクチン370及びステアリン酸カルシウムでコーティングされた、90-10のグリコリド及びラクチドのコポリマであるポリラクチン910（ピクリル縫合材料、ニュージャージー州サマービル、エシコン社製）の撚り合わされた紐を、長さほぼ17mmの片に切断した。一端を撚り戻して直径14ミクロンの複数のファイバを露出させた。結び目を他方の端に作ってその後の生検においてポリマの配置の助けとなるようにした。二本のポリマファイバを、大きさ35mmの26ファルコン組織培養皿のそれぞれに配置した。200mlの蒸気の溶液を15ウェルのそれぞれの中にある二本のファイバ上に配して、30本のファイバを軟骨細胞を含有する前記溶液に曝露し、対照として22のポリマ

10

20

30

40

50

を軟骨細胞への曝露からは外した。次に、L-グルタミン(292 mg/cc)、ペニシリン(100 U/cc)、ストレプトマイシン(100 mg/cc)及びアスコルビン酸(5 mg/cc)を加えたハムズF-12培養培地及び10%のウシ胎児血清を含有する2 mlの溶液を各ウェルに加えた。37°Cで3、6、11、18、21及び28日インキュベートした後、各群から6本のファイバを、位相差顕微鏡を用いて軟骨細胞の存在及び形態学的外見について肉眼で調べ、その後、軟骨のムコ多糖体の強酸性の硫化物である硫酸コンドロイチンについて、ヘマトキシリン及びエオシン染色法及びアルデヒド-アルシアン・フスチン染色法を用いて組織学的に評価した。

【0037】

細胞のポリマ・マトリックスへの接種は、ここに参考文献として特に編入することとする
発行済米国特許第5,041,138号に説かれた数多くの方法で行なってよい。

10

【0038】

ペニス再建術

移植及び再建術は数多くの技術を用いて行なうことができる。簡単に説明すると、患者を背側切開位置に配置し、識別目的のためにカテーテルを尿道内に配する。縦に正中線切開を陰囊の基部から肛門に向かって行い、この切開を下に向かって球海綿体筋まで行なう。海綿体筋及び尿道を一方の側に引き込ませ、坐骨海綿体筋及び陰茎脚を識別する。同脚を識別したら、約2センチメートルの長さ、これを開放する。ヘーガル頸膨張器を用いて坐骨結節に対して近位、そして陰茎海綿体の全長にわたって遠位にある陰茎脚を膨張させる。CSMを海綿体内部に挿入する。当該プロテーゼは海綿体の壁面に対してしっかりと密着させるべきである。理想的には、大きさの異なる2、3個のCSMを提供するべきである。あるいは、外科医が患者に合うようにCSMをトリミングしてもよい。一方のプロテーゼを挿入したら、同じ手法を反対側についても行なってよい。次に、海綿体の切り込みを3-0の腸線縫合糸で閉じる。傷の残りは通常の方法で閉じる。この手法の間、CSMを例えばポリミキシン-ネオマイシンなどの抗生物質溶液で浸漬する。挿入後、傷を同じ溶液で灌注する。幅広い抗生物質を与えるが、術後も継続する。

20

【0039】

さらにCSMは全ペニス再建術にも用いることもできる。ペニス再建術のための顕微的技術が公知である(例えばJordan et al., J. Urol. 152:410-414, 1994を参照されたい)。このような技術には、まず組織片の神経を陰部大腿又は腸骨鼠径神経へ接合し、筋膜皮膚組織片の局部神経を陰茎背神経に接合し、感覚皮膚を覆うために補助的な自由組織片を用いて薄筋筋皮組織片及び副直筋筋皮組織片を用いて再建し、顔面皮前腕自由組織片を再建するという、感覚上の新形成陰茎の創出が含まれる。完全な再建術では新形成尿道を新形成陰茎と一緒に作製してもよい。また新形成尿道を別に作製し、移植前に新形成陰茎に取り付けてもよい。あるいは、新形成尿道を、二つの異なる細胞種を群集させた基のCSM構造の一部としてもよい。このように、陰茎構築全体を達成することが可能である。小型の生検標本は患者の耳及び膀胱から得ることができる。軟骨細胞及び尿路上皮細胞を別々に成長及び展開させてもよい。細胞は別々の予め形成された生分解性ポリマの足場に接種して、その後一回のステップの操作により、十分な新形成尿道を持つ陰茎を構築することもできる。

