

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2016-522000

(P2016-522000A)

(43) 公表日 平成28年7月28日(2016.7.28)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
A 6 1 L 27/00 (2006.01)	A 6 1 L 27/00 V	4 C 0 8 1
A 6 1 K 35/30 (2015.01)	A 6 1 K 35/30	4 C 0 8 7
A 6 1 K 35/32 (2015.01)	A 6 1 K 35/32	4 C 0 9 7
A 6 1 K 35/38 (2015.01)	A 6 1 K 35/38	4 H 0 1 1
A 6 1 K 35/44 (2015.01)	A 6 1 K 35/44	

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 24 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2016-503443 (P2016-503443)	(71) 出願人	507371168 ユニバーシティ オブ フロリダ リサーチ ファンデーション インコーポレーテ ィッド アメリカ合衆国 フロリダ州 ゲーンズビ ル グリントー ホール 2 2 3
(86) (22) 出願日	平成26年3月17日 (2014. 3. 17)	(74) 代理人	100102978 弁理士 清水 初志
(85) 翻訳文提出日	平成27年10月22日 (2015. 10. 22)	(74) 代理人	100102118 弁理士 春名 雅夫
(86) 国際出願番号	PCT/US2014/030688	(74) 代理人	100160923 弁理士 山口 裕孝
(87) 国際公開番号	W02014/145854	(74) 代理人	100119507 弁理士 刑部 俊
(87) 国際公開日	平成26年9月18日 (2014. 9. 18)		
(31) 優先権主張番号	61/794, 012		
(32) 優先日	平成25年3月15日 (2013. 3. 15)		
(33) 優先権主張国	米国 (US)		

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 組織移植片の脱細胞化方法

(57) 【要約】

本発明は、レシピエントと免疫的に適合した天然の無細胞置換組織を作製するために組織を処理するための材料および方法に関する。本発明によれば、採取した組織を、両性界面活性剤のみが使用された（例えば、陰イオン性界面活性剤が除外された）洗浄溶液に供する。両性界面活性剤による抽出後、組織をバッファー系で洗浄し、細胞成分および界面活性剤の除去を促進する。一つの態様において、本発明は、軸索再生を支持し、軸索を遠位神経末端に向けて誘導し、および/または免疫学的に寛容な、神経移植片である置換組織に関する。好ましくは、神経移植片は、必須の細胞外マトリックス骨格ならびに該神経移植片を介した神経再生を促進する生物学的成分を保持する。

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

組織移植片を、両性界面活性剤を含む抽出組成物と、該組織中の細胞を破碎するのに十分な濃度でおよび接触時間の間、接触させる工程を含み、陰イオン性界面活性剤の非存在下で行われる、組織移植片を脱細胞化するための方法。

【請求項 2】

脱細胞化後、細胞外マトリックスの構造が完全なままであり、保存状態が、陰イオン性界面活性剤を含む方法で脱細胞化した場合と測定可能に同等であるかまたはそれより良好である、請求項1記載の方法。

【請求項 3】

陰イオン性界面活性剤が組織に適用されない、請求項1記載の方法。

【請求項 4】

Triton X-200 (商標) が組織に適用されない、請求項1記載の方法。

【請求項 5】

組織移植片を、スルホベタイン-10 (SB-10) および/またはスルホベタイン-16 (SB-16) と接触させる、請求項1記載の方法。

【請求項 6】

組織移植片を、SB-10からなる界面活性剤成分を有する一つの抽出組成物と接触させ、該組織移植片を、SB-16からなる界面活性剤成分を有する第2の抽出組成物とも接触させる、請求項5記載の方法。

【請求項 7】

両性界面活性剤の濃度が、少なくとも臨界ミセル濃度である、請求項1記載の方法。

【請求項 8】

抽出組成物が、生理学的塩分濃度またはそれを超える塩分濃度を有する、請求項1記載の方法。

【請求項 9】

生理学的塩分濃度未満の塩分濃度を有する溶液と組織を接触させる工程を含む少なくとも一つの洗浄工程をさらに含む、請求項1記載の方法。

【請求項 10】

洗浄溶液が塩分を含まない、請求項9記載の方法。

【請求項 11】

組織から非構造的な残骸を物理的に除去する工程をさらに含む、請求項1記載の方法。

【請求項 12】

脱細胞化工程の前または後のいずれかに組織移植片を冷凍する工程をさらに含む、請求項1記載の方法。

【請求項 13】

神経、骨、腸管、血管、靭帯、腱、および心臓移植片から選択される組織移植片を作製するために使用される、請求項1記載の方法。

【請求項 14】

神経移植片を作製するために使用される、請求項13記載の方法。

【請求項 15】

神経移植片を作製するために使用される組織が、神経、筋肉、胎盤、および血管組織から選択される、請求項14記載の方法。

【請求項 16】

一つまたは複数の生理活性分子または細胞を組織移植片に導入する工程をさらに含む、請求項1記載の方法。

【請求項 17】

脱細胞化後の組織移植片の神経突起促進活性が、バッファー洗浄のみで処理した神経と比較して、保持されている、請求項1記載の方法。

【請求項 18】

10

20

30

40

50

脱細胞化後、組織移植片の神経突起促進活性が保持されており、保存状態が、陰イオン性界面活性剤を含む方法で脱細胞化した場合と測定可能に同等であるかまたはそれより良好である、請求項1記載の方法。

【請求項19】

請求項1記載の方法により作製された組織移植片。

【請求項20】

請求項19記載の組織移植片を含むキット。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

10

関連出願の相互参照

本出願は、全体が参照として本明細書に組み入れられる、2013年3月15日出願の米国仮出願第61/794,012号の恩典を主張する。

【背景技術】

【0002】

発明の背景

生物医学工学は、治療の促進に用いることができる組織の開発において多くの課題に直面している。例えば、「置換」組織は、組織の再生を促進すべきである。その際、新たな組織は、近傍の細胞が置換を受容するようにレシピエントと適合していなければならない。重要なことは、置換組織は、生体系に「外来物 (foreign body)」を加えたことにより通常引き起こされる免疫学的反応を克服 (または回避) すべきことである。

20

【0003】

さらに、置換組織は、置換しようとする組織の性質および機能を呈しているべきである。例えば、置換組織は、元の組織と似た機械的および構造的性質を示すか、または最低でも、元来の環境に干渉すべきでない。置換組織は、細胞再生を促進するための足場として働くか、またはそのための生物学的性質を維持してもよい。最後に、置換組織は、組織再生を制限するかまたは下層の組織の自然な機能を阻害する瘢痕形成を、刺激すべきではない。

【0004】

組織工学の一つの特定の困難な態様は、切断された神経の再生を助けるのに使用することができる神経移植片の作製である。直接神経修復において、切断された神経の末端が (介在する移植片無しに) 再結合される場合、軸索は近位神経から遠位神経へと再成長しようとする。この状況において、神経損傷後、遠位神経は、非機能的遠位軸索やそのミエリン鞘を含む神経因子が崩壊し除去されることを伴うワーラーの変性として知られる過程を経る。この過程が一部理由となり、軸索およびミエリンの残骸は、神経再生を縮小し軸索成長の機械的障壁となりうる成長阻害効果を有すると長い間考えられてきた。

30

【0005】

ワーラーの変性の過程が遅れると、神経再生が遅くなることを、多くの証拠が示している。したがって、神経因子を除去することにより遠位神経における軸索成長が改善すると広く受け入れられている。この前提は神経移植にも当てはめられ、軸索成長を促進するためには神経移植片からも細胞の残骸を除去しなければならないとの考えを助長している。細胞物質残渣の除去は、組織内の病原体をできる限り少なくし、移植片免疫拒絶をもたらす可能性がある免疫原物質を排除するためにも必要であると考えられている。その結果、神経移植片に使用する処理方法は、再生過程を支持する細胞外マトリックス (ECM) 構造や神経移植片の完全性を破壊するという犠牲があっても、嚴重な脱細胞化技術を伴うのが通常であった。