30

40

【0040】

CSMを体内のインプラントに取りかえることで、びらん及び感染などの合併症の可能性をなくすこともできる。同様のアプローチを、鎌状赤血球貧血症に続発する再発性持続勃起症を呈する患者に応用してもよい。現在可能な処置には再発性持続勃起症を防ぐという証拠がない。自己軟骨細胞から成る操作された天然プロテーゼの移植により、海綿体内のうっ血という問題を恒久的になくすことができるであろう。

【0041】

CSMのもう一つの用途は、ペーロニー病などの性器の疼痛状態の治療においてである。これらの場合の治療方法には、遺伝物質をトランスフェクトした細胞の利用を含めることができる。トランスフェクトした細胞-ポリマの足場は、送達された遺伝子を機能的に発

50

現させる臓器様構造を形成する。炎症及び線維症を調節する遺伝子を、自己軟骨細胞から成る操作されたペニス用プロテアーゼ内に送達してもよい。この遺伝子で修飾されたプロテアーゼは再発性の疾患を防ぐために、機能的発現に必要な遺伝子情報をすべて運ぶことである。

【 0 0 4 2 】

操作された細胞 - ポリマの足場は、何ら技術的な困難を伴わずに陰茎海綿体内にすっぽりと移植された。この実験で用いられたポリマの足場は6から8週間で分解するように設計されたものである。この期間の間に、接種された細胞は容易に成熟軟骨組織を生体内で形成して、分解していくポリマファイバに置き換わった。操作された軟骨は感染、炎症又はびらんの証拠は何ら無いまま、当初の移植部位にあった。組織学的には、抽出されたロッドは、陰窩内の軟骨細胞の存在及び高度に硫酸化したムコ多糖体の存在によって証左されるように、成熟軟骨の十分な形成を呈していた。

10

【 0 0 4 3 】

操作された軟骨プロテアーゼの利用は、先天性又は後天性の状態のいずれについても、ペニス再建術を行なおうとする患者に臨床的に応用することができる。さらにこの技術は、勃起不全の成人に用いてもよい。患者自身の細胞から作成した自己軟骨組織は体内に配置することが可能である。

【 0 0 4 4 】

本発明のその他の実施例及び長所を以下の説明に一部記載するが、同説明は、本記載から部分的には自明であり、また本発明の実施から学ばれるところであろう。

20

【 0 0 4 5 】

例

例 1 ポリマ・マトリックスの構築

密度が1立方センチメートル当たり約58ミリグラムのポリグリコール酸フェルトの不織布を、直径約1cm、及び長さで約2cm又は3cmの筒状ロッドに形成した。この不織布のメッシュは直径約15µmのファイバから成り、ファイバ間の距離が0-200ミクロンであり、接種前には約95%を超える多孔度であった。足場は、加水分解により約6から約8週間にわたって分解するように設計された。選択に応じ、十分な力学的特性を達成するために、この可撓性の足場を液化コポリマ(ポリ-DL-ラクチド-コ-グリコリド50:50、80mg/ml塩化メチレン)でコーティングした。ポリマの足場を酸化エチレンで滅菌して細胞接種まで無菌状態で保管した。

30

【 0 0 4 6 】

例 2 細胞培養及び接種

ヒアリン軟骨を仔ウシの肩の関節表面から得た。軟骨細胞を前に説かれた技術(Atala, A. et al., J Urol, 150: 745-747, 1993; Atala, A., et al., J 10 Urol, 152: 641-643, 1994; Klagsbrun, M. Methods Enzymol., 58:560, 1979)を用いて無菌条件下で採取した。簡単に説明すると、関節軟骨を、生後2週間のその日の午前に屠殺した仔ウシの肩から得た。この肩を濃度約10%のポビドン-イオジン(コネチカット州ノーウォーク、ベタジン・パーデュー・フレデリック社製)溶液で洗浄した後、無菌条件下で付着筋肉をその下の骨から鋭く切り離して関節表面を露出させた。この関節の関節表面から得た軟骨は、#10のメス(ニュージャージー州ルサーフォード、バード-パーカー社製)を用いてその下の骨から鋭く切除した。軟骨は、一辺当たり約5mm未満の大きさの切片に切断し、電解質を加え中性pHに調節したリン酸緩衝生理食塩水(PBS)で、二回洗浄した。次に、この軟骨を、クラグスプラン(Methods in Enzymology, Vol. VIII)が説明したように、約2%のクロストリジウムコラゲナーゼ(ワーシントンCLS2、1ミリグラム当たり約140単位)溶液中で約37°Cでインキュベートし、一晚攪拌した。次にこの懸濁液を153mgのナイロン製ふるい(10523, N.Y. エルムフォード、テツコ社製)を用いてろ過した。その後細胞を遠心分離により懸濁液から取りだし、PBS溶液で二回洗浄し、血球計数器で計数した。この溶液を約1800rpmで遠心分離し、細胞懸濁液の上方の上清を、溶液体積が1立方ミリリットル当たり5000万細胞の軟骨細胞濃度になるまで、

40

50

マイクロ・ピペットを用いて吸引して取り除いた。分離した細胞を10%のウシ胎児血清（バイオヒットカー社製）、5マイクログラム/mlのアスコルビン酸、100マイクログラム/mlのストレプトマイシン、及び100単位/mlのペニシリンを含有するハムズF-12培地（ニューヨーク州グランドアイランド、ギブコ社製）の培養液で成長及び展開させ、5%の二酸化炭素下で成長させた。軟骨細胞を最初の最終から約5から約8週間、トリプシン処理し、血球計数器を用いて計数した。予め形成した筒状のポリグリコール酸ポリマロッドに、1立方センチメートル当たり約5000万個の軟骨細胞濃度になるよう、細胞を接種した。

【0047】

例3 移植及び分析

この実験の概略を図1に示す。合計40のポリマ製足場を20匹の無胸腺マウスの皮下空間に移植した。各マウスは、対照（ポリマのみ）、及び軟骨細胞を接種したポリマの足場から成る2種類の移植部位を有した。移植から1、2、4及び6ヶ月目の時点でマウスを実験殺した。

【0048】

動物はすべて、目立った有害反応もなく実験殺まで生存した。摘出時には、細胞を接種したポリマ製足場のすべてが軟骨様構造を形成していたが、対照の足場には形成がなかった。摘出標本の肉眼検査では、当初のインプラントと大きさの点で同一（直径約1cm×長さで約3cm）の、よく形成された乳白色のロッド型固形軟骨構造の存在が示された（図2）。

【0049】

操作された軟骨ロッドが、ペニスの剛性を維持するのに必要な力学的特性を持つかどうかを判定するために、一連のストレス緩和テストを行なった。圧縮、引張り及び曲げ実験の結果、当該軟骨構造が容易に弾性であり、高い圧力に抵抗することができることを示した。圧縮実験では、摘出された軟骨ロッドが高い圧力に抵抗できることが示された（図3A）。距離で最大約3000 μ mまで各軟骨ロッドに約200 μ m/秒のランプ圧縮速度を印加した結果、約3.7kgの抵抗があった。引張り緩和実験では、摘出された軟骨ロッドがストレスに耐えることができ、また生体力学的性質を維持しながらもそれらの当初の状態に戻ることができることが実証された（図3B）。約200 μ m/秒のランプ引張り速度を各軟骨に印加すると、2.2kgの引張り強度が生じ、その結果当該ロッドが物理的に約4800 μ mまで伸長した。同じ速度で引張りを緩めると、当該軟骨ロッドは当初の状態に縮んだ。2種類の異なる速度で行なわれた曲げ実験では、操作された軟骨ロッドは耐久性、展性であり、それらの力学的性質を維持することができることが示された（図3C、D）。約500 μ m/秒及び約20,000 μ m/秒の速度で行なわれたサイクル圧縮では、操作された軟骨ロッドが、5000 μ mの所定距離で最大約3.5kgの圧力に耐えることができることが実証された。サイクル圧縮実験の緩和段階では、操作された軟骨ロッドがそれらの引張り強度を維持することができることが示された。軟骨ロッドのうちいずれも、生体力学的ストレス緩和実験の際に断裂しなかった。