40

【0006】

神経が損傷すると、直接修復に必要なきれいな末端が失われたり、神経組織の損傷により生じる隙間ができることが多い。この場合、神経修復には、欠損部を架橋して神経の連続性を復元する介在移植片が必要となる。

50

【0007】

例えば、米国特許第7,402,319号（特許文献1）（全体が参照として本明細書に組み入れられる）には、神経の連続性を復元することができ、適切な状況下において、神経再生を誘導することができる、無細胞神経同種移植片が記載されている。この種の神経移植片は、神経組織を脱細胞化するために使用される、スルホベタインおよび陰イオン性界面活性剤（例えばTriton X-200）を有するいくつかの系列の溶液に、神経組織を浸すことにより得られる。

【0008】

Hudsonらは、Triton X-200（商標）、スルホベタイン-16、およびスルホベタイン-10を含む脱細胞化技術をラット神経に応用し、非常に高い抽出レベルを報告した（Hudson TW, Liu SY, Schmidt CE. *Tissue Eng.* 10: 1346-58, 2004（非特許文献1））。しかし、齧歯類の神経は単一の神経束（小束（fascicle））を含み、齧歯類神経の外神経鞘は、より大型の動物の神経とはほとんど似ていない。より大型の動物（例えばウサギ、ヒト）の神経の多くは、膠原性の内神経上膜（神経束を覆う結合組織）に埋め込まれた複数の神経束を有する。ヒト神経の鞘および束内構造は展開的（expansive）であり、神経の完全性および透過性（組織抽出に影響を与える性質を含む）に対して、非常に大きな影響を与える。したがって、齧歯類神経の脱細胞化および抽出についての知識は、より大型の動物の神経に適用した場合に予期される抽出をせいぜい示唆する程度のものである。

【0009】

まとめると、組織置換物は、特に神経組織について、依然として改良が必要とされている。改良した組織置換物は、置換しようとする組織の本来の構造的および生理活性特性、例えばラミニン活性などを維持するべきであり、迅速な再生を促進するために必要な場合は生理活性化合物または分子を組み込むことができるべきであり、組織の可動性および完全性を低減しうる瘢痕を生じることなく組織修復および再生を刺激するべきである。

【先行技術文献】

【特許文献】

【0010】

【特許文献1】米国特許第7,402,319号

【非特許文献】

【0011】

【非特許文献1】Hudson TW, Liu SY, Schmidt CE. *Tissue Eng.* 10: 1346-58, 2004

【発明の概要】

【0012】

発明の簡単な概要

本発明は、本来の構造および完全性ならびに再生の改善に必要な生物学的性質を保持する組織移植片を作製するための新規方法および組成物を提供する。

【0013】

本発明の組織移植片は、単純な調製工程で得ることができる天然の置換組織または移植片を提供する。本発明の方法は、具体的には、免疫原性のある細胞成分を、天然の細胞外構造を著しく変化させることなく破碎する。有利なことに、当該組織は、細胞再生を当該移植片を介して促進するための生物学的性質を保持する。本来の細胞外マトリックス（ECM）構造は保存されており、具体的には、神経移植片の場合、基底膜および神経内膜/内皮層は、天然の、おおむね元の構造を保持する。

【0014】

したがって、一つの態様において、本発明は軸索再生を支持し、軸索を遠位神経端へと誘導し、かつ免疫学的に寛容である、神経移植片を提供する。無細胞神経移植片は、例えば、同系移植片、自己移植片、同種移植片、または異種移植片であってよい。

【0015】

一つの態様において、本発明は以下の工程を含む組織置換物を作製する方法を提供する：少なくとも一つの両性界面活性剤を含む溶液中で、いかなるイオン性界面活性剤（いか

10

20

30

40

50

なる陰イオン性界面活性剤を含む)の非存在下で、置換組織を洗浄する工程、および次に、置換組織を一連の緩衝化塩溶液中で洗浄し、過剰な両性界面活性剤を除去する工程。この方法は、現行技術の方法よりも単純で費用がかからず、より良好な取扱特性および良好な再生促進特性を有する置換組織をもたらす。

【0016】

特定の態様において、本発明に従い使用される両性界面活性剤は、スルホベタイン-10 (SB-10) および/またはスルホベタイン-16 (SB-16) である。

【0017】

本発明は、脱細胞化した置換組織も提供する。一つの態様において、置換組織は、レシピエントへの送達のため、縫合糸、管、シート、フィルム、または足場 (scaffold) の一部分を形成してもよい。好ましくは、置換組織は、再生を促進し、かつ/またはレシピエントへの移植後の免疫反応を惹起しない、生物学的成分を保持する。

10

【0018】

別の態様において、本発明は脱細胞化した置換組織を含む、組織置換用のキットを提供する。該キットは、本発明の置換組織を再懸濁するのに有用な一つまたは複数の溶液、例えば、薬理的に許容される緩衝化無菌塩類溶液、を含んでもよい。さらに、該キットは、組織再生を促進するために添加されうる細胞またはその他の活性剤 (例えば、シュワン細胞および/またはサイトカイン) を含む溶液のバイアルを含んでもよい。該キットはさらに、無細胞置換組織に関する詳細な指示を使用者に提供する指示書または冊子を含んでもよい。

20

【0019】

特定の態様において、本発明は軸索再生を支持し、遠位神経端へ軸索を誘導し、かつ免疫学的に寛容な、移植片を提供する。一例において、移植片は神経移植片である。移植片は、脱細胞化の前に冷凍した後、使用のために冷凍状態で保存・保管する。別の態様は、冷凍保存を要しない特定の用途に神経移植片が調製される場合であって、その場合は、使用前に移植片を保存する溶液 (例えば、一つまたは複数の保存剤および/または抗細菌剤を含む) に応じて、温度をより低くしても高くしてもよい。

【0020】

一つの態様において、再生を支持する移植片は、移植片移植に対するレシピエント免疫反応の下方制御を補助する一つまたは複数の材料を含んでもよい。例えば、本発明の移植片は、CD4⁺ T細胞媒介性免疫反応を減弱させた移植片移植を促進する、ホルボールエステルホルボールミリストアセテート (PMA) を含んでもよい。

30

【図面の簡単な説明】

【0021】

【図1】ウサギ神経組織 (対照; パネルA)、Hudsonらに教示される手法に従って処理したウサギ神経組織 (DC2; パネルB)、および本発明の方法に従って処理したウサギ神経組織 (DC3; パネルC) のヘマトキシリン-エオシン染色。

【図2】ウサギ神経組織 (対照; パネルA)、Hudsonらに教示される手法に従って処理したウサギ神経組織 (DC2; パネルB)、および本発明の方法に従って処理したウサギ神経組織 (DC3; パネルC) のヘキスト染色。

40

【図3】ウサギ神経組織 (対照; パネルA)、Hudsonらに教示される手法に従って処理したウサギ神経組織 (DC2; パネルB)、および本発明の方法に従って処理したウサギ神経組織 (DC3; パネルC) のS-100免疫染色。

【図4】ウサギ神経組織 (対照; パネルA)、Hudsonらに教示される手法に従って処理したウサギ神経組織 (DC2; パネルB)、および本発明の方法に従って処理したウサギ神経組織 (DC3; パネルC) のスタンブラック染色。

【図5】ウサギ神経組織 (対照; パネルA)、Hudsonらに教示される手法に従って処理したウサギ神経組織 (DC2; パネルB)、および本発明の方法に従って処理したウサギ神経組織 (DC3; パネルC) のNAP-4神経フィラメント染色。

【図6】ウサギ神経組織 (対照; パネルA)、Hudsonらに教示される手法に従って処理し

50

たウサギ神経組織 (DC2; パネルB)、および本発明の方法に従って処理したウサギ神経組織 (DC3; パネルC) のラミニン免疫染色。

【図7】ヒト神経組織 (対照; パネルA)、Hudsonらに教示される手法に従って処理したヒト神経組織 (DC2; パネルB)、および本発明の方法に従って処理したヒト神経組織 (DC3; パネルC) のヘマトキシリン-エオシン染色。