【0050】

ヘマトキシリン及びエオシン、アルデヒドフスチン-アルシアン・ブルー及びトルイジン・ブルー染色を用いた組織化学的分析の結果、すべてのインプラントで成熟し、かつ良好に形成した軟骨細胞の存在が実証された。ヘマトキシリン及びエオシンによる組織学的検査では、軟骨細胞-ポリマのインプラントのすべてで成熟した、かつ良好に形成した軟骨の存在が示された。ポリマ・ファイバは、時間の進行（1、2、4及び6ヶ月）と共に次第に軟骨にとって代わられた。未分解のポリマ・ファイバが、移植後約1及び約2ヶ月の時点で観察された（図4）。しかしながら、ポリマの足場の残骸は、約6ヶ月の時点では軟骨ロッド中に存在しなかった（図5）。アルデヒドフスチン-アルシアン・ブルー及びトルイジン・ブルー染色は、軟骨細胞の分化産物である高度に硫酸化したムコ多糖体の存在を実証した（図4、5）。対照では軟骨形成の証左はなかった。

【0051】

10

20

30

40

50

例4 ウサギ軟骨細胞を用いた細胞培養及び接種

本例の概略的輪郭を図6に示す。ウサギの耳から採集した自己軟骨細胞を小型の断片(2×2mm)に切り分けた。軟骨細胞は、前に説かれた技術(Atala, A., et al., J Urol, 150: 745-747, 1993; Atala, A., et al., J Urol, 152-641-643, 1994)を用いて無菌条件下で採集した。簡単に説明すると、切り分けた軟骨断片を3%のコラゲナーゼタイプ2溶液(NI、レークウッド、ワーシントン・バイオケミカル社製)中で6から8時間、分解させた。回収した細胞をリン酸緩衝生理食塩水で洗浄し、培養皿にプレーティングした。分離した細胞を10%のウシ胎児血清(メリーランド州ウォーカースビル、バイオウイッテカー)、5µg/mlのアスコルビン酸、100µg/mlのストレプトマイシン及び100U/mlのペニシリンを含有するハムSF-12培地(ニューヨーク州グランドアイランド、ギブコ社製)の培養液中で成長させた。この細胞を、5%のCO₂の存在下で37℃でインキュベートした。十分な細胞量が得られるまで軟骨細胞を展開させた。細胞をトリプシン処理し、採集し、洗浄し、接種に向けて計数した。軟骨細胞を、予め形成したポリ-L-ラクチド酸で被膜したポリグリコール酸ポリマロッドに、濃度50×10⁶軟骨細胞/cm³になるように接種した。この細胞-ポリマ製ロッドを、接種後すぐに移植した。

10

【0052】

合計で18個の軟骨細胞-ポリマの足場を10匹のウサギの体空間に移植した。この細胞-ポリマの足場の両側内部体移植を8匹のウサギについて行なったが、残りの2匹の動物は片側移植を受け、その他の陰茎海綿体を対照としてそのままにした。移植後1及び2ヶ月、(それぞれ3匹)、及び3及び6ヶ月(それぞれ2匹)の時点で動物を実験殺した。2匹の対照動物を1ヶ月及び6ヶ月の時点で実験殺した。インプラントを摘出し、肉眼及び組織学的に分析した。ホルマリン固定し、パラフィンに埋めこんだ組織の5ミクロン切片を切断し、ヘマトキシリン及びエオシン(HandE)、アルデヒドフスチン-アルシアン・ブルー及びトルイジン・ブルーで染色した。

20

【0053】

動物はすべて、目立った合併症もないまま、実験期間中、インプラントを許容した。摘出児の肉眼検査では、1ヶ月後の海綿体内に良好に形成された乳白色の軟骨構造の存在が見られた(図7)。摘出された軟骨ロッド構造は海綿体内で当初のインプラントとほぼ同じ大きさを維持した。移植を行なわなかった海綿体は通常の見え方を示した。移植された軟骨ロッド部位のいずれにも、びらん、炎症又は感染の証左はなかった。

30

【0054】

ヘマトキシリン、及びエオシンを用いた組織学的分析の結果、すべての軟骨細胞-ポリマインプラントに、成熟し、かつ良好に形成した軟骨の存在が示された(図8)。ポリマファイバは時間の経過と共に(1、2、4及び6ヶ月)次第に軟骨に置き換えられていった。ポリマはすべて、2ヶ月で完全に分解した。アルデヒドフスチン-アルシアン・ブルー及びトルイジンブルー染色法は、軟骨細胞の分化産物である高度に硫酸化したムコ多糖体の存在を実証した(図9)。

【0055】

ポリマはすべて2ヶ月で完全に分解した。インプラント部位のいずれにも、びらん又は感染の証左はなかった。アルシアン・ブルー及びトルイジンブルー染色法を用いた組織学的分析は、摘出されたインプラント中に成熟し、かつ良好に形成した軟骨細胞が存在することを実証した。

40

【0056】

予め形成した生分解性ポリマ構造に接種された自己軟骨細胞は、ウサギ陰茎海綿体内に軟骨構造を形成することができる。このように、この技術はペニス用の自己プロテーゼの作製に有用であることが判明した。

【0057】

本発明のその他の実施例及び用途は、ここに開示した本発明の明細書及び実施例を考慮すれば当業者には明白であろう。何からの理由からここに記した米国特許及びその他の文献

50

は特に参考文献としてここに編入されたものである。明細書及び例証は、以下の請求の範囲の提示した本発明の真の範囲及び精神の単なる例であるとみなされたい。

【図面の簡単な説明】

【図 1】 実験の概略図を示す。

【図 2】 (A) は生体内移植した軟骨ロッド、(B) は良好に形成された乳白色のロッド形状の軟骨構造を示す、摘出された軟骨ロッド、(C) は摘出された軟骨ロッドの断面図を示す。

【図 3】 (A) は圧縮実験における操作された軟骨ロッドの生体力学的性質 (n=3)、(B) 引張り - 緩和実験 (n=3)、(C) は曲げ - 圧縮緩和実験 (n=3)、及び (D) は 20,000 $\mu\text{m}/\text{秒}$ の速度で連続 5 サイクル行なった曲げ - 圧縮緩和実験 (n=3) を示す。

10

【図 4】 陰窩に閉じ込められた軟骨細胞と、ヘマトキシリン及びエオシンで見た、400 倍から縮小した、分解していないポリマファイバの存在 (A) と、トルイジン・ブルー染色した高度に硫酸化したムコ多糖体の存在 (B) とを示す、2ヶ月目で摘出された軟骨ロッド標本を示す。

【図 5】 ヘマトキシリン及びエオシンで見た、軟骨により置換された、完全に分解したポリマファイバ (A) と、アルデヒドフスチン - アルシアン・ブルー染色したもの (B) (400倍から縮小) とを示す6ヶ月の時点で摘出した軟骨ロッド標本を示す。

【図 6】 自己軟骨細胞をウサギの耳から分離し、展開させ、予め形成したポリマロッドに接種する実験の概略図を示す。細胞 - ポリマの足場を体内移植する。標本は移植後 1、2、3 及び 6 ヶ月の時点で分析に向けて摘出する。

20

【図 7】 パネル (A) は移植後1ヶ月の時点で対照ウサギから摘出した性器で、海綿体の一つに軟骨形成があることを示し、対照の海綿体は正常な外見を呈し、パネル (B) は移植後1ヶ月の時点で摘出した軟骨ロッドを示す。