【図8】ヒト神経組織 (対照; パネルA)、Hudsonらに教示される手法に従って処理したヒト神経組織 (DC2; パネルB)、および本発明の方法に従って処理したヒト神経組織 (DC3; パネルC) のヘキスト染色。

【図9】ヒト神経組織 (対照; パネルA)、Hudsonらに教示される手法に従って処理したヒト神経組織 (DC2; パネルB)、および本発明の方法に従って処理したヒト神経組織 (DC3; パネルC) のS-100免疫染色。

【図10】ヒト神経組織 (対照; パネルA)、Hudsonらに教示される手法に従って処理したヒト神経組織 (DC2; パネルB)、および本発明の方法に従って処理したヒト神経組織 (DC3; パネルC) のスタンブラック染色。

【図11】ヒト神経組織 (対照; パネルA)、Hudsonらに教示される手法に従って処理したヒト神経組織 (DC2; パネルB)、および本発明の方法に従って処理したヒト神経組織 (DC3; パネルC) のNAP-4神経フィラメント染色。

【図12】ウサギ神経組織 (対照; パネルA)、Hudsonらに教示される手法に従って処理したウサギ神経組織 (DC2; パネルB)、および本発明の方法に従って処理したウサギ神経組織 (DC3; パネルC) のラミニン免疫染色。

【図13】図13Aは、(A) バッファーのみ、および (B) Hudsonらにより記載された界面活性剤脱細胞化 (スルホベタイン-10、スルホベタイン-16、およびTriton X-200 (商標)) によって脱細胞化したラット神経移植片の凍結培養 (cryoculture) アッセイである。神経を長軸上で凍結切断し、カバーガラスに載せた。分離させたニューロンを組織切片上に蒔き、24時間培養した。凍結培養物を固定し、被検ニューロンを免疫染色した。バッファーのみの条件においては長い軸索成長が観察されたが、嚴重な界面活性剤脱細胞化によって神経組織片の成長促進活性は実質的に除去された。図13Bは、神経移植片の神経突起促進活性に対するTriton X-200 (商標) の影響。神経移植片試料を、Triton X-200 (商標) を用いておよび用いずに、Hudsonらの方法によって脱細胞化した。神経を長軸上で凍結切断し、カバーガラスに載せた。分離させたニューロンを組織切片上に蒔き、24時間培養した。神経突起の長さをデジタル画像解析でスコア化した。データは、2回の個別の実験における、4組織片に由来する500個を超える軸索の平均 (\pm SE) スコアを表す。

【図14】精製したラミニンの神経突起促進活性に対する個々の界面活性剤の影響。精製したラミニン1を以下の個々の界面活性剤と混合した: 対照 (バッファーのみ)、スルホベタイン-10 (125 mM)、スルホベタイン-16 (0.6 mM) およびTriton X-200 (0.14%)。混合物を十分に透析した後、組織培養ウェルに添加し、分離させたニューロンを蒔く基層を形成した。24時間培養後、神経突起の長さを測定した。データは、4回の個別の実験において二つ組で行った希釈系列から得た平均スコアより計算した比活性 (ED50) を表す。

【図15】ウサギ神経同種移植片モデルにおける神経再生の成功。ウサギ腓骨神経における0.5 cmの隙間を、本発明の方法により処理した1.2 cmの神経移植片で修復した。4週間後、移植片を検査した。A) ヘマトキシリン-エオシン染色により、優れた移植片の完全性およびレシピエント神経への組み込みが示された。移植片内の血管再生および細胞浸潤は明らかである。24のレシピエントのうちいずれにも炎症または移植片拒絶の兆候は見られなかった。B) α -チューブリンIII免疫標識 (軸索に特異的) により、移植片全体で十分な軸索再生が起きていることが明らかとなった。C) S100免疫標識により、レシピエント組織の多数のシュワン細胞が、再成長している軸索と密接して移植片に浸潤していることが明らかとなり、機能的な神経再生が起きていることが示された。

【図16】非常に長い神経同種移植片を介した再生の成功。ウサギ腓骨神経における5 cmの隙間を、本発明の方法により処理した7 cmの神経移植片で修復した。26週間後、移植片を検査した。A) ヘマトキシリン-エオシン染色により、優れた移植片の完全性およびレシ

10

20

30

40

50

ピエント神経への組み込みが示された。移植片内の血管再生および細胞浸潤は明らかである。10のレシピエントのうちいずれにも炎症または移植片拒絶の兆候は見られなかった。NAP-4神経フィラメント免疫標識（軸索に特異的）により、移植片全体で十分な軸索再生が起きていることが明らかとなった。C) S100免疫標識により、レシピエント組織の多数のシュワン細胞が、再成長している軸索と密接して移植片に浸潤していることが明らかとなり、機能的な神経再生が起きていることが示された。D) 移植片より遠位側のレシピエント神経において、多くの神経フィラメント免疫陽性軸索が確認され、神経再生が7 cmの移植片を通り抜け標的組織へと遠位側に進行することに成功したことを示した。

【発明を実施するための形態】

【0022】

10

発明の詳細な開示

本明細書において使用される用語は、本発明に関連する分野の当業者によって通常理解される意味を有する。「一つの(a)」、「一つの(an)」、および「その(the)」などの用語は、単数のもののみを指すことを意図しておらず、説明に使用されうる特定の例の一般的なクラスを含む。本明細書における用語は、本発明の特定の態様を記載するために使用されるが、特許請求の範囲において概略される部分を除き、それらの使用によって本発明が限定されることはない。本明細書で使用される全ての科学技術用語は、他に定義のない限り、本発明が属する技術分野の当業者に通常理解されるのと同じ意味を有する。

【0023】

一つの態様において、本発明は、細胞外構造ならびに末梢神経組織の生物学的特性を保持する神経同種移植片を提供する。該同種移植片は、改善した専用の(exclusive)脱細胞化処理を介して作製される。脱細胞化手法は、神経組織から細胞膜を溶解することにより、同種移植片拒絶をもたらす抗原を除去する。

20

【0024】

本発明はさらに、免疫学的に寛容であり、かつ天然の組織の固有の構造および構成を保持する、天然組織ベースの移植片を作製する方法を提供する。本明細書で使用される「置換組織」という用語は、ドナー動物(生体または死体)から摘出した組織であって、本発明に従って処理した組織を記載するために使用される。

【0025】

本発明における移植片の用途は以下が含まれるが、これらに限定されない: 1) おおむね非免疫原性である生体適合性生物材料として、2) 組織およびレシピエント特異的な組織再生を促進する因子のための、構造的基盤として、3) 置換組織構造に対するレシピエントの反応を調べるための研究ツールとして。本発明はまた、処理可能な、生物学的な、生理活性のある、かつ/または生分解性の特徴を有する、おおむね無細胞の組織である置換組織も提供する。

30

【0026】

本発明によると、従来の懸念に反して、組織移植片中の大部分の残余細胞成分は問題とならないことが分かった; 生着後、宿主細胞が最終的にそれらを取り除く。拒絶を引き起こしうる残余MHC分子でさえ、問題ではない。有意な免疫反応を引き起こすには、MHC成分は細胞膜において密接な複合体として保持されていなければならない。細胞膜およびMHC複合体は、本発明による穏和な(非イオン性および両性)界面活性剤により容易に可溶化されるので、これらの懸念は軽減される。

40

【0027】

従来の脱細胞化技術は、強烈な薬剤や強力な陰イオン性界面活性剤を必要とする。本発明によると、驚くべきかつ有利なことに、徹底的な細胞抽出は、生着過程にとって有益ではなく、実際には有害であることが判明した。むしろ、穏やかな抽出の方が、組織同種移植片を免疫適合性とするのに十分であり、かつ組織修復の促進に必要な移植片ECMを保存するのに有益である。

【0028】

残念なことに、神経組織をイオン性界面活性剤(Triton X-200(商標)など)で洗浄す

50

ると、ラミニン活性が低下することが示されている。ラミニンは、細胞の分化、遊走、接着に影響を与えることにより、組織再生にとって重要である、基底膜における主要タンパク質である。例えば、ラミニンは、神経軸索が伝って成長する主要な基材である。