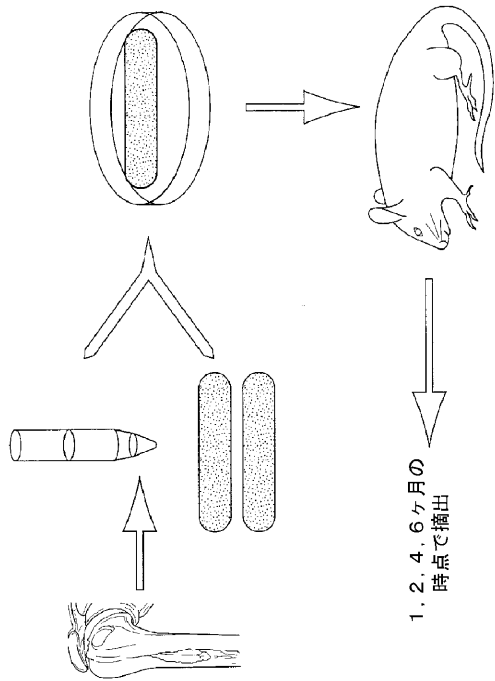
【図 8】 3ヶ月の時点で摘出した軟骨ロッド標本を示す。パネル (A) は軟骨組織が両方の海綿体 (C) ないに形成したことを示すHandEは25倍から縮小。パネル (B) は陰窩内に閉じ込められた成熟軟骨細胞が白膜 (T) に隣接して見られることを示す。HandEは250倍から縮小。

【図 9】 高度に硫酸化したムコ多糖体が移植後6ヶ月の時点で検出されることを示す。パネル (A) は250倍から縮小した、トルイジン・ブルー染色を示す。パネル (B) は、250倍から縮小したアルデヒド・フスチン - アルシアン・ブルー染色を示す。

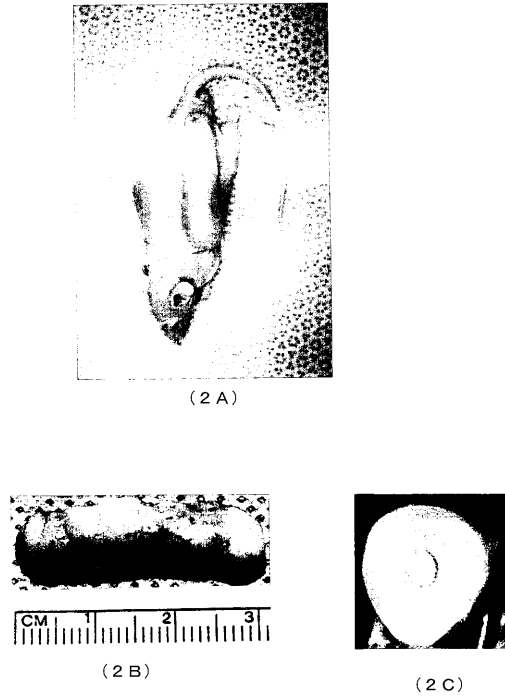
30

本特許のファイルは少なくとも一枚のカラー図面を含む。カラー図面を有する本特許の写しは、申請及び必要な料金を支払った上で特許商標庁から提供されよう。

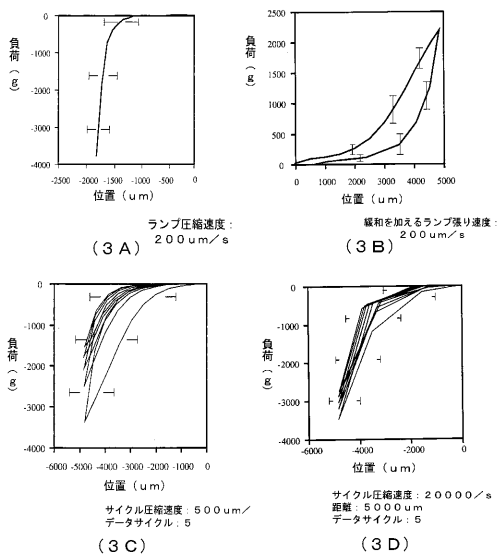
【図1】



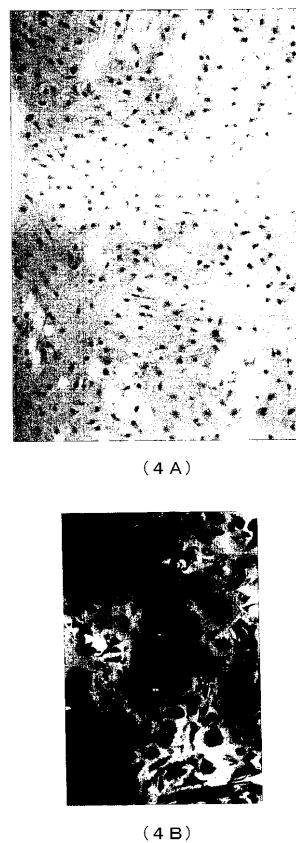
【図2】



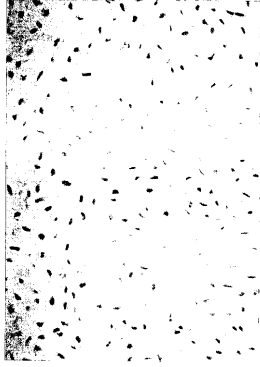
【図3】



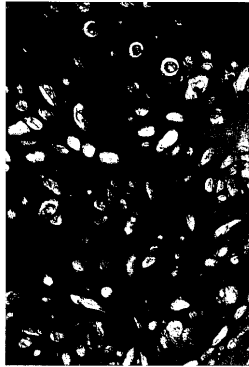
【図4】



【 図 5 】



(5 A)

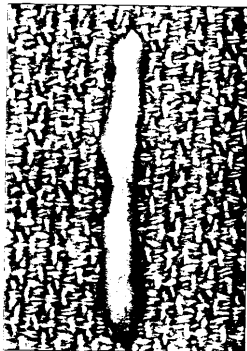


(5 B)

【 図 7 】

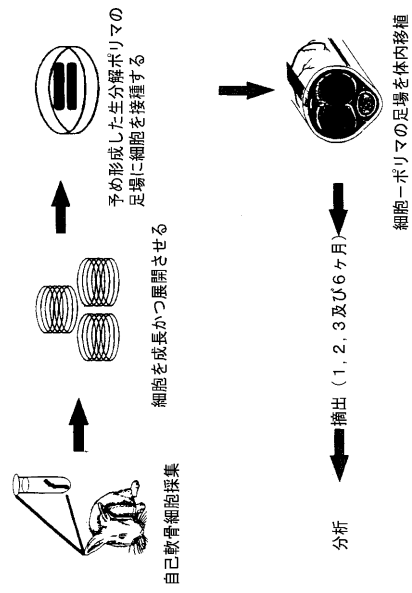


(7 A)



(7 B)

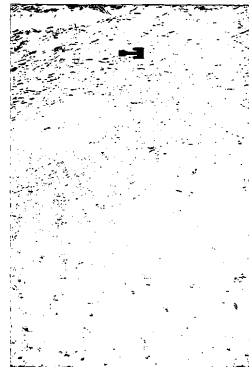
【 図 6 】



【 図 8 】



(8 A)



(8 B)

【 図 9 】



(9A)



(9B)

フロントページの続き

- (74)代理人 100130845
弁理士 渡邊 伸一
- (74)代理人 100142929
弁理士 井上 隆一
- (74)代理人 100096987
弁理士 金久保 勉
- (72)発明者 アタラ アンソニー
アメリカ合衆国 0 2 1 9 3 マサチューセッツ州
ロード、74 ウェストン、ウェスタリー
- (72)発明者 ユウ ジェイムス ジェイ.
アメリカ合衆国 0 2 4 4 5 マサチューセッツ州
トンテラス 2 ブルックリン、6 ウェリン

審査官 芦原 康裕

- (56)参考文献 特表平10-510736(JP,A)
特公平06-006155(JP,B2)
国際公開第94/025079(WO,A1)
特開平02-114959(JP,A)
特開昭63-177853(JP,A)
実開平06-080411(JP,U)

- (58)調査した分野(Int.Cl., DB名)
A61F 2/26