【0029】

従って、本発明によると、必須の固有な生物活性を変性することなく、細胞因子を十分に分散し、組織移植片を簡便に免疫適合性とするには、穏和な界面活性剤で十分である。

【0030】

定義

本発明で使用される、「無細胞」という用語は、生細胞のない組織を指す。

【0031】

「脱細胞」という用語は、細胞を崩壊させ、細胞物質を抽出した組織を指す。細胞除去の程度は、組織の正確な起源、細胞を抽出するのに使用した方法、および細胞除去の必要性に依存する。細胞除去により、広範囲の抽出を本発明とともに使用してもよい。細胞除去の量は、ごくわずかからほぼ100%までの範囲となりうる。細胞の崩壊および/または抽出を達成することで、非自己組織源または組織適合性が一致しない組織源を使用した場合に、移植片が免疫学的に寛容になる。同種移植は、異種移植と比べて、レシピエントによる免疫拒絶の懸念を減少させるには少ない組織抽出で済む。したがって、両性界面活性剤とのより長い接触時間が示される。

【0032】

本明細書で使用される「移植片」という用語は、ドナーに由来する、レシピエントへの移植のための生物学的材料を指す。移植片は、死体由来か生体ドナー由来かを問わず、ヒトを含む任意の動物源に由来してよい。ドナーは好ましくは哺乳類である。

【0033】

「哺乳類」という用語は、ヒト、家畜動物、および動物園、スポーツ用、またはペット動物、例えばイヌ、ウマ、ネコ、ブタ、およびウシなどの、哺乳類に分類される任意の動物レシピエントを指す。

【0034】

組織移植片の脱細胞化方法

本発明に従い使用する組織は、当業者に周知の標準的な技術を使用して採取することができる。好ましい態様において、例えば神経組織であってもよい組織は、採取した後に冷凍される。

【0035】

好ましい態様においては、塩および緩衝化溶液中の少なくとも一つの界面活性剤が、本発明の方法において使用される。界面活性剤成分は、好ましくは、少なくとも一つの両性界面活性剤を含み、いかなる有意な量のイオン性界面活性剤（陰イオン性界面活性剤など）の使用も除外する。好ましい態様において、当該方法はTriton X-200（商標）を使用しない。

【0036】

本発明において使用する界面活性剤は、特に組織内部の細胞を破碎するが、細胞外構造または構造タンパク質（例えば、細胞外マトリックスおよび/またはラミニンを含むもの）を崩壊させないものである。細胞の残骸は、例えば、緩衝化溶液中での洗浄および/または脂肪などの非構造的残骸の物理的除去により、本明細書に記載されるとおりに除去してもよい。処理していない組織移植片と比較して、本発明の置換組織は、表面の細胞抗原が崩壊または除去されているため、有意に低減した免疫反応を惹起する。

【0037】

特定の態様においては、神経組織を取得し、少なくとも一つの両性界面活性剤を含む洗浄溶液に供する。本出願で使用される用語「界面活性剤（detergent）」は、用語「界面活性剤（surfactant）」と交換可能に使用される。

【0038】

両性界面活性剤は、酸としても塩基としても反応しうる分子（またはイオン）を含むも

10

20

30

40

50

のとして幅広く記載されうる。両性界面活性剤は、プロトン (H^+) を供与することも受容することもできる両性分子を含みうる。これらは、pHの変化に大きく影響を受ける。pH値が8以上では、陰イオン性界面活性剤のようにふるまう。pHが8から6の間では、非イオン性界面活性剤のようにふるまう。pHが4未満では陽イオン性界面活性剤のようにふるまう。高いpHでは、界面活性力が増大し、低いpHでは、界面活性力が減弱する。好ましい態様においては、pH6~8で両性の界面活性剤と組織を接触させる。特定の態様においては、組織と両性界面活性剤との接触は、から8の間のpHで行われる。

【0039】

これらの界面活性剤の両性クラスおよび種のリストは、1975年12月30日にLaughlinおよびHeuringに発行された米国特許第3,929,678号に記載されている。さらなる例は、「Surface Active Agents and Detergents」(Vol. I および II、Schwartz, Perry およびBerchによる)に記載されている。

10

【0040】

両性イオン性界面活性剤は、両性電解質を含む、両性界面活性剤のサブセットである。通常、両性イオン性界面活性剤は、分子内の様々な位置に正および負の電荷（注：双極子ではない）を有する中性分子を含む。両性イオン分子は、一般に、該分子の等電域においておよそ同程度イオン化する陽イオン基および陰イオン基を含み、正負の電荷中心間で強力な「分子内塩」引力を発生しうる。ペタインおよびスルタイン界面活性剤は、本明細書で使用される例示的な両性イオン性界面活性剤である。一つの態様においては、使用する界面活性剤は両性イオン性界面活性剤ではない。

20

【0041】

組織脱細胞化スキームで使用される界面活性剤（両性スルホペタインおよび陰イオン性Triton X-200（商標）を含む）の濃度は、それらの「臨界ミセル濃度」に基づく。この濃度は、文献または製造者の仕様書に説明されており、界面活性効果を得るための最小要件である。本発明の特有のバッファー原理は、より大きいミセルの方がより良好に抽出するということである。塩分濃度が高くなるとミセルサイズが増大する。

【0042】

したがって、例えば、好ましくは生理学的塩分濃度またはそれ以上の濃度を有する、本発明の抽出バッファー（Extraction Buffer）においては、大きなミセルが形成する。これらの大きなミセルは細胞成分を可溶化するために有利である。好ましい態様において、界面活性剤の濃度は、臨界ミセル濃度またはそれ以上の濃度である。

30

【0043】

張度/塩分/浸透圧が低い（生理学的塩分濃度未満）または無い洗浄バッファー（Rinse Buffer）においては、より小さいミセルが形成する。本発明によると、小さいミセルの方が、組織から拡散するのに有利であり、低い張度/塩分/浸透圧での洗浄（高塩分濃度での洗浄後）は外向きの流れを生み、抽出を助ける。

【0044】

本発明の好ましい態様において、高濃度のNaClを有する溶液での一回または複数回の初期洗浄は、大きなミセルをもたらすことにより可溶性を維持し、抽出を促進する。その後のより低いNaCl濃度を有する溶液での洗浄は、ミセルサイズを減少させ、組織からの拡散を向上させる。

40

【0045】

好ましい態様において、神経は、一つまたは複数の両性界面活性剤を含むか、それ（ら）からなる、界面活性成分を含む抽出組成物（Extraction Composition）（好ましくは水性組成物）と接触させる。好ましくは、抽出組成物の界面活性成分には、陰イオン性界面活性剤が存在しない。陰イオン性界面活性剤が「存在しない」とは、その概念が本明細書に記載されているとおり、組織のECMを分解するのに十分なイオン性界面活性剤が存在しないことを意味する。したがって、完全に存在しない（すなわち0%）ことは必ずしも要求されない。好ましくは、陰イオン性界面活性剤の量は、0.14%、0.10%、0.05%、0.01%、または0.005%未満である。

50

【0046】

両性界面活性剤は、例えば、SB-10および/またはSB-16であってよい。界面活性剤の濃度は、少なくとも臨界ミセル濃度であるべきである。SB-10の濃度は、例えば、100 mM、125 mM、150 mM、175 mM、200 mM、またはそれ以上とすることができる。SB-16の濃度は、例えば、0.5 mM、0.6 mM、0.7 mM、0.8 mM、0.9 mM、1.0 mM、またはそれ以上とすることができる。

【0047】

抽出組成物はさらに、界面活性成分に加えて、一つまたは複数の塩および/またはバッファー系を含んでもよい。塩分濃度は、生理学的塩分濃度であるかそれ以上であるべきである。塩分濃度の下端は、例えば100 mM、125 mM、150 mM、175 mM、200 mM、またはそれ以上のNaClであってよく、上限は、例えば500 mM、450 mM、400 mM、350 mM、250 mM、またはそれ未満のNaClであってよい。pHは、例えば6.5から8.5とすることができる。好ましくは、pHは生理学的pHである。一つの態様において、pHをおよそ7.2に維持するためにリン酸ナトリウムバッファーが使用される。

10

【0048】

組織は、この組成物と、穏やかに攪拌しながら一定期間、好ましくは5時間、10時間、15時間、またはそれ以上の間、接触させることができる。

【0049】

任意で、初めの抽出組成物と成分が同じであっても異なってもよい新たな抽出組成物を用いた、一つまたは複数の追加の抽出工程を利用してよい。組織が中に含まれているこの後続の抽出組成物は、その後1時間、2時間、3時間、4時間、5時間、6時間、またはそれ以上の間攪拌してもよい。

20

【0050】

抽出工程の後、好ましくは、抽出バッファーおよび/または生理食塩水による洗浄を行い、好ましくは、その後洗浄バッファーによる洗浄を行う。洗浄バッファーは、抽出バッファーと同じか異なるバッファー系を有してよく、通常は同じか近いpHである。しかし、洗浄組成物の塩分濃度は、好ましくは抽出組成物の塩分濃度よりも低い。一つの態様において、洗浄組成物は塩分を有しない。

【0051】

該方法の各工程は、20 ~ 30 °C、好ましくは室温に近い温度（例えば25 °C）で通常行われる。

30

【0052】

好ましい態様において、該方法は大容量の洗浄バッファーによる最終洗浄を含み、組織は、洗浄バッファーに再懸濁した後、生理緩衝食塩水に入れ、好ましくは、使用するまで冷凍することができる。

【0053】

本発明で使用するバッファー系および両性界面活性剤は、強烈な陰イオン性界面活性剤抽出を使用するHudsonらのものと同様またはより良好な脱細胞化を達成する。Hudsonらの方法により処理されたヒト神経は、ラット神経で報告されたのよりもかなり多くの細胞残渣を示した。さらに、Hudsonらの方法と本発明の方法は、ウサギおよびヒト神経に適用した場合に、ほぼ同等の細胞抽出レベルを達成した。したがって、Hudsonらにより記載される陰イオン性界面活性剤Triton X-200（商標）の添加は、脱細胞化において明らかな利点はなく、上記のとおり、神経鞘構造の成長促進特性に有害である。さらに、Hudsonらは本発明と比べて「新鮮な」神経を使用しており、本発明は、好ましくは、取得後直ちに冷凍した神経を使用するので、ヒト死体ドナー由来の神経をより効率的に使用することもできる。

40

【0054】

有利なことには、本発明の脱細胞化方法は、組織再生を促進する優れた生理的および構造的特性を有する組織移植片を生じる。例えば、高い割合の細胞外マトリックスが保存される。好ましい態様において、この割合は、50%、60%、70%、75%、80%、85%、90%

50

、95%、または99%より大きい。

【0055】

神経移植片という特定の場合においては、脱細胞化処理後、50%、60%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、または99%を超えるラミニンが保持される。これは例えば、未処理対照ドナー神経と比較した、観察的（二重盲検）スコアリングまたはデジタル画像解析により測定することができる。

【0056】

本発明に従って作製される神経移植片の有利な特性は、バイオアッセイにより測定される神経突起促進活性について測定することもできる。そのようなバイオアッセイの一つは凍結培養（cryoculture）アッセイである。好ましい態様において、本発明の脱細胞化技術に従って作製される神経移植片は、例えばバッファー洗浄のみで処理された対照神経と比較して、50%、60%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、または99%の神経突起促進活性を保持する。

10

【0057】

一つの態様においては、神経、筋肉、胎盤、および血管を含む組織が本発明に従って脱細胞化され、神経を修復するための移植片として使用される。好ましい態様において、本発明に従って脱細胞化された神経は、神経を修復するための同所移植片として使用される。

【0058】

一つの態様において、本発明に従って脱細胞化された神経は、ウマへのウマ神経移植片、ネコへのネコ神経移植片、イヌへのイヌ神経移植片を含むがこれらに限定されない、同種間の獣医学用途において使用される。

20

【0059】

別の態様において、本発明に従って脱細胞化された神経は、ヒトレシピエントに移植される動物ドナー神経、異なる種の動物レシピエントに移植される動物ドナー神経などの、異種移植用途において使用される。

【0060】

本脱細胞化方法は、骨移植片、腸管移植片、血管移植片、靭帯移植片、腱移植片、および心臓弁移植片を含むがこれらに限定されない、神経修復用以外の組織移植片にも使用することができる。

30

【0061】

本発明の好ましい態様において、移植片は脱細胞化後に冷凍される。これは、ガンマ線照射（滅菌の最も一般的な手段）に好ましい状態を促進する。また、冷凍した最終移植片製品を出荷および保管する方が、より現実的である。

【0062】

移植片の細胞再増殖

細胞は、崩壊され本発明の組織から抽出されるが、置換組織の一つまたは複数の異なる種類の細胞を再導入することも許容可能であり、しばしば必要となりうる。これらの細胞はドナーから直接得るか、ドナー由来の細胞の培養物から得るか、または細胞培養物から得てよい。ドナー細胞は、一般に生検により得られ、標準的な条件を用いた培養においてコンフルエントになるまで増殖させる。レシピエントは、例えば、必要な場合、ステロイドおよび/または他の免疫抑制薬のスケジュールを使用して、必要に応じて免疫を抑制してもよい。レシピエントの免疫を抑制することで、新たな組織または組織同等物が成長している間、置換組織移植片の免疫保護が提供されうる。

40

【0063】

また、本発明の置換組織は、移植片生着、免疫療法、認知機能、組織再生、修復、または再構築を目的として、遺伝的に改変した細胞、クローン、または移植片を含む、複数の細胞種を置換組織の三次元構成/構造内に提供するために使用してもよい。そのような細胞の例には、軟骨細胞、骨芽細胞、筋肉細胞、甲状腺細胞、副甲状腺細胞、免疫細胞、臍細胞、線維芽細胞、肝細胞、上皮細胞、島細胞、神経細胞、および主に物質を合成および

50

分泌または代謝するように働くその他の細胞、ならびに、腸、腎臓、心臓、脳、脊髄、筋肉、骨格、肝臓、胃、皮膚、肺、生殖系、神経系、免疫系、脾臓、骨髄、リンパ節、腺の生検またはクローン化細胞が含まれるが、これらに限定されない。

【0064】

生理活性分子の担体としての移植片

本発明の置換組織は、該置換組織が一つまたは複数の活性種の担体となるように、一つまたは複数の活性種で処方された生理活性分子を含んでもよい。本発明のキットまたは置換組織は、追加のポリマーもしくはポリマー溶液（例えばポリマー足場（scaffold））中に組み込んだ活性薬剤を含んでよく、または、当業者に容易に明らかとなる技術を用いて置換組織の表面または内部に直接結合されていてよい。例えば、活性薬剤は、無細胞置換組織上または内への重合（curing）により添加されるか、イオン結合、共有結合、および/または、切断可能な架橋剤などの架橋剤を使用して、結合されうる。

10

【0065】

活性薬剤は、薬物または他の生理活性化合物であってよく、したがって本発明の置換組織は、体内で使用した際、薬物または他の生理活性化合物の送達用マイクロ担体となりうる。生理活性化合物の例は、タンパク質、ペプチド、多糖類、核酸、オリゴヌクレオチド、天然および合成の有機または無機分子、ならびに、治療、予防、または診断目的で使用されるそれらの生物学的分子である。薬物には抗生剤、抗ウイルス剤、化学療法剤、免疫抑制剤、成長因子、抗血管新生剤、ホルモン、抗炎症剤、血流や細胞代謝に対して影響を与える薬物、もしくは一つまたは複数の疾患に対して有効な薬物、および/またはそれらの組み合わせが含まれる。

20

【0066】

その他の活性薬剤、例えばプロピオン酸誘導体、酢酸誘導体、フェナム酸誘導体、ピフェニルカルボン酸誘導体、およびオキシカムなどの非ステロイド系抗炎症薬（NSAIDs）を本発明の置換組織またはキットと共に含んでもよい。本発明のキットまたは置換組織と共に使用する鎮痛薬には、アセトアミノフェンおよびフェナセチンが含まれる。

【0067】

全ての特許、特許出願、仮出願、および、本明細書で参照または引用された刊行物は、全ての図表を含め、本明細書の明示的な教示と矛盾しない限りにおいて、その全体が参照として組み入れられる。

30

【0068】

以下は本発明を実施するための手順を説明する例である。これらの例は、限定するものと解釈するべきではない。別に示されない限り、全てのパーセント値は重量パーセントであり、全ての溶媒混合物比は体積比である。

【実施例】

【0069】

実施例1 - 脱細胞化手法

全ての手順は、無菌手技および滅菌溶液を使用すべきである。以下は本発明の脱細胞化手法の一つの態様の工程である。

【0070】

40

1. ドナーから神経を切除し、冷凍保存する。
2. 神経を室温で解凍する。冷水で洗浄する。大量の冷水に浸漬する。4 で6時間（またはそれ以上）穏やかに攪拌する。
3. 大量の抽出バッファー（10 mMリン酸ナトリウムバッファー、pH 7.2 + 150 mM NaCl）または任意の生理食塩水の125 mM（またはより高濃度の）スルホベタイン-10溶液に、神経を浸漬する。25 （室温に近い温度）で15時間（またはそれ以上）穏やかに攪拌する。
4. 新しい大量の抽出バッファーまたは任意の生理食塩水の125 mM（またはより高濃度の）スルホベタイン-10溶液に置換する。25 で6時間（またはそれ以上）攪拌する。
5. 大量の抽出バッファーまたは任意の生理食塩水で洗浄する。25 で60分間（またはそれ以上）攪拌する。

50

6. 大量の洗浄バッファー（10 mMリン酸ナトリウムバッファー、pH 7.2）または張性が非常に低い（塩分を含まない）任意のバッファーで洗浄する。25℃で60分間（またはそれ以上）撹拌する。
7. 神経を、大量の抽出バッファーまたは任意の生理食塩水の0.6 mM（またはより高濃度の）スルホベタイン-16溶液に浸漬する。25℃で15時間（またはそれ以上）撹拌する。
8. 新しい大量の抽出バッファーまたは任意の生理食塩水の0.6 mM（またはより高濃度の）スルホベタイン-16溶液に置換する。25℃で6時間（またはそれ以上）撹拌する。
9. 大量の抽出バッファーまたは任意の生理食塩水で洗浄する。神経を30分間（またはそれ以上）穏やかに撹拌し、新しい抽出バッファーまたは任意の生理食塩水に置換する。4℃で撹拌しながら15時間洗浄する。
10. 大量の洗浄バッファーで洗浄する。穏やかに撹拌して神経を再懸濁し、新しい洗浄バッファーまたは張性が非常に低い（塩分を含まない）任意のバッファーに置換する。4℃で撹拌しながら3時間洗浄する。
11. 生理緩衝食塩水に入れ、冷凍保存する。

10

20

30

40

50

【0071】

実施例2 - ウサギ神経を用いた脱細胞化方法の比較

本発明に従い上記のとおり調製した移植片を、DC3移植片と称する。DC3移植片を、通常の（未処理）ウサギ神経、ならびにHudsonら（Tissue Engineering 10:1346-1358, 2004）および米国特許第7,402,319号に記載されるプロトコールにより処理されたウサギ移植片（本明細書においてDC2移植片と称する）と比較した。

【0072】

二つの処理方法から得たDC2およびDC3移植片をいくつかの組織学的技術により評価した。各評価の結果は、半定量的にスコア化した（0 = 抽出されなかった、1 = 一部抽出された、2 = ほとんど抽出された、3 = 完全に抽出された、R = 再分布した）。二つの界面活性剤処理スキーム（DC2、DC3）および通常の神経対照の結果を図1～6に示す。

【0073】

図1は、ウサギ神経組織（対照；パネルA）、Hudsonらに教示される手法に従って処理したウサギ神経組織（DC2；パネルB）、および本発明により教示される方法に従って処理したウサギ神経組織（DC3；パネルC）のヘマトキシリン-エオシン（H&E）染色を示す。パネルAのスコアは0であった。パネルB（DC2）およびC（DC3）のスコアはそれぞれ2であった。H&E染色は、一般的な組織学の染色方法である。これらのパネルおよびスコアは、DC2およびDC3の処理方法が、十分な細胞抽出および神経鞘の全体的な完全性の保持を達成したことを証明している。

【0074】

図2は、ウサギ神経組織（対照；パネルA）、Hudsonらに教示される手法に従って処理したウサギ神経組織（DC2；パネルB）、および本発明により教示される方法に従って処理したウサギ神経組織（DC3；パネルC）のヘキスト染色を示す。パネルAのスコアは0であった。パネルB（DC2）およびC（DC3）のスコアはそれぞれ1Rであった。ヘキスト染色は、DNAの染色方法である。これらのパネルおよびスコアは、DC2およびDC3の処理方法がDNAを除去せず、むしろDNAを拡散させて再分布させたことを示す。

【0075】

図3は、ウサギ神経組織（対照；パネルA）、Hudsonらに教示される手法に従って処理したウサギ神経組織（DC2；パネルB）、および本発明により教示される方法に従って処理したウサギ神経組織（DC3；パネルC）のS-100免疫染色を示す。パネルAのスコアは0であった。パネルB（DC2）およびC（DC3）のスコアはそれぞれ3であった。S-100免疫標識（シュワン細胞内の細胞質タンパク質）は、DC2およびDC3の処理方法がシュワン細胞の細胞質を抽出するのに同等に有効であることを示した。

【0076】

図4は、ウサギ神経組織（対照；パネルA）、Hudsonらに教示される手法に従って処理したウサギ神経組織（DC2；パネルB）、および本発明により教示される方法に従って処理し

たウサギ神経組織（DC3；パネルC）のスダンブラック染色を示す。パネルAのスコアは0であった。パネルB（DC2）およびC（DC3）のスコアはそれぞれ3であった。スダンブラック染色はミエリンの染色方法である。これらのパネルおよびスコアは、DC2およびDC3の処理方法がミエリンを抽出するのに同等にかつ高度に有効であったことを証明している。

【0077】

図5は、ウサギ神経組織（対照；パネルA）、Hudsonらに教示される手法に従って処理したウサギ神経組織（DC2；パネルB）、および本発明により教示される方法に従って処理したウサギ神経組織（DC3；パネルC）のNAP-4神経フィラメント免疫染色を示す。パネルAのスコアは0であった。パネルB（DC2）およびC（DC3）のスコアはそれぞれ1Rであった。神経フィラメント免疫標識（ニューロン/軸索の細胞骨格のマーカー）は、DC2およびDC3の処理方法が軸索の細胞骨格を部分的にのみ抽出し、再分布させたことを示した。

10

【0078】

図6は、ウサギ神経組織（対照；パネルA）、Hudsonらに教示される手法に従って処理したウサギ神経組織（DC2；パネルB）、および本発明により教示される方法に従って処理したウサギ神経組織（DC3；パネルC）のラミニン免疫染色を示す。パネルAのスコアは0であった。パネルB（DC2）およびC（DC3）のスコアはそれぞれ1Rであった。ラミニンは、軸索を取り囲む重要な基底膜を含む神経鞘の主要成分である。ラミニン免疫標識は、DC3の処理方法が基底膜構造を実質的には抽出しなかったことを示した。

【0079】

実施例3 - 神経移植片の免疫適合性

20

Hudsonらの方法および本発明により処理した神経移植片を用いて、ニュージーランドシロ（NSW）ウサギにおける大規模なインビボ試験を行った。結果は、両方の種類の脱細胞神経移植片とも免疫学的に適合であり、移植片拒絶は観察されなかったことを示す。

【0080】

NZWウサギは非近交種である。文献において、NZWウサギドナー由来の生組織または細胞組織を、NZWレシピエントに同種移植すると、移植片免疫拒絶が起きることが知られている。

【0081】

したがって、NZW同種移植片で移植片拒絶が観察されなかったことは、本発明により調製された神経同種移植片が免疫適合性であることを証明している。

30

【0082】

実施例4 - ヒト神経を用いた脱細胞化方法の比較

ヒト神経組織を本発明に従い上記のとおり調製し、DC3移植片と称した。DC3移植片を、通常の（未処理）ヒト神経、ならびにHudsonら（Tissue Engineering 10:1346-1358, 2004）および米国特許第7,402,319号に記載されるプロトコールにより処理されたヒト移植片（本明細書においてDC2移植片と称する）と比較した。二つの処理方法から得たDC2およびDC3移植片を、いくつかの組織学的技術により評価した。

【0083】

図7は、ヒト神経組織（対照；パネルA）、Hudsonらに教示される手法に従って処理したヒト神経組織（DC2；パネルB）、および本発明により教示される方法に従って処理したヒト神経組織（DC3；パネルC）のヘマトキシリン-エオシン（H&E）染色を示す。

40

【0084】

図8は、ヒト神経組織（対照；パネルA）、Hudsonらに教示される手法に従って処理したヒト神経組織（DC2；パネルB）、および本発明により教示される方法に従って処理したヒト神経組織（DC3；パネルC）のヘキスト染色を示す。

【0085】

図9は、ヒト神経組織（対照；パネルA）、Hudsonらに教示される手法に従って処理したヒト神経組織（DC2；パネルB）、および本発明により教示される方法に従って処理したヒト神経組織（DC3；パネルC）のS-100免疫染色を示す。

【0086】

50

図10は、ヒト神経組織（対照；パネルA）、Hudsonらに教示される手法に従って処理したヒト神経組織（DC2；パネルB）、および本発明により教示される方法に従って処理したヒト神経組織（DC3；パネルC）のスダンブラック染色を示す。

【0087】

図11は、ヒト神経組織（対照；パネルA）、Hudsonらに教示される手法に従って処理したヒト神経組織（DC2；パネルB）、および本発明により教示される方法に従って処理したヒト神経組織（DC3；パネルC）のNAP-4神経フィラメント免疫染色を示す。

【0088】

図12は、ヒト神経組織（対照；パネルA）、Hudsonらに教示される手法に従って処理したヒト神経組織（DC2；パネルB）、および本発明により教示される方法に従って処理したヒト神経組織（DC3；パネルC）のラミニン免疫染色を示す。

10

【0089】

実施例5 - ラット神経移植片のニューロン再増殖

神経を長軸上で凍結切断し、カバーガラスに載せた。分離させたニューロンを組織切片上に蒔き、24時間培養した。次に、凍結培養物を固定し、被検ニューロンを免疫染色した。

【0090】

図13Aは、(A)バッファーのみ、および(B)Hudsonらにより記載された界面活性剤脱細胞化（スルホベタイン-10、スルホベタイン-16、およびTriton X-200（商標））によって脱細胞化したラット神経移植片の凍結培養アッセイを示す。バッファーのみの条件においては長い軸索成長が観察されたが、嚴重な界面活性剤脱細胞化によって神経移植片の成長促進活性は実質的に除去された。

20

【0091】

Triton X-200（商標）を用いておよび用いずに、Hudsonらの方法によって脱細胞化した神経に対して、凍結培養アッセイを行った（図13B）。対照神経（バッファー洗浄のみで処理）は高い神経突起促進活性を有していた。スルホベタイン-10およびスルホベタイン-16で（Triton X-200（商標）を用いずに）脱細胞化した神経は、同様に高い神経突起促進活性を有していた。対照的に、Triton X-200（商標）の添加による脱細胞化は、神経突起促進活性を有意に低下させた。これらの結果は、Triton X-200（商標）が、脱細胞化した神経移植片の生物学的特性に対して、持続的な有害な影響を及ぼすことを示す。

30

【0092】

実施例6 - ラミニンの神経突起促進活性に対する界面活性剤の影響

神経の細胞外マトリックスは、軸索の成長を促進することが知られている。特に、軸索を覆う基底膜の管は、神経再生における軸索成長に対して強力な刺激を与える。上記の実験で使用した凍結培養アッセイは、基底膜の構造および成長促進活性に依拠している。ラミニンが、神経基底膜の重要な神経突起促進成分であることは、十分立証されている。このことは、凍結アッセイにおいて、神経組織切片を機能遮断性抗ラミニン抗体で予め処理することにより、神経突起成長が有効に阻害されることで容易に証明される。したがって、精製したラミニンに対する個々の界面活性剤の影響を調べるために試験を行った。ラミニン活性は、SB-10によっては変化しなかった。SB-16への曝露によりおよそ50%ラミニン活性が減少した。TrX200（陰イオン性界面活性剤）は、ラミニンの神経突起促進活性を本質的に除去した（図14）。

40

【0093】

本明細書における、一つまたは複数の要素に関して「含む（comprising）」、「有する（having）」、「含む（including）」、または「含む（containing）」などの用語を使用した、本発明の任意の局面または態様の記載は、別に記載されない限りまたは文脈と明らかに矛盾しない限り、当該特定の一つまたは複数の要素「からなる（consist of）」、「から本質的になる（consist essentially of）」、または「を実質的に含む（substantially comprise）」、本発明の類似の局面または態様に対する裏付けを提供することを意図している（例えば、本明細書において特定の要素を含むと記載された組成物は、別に記

50

載されない限りまたは文脈と明らかに矛盾しない限り、該要素からなる組成物をも記載するものとして理解されるべきである)。

【0094】

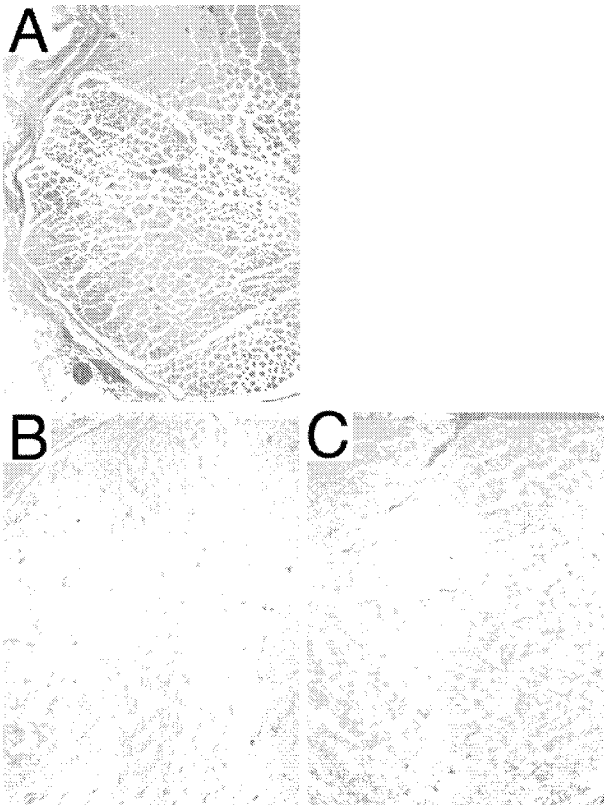
本明細書において使用される、「から本質的になる」という用語は、成分または工程の範囲を、特定された物質または工程と、本発明(すなわち、組織移植片を脱細胞化するための組成物および方法)の基本的および新規の性質に実質的に影響を与えない物質または工程とに限定するものである。例えば、「から本質的になる」を使用することにより、組成物は、組織の脱細胞化に直接の有益または有害な影響を与える界面活性剤を含むがこれらに限定されない、特定されていない成分を何ら含まない。

【0095】

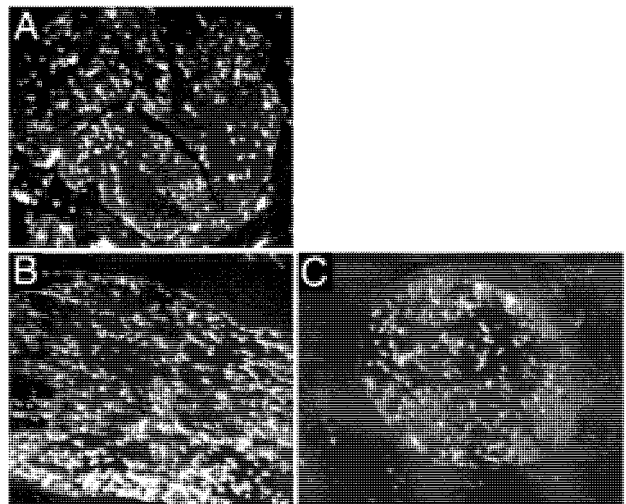
本明細書に記載される例および態様は、説明を目的とするものに過ぎず、それらに照らした様々な改変や変更が当業者に示唆されると考えられ、それらは本発明の主旨および範囲に含まれる。また、本明細書に開示された任意の発明またはその態様の任意の要素または限定は、任意のおよび/または全ての他の要素または限定と(個別にまたは任意の組み合わせで)、あるいは本明細書に開示された任意の他の発明またはその態様と組み合わせることができ、そのような組み合わせも全て、それらに限定されることなく、本発明の範囲で企図されている。

10

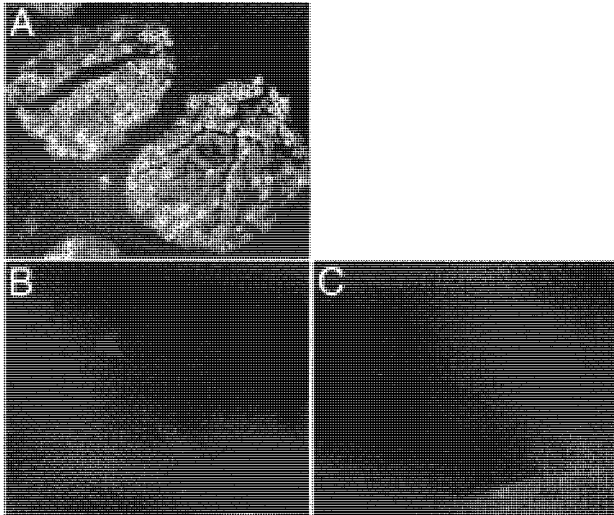
【図1】



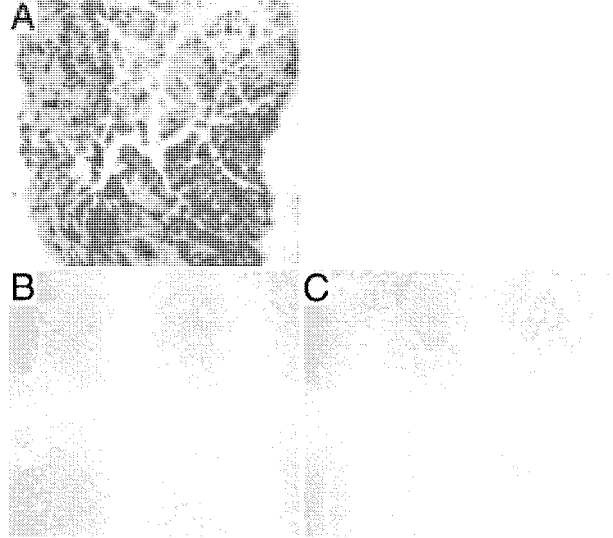
【図2】



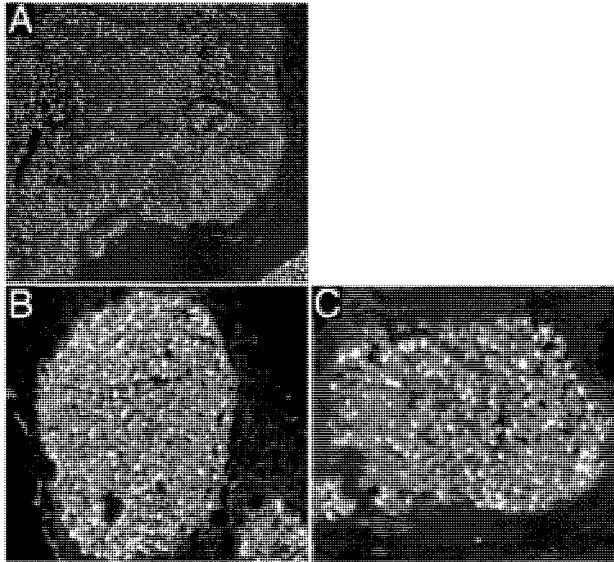
【 図 3 】



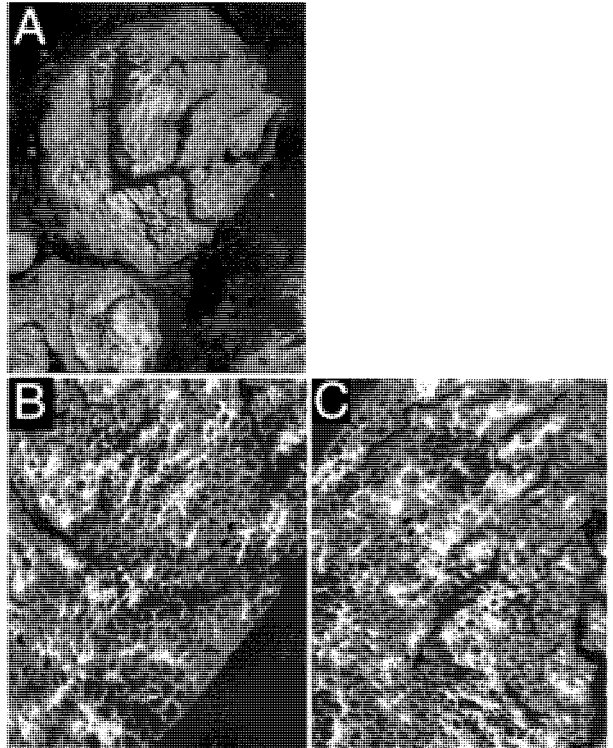
【 図 4 】



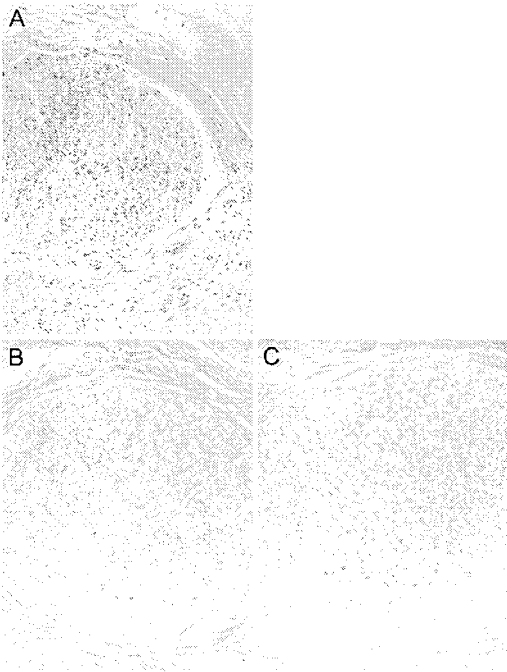
【 図 5 】



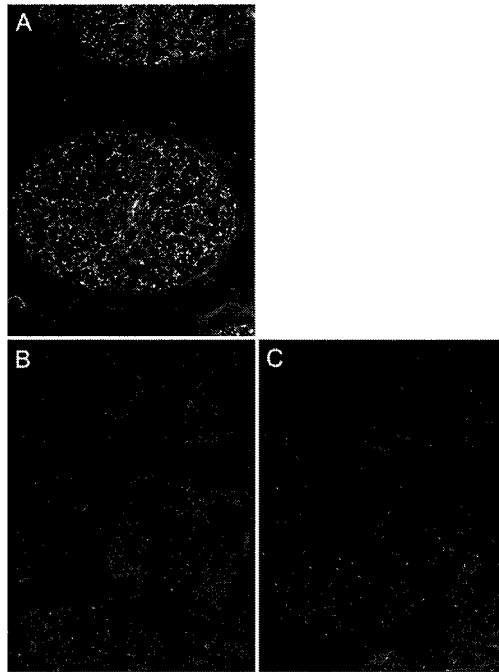
【 図 6 】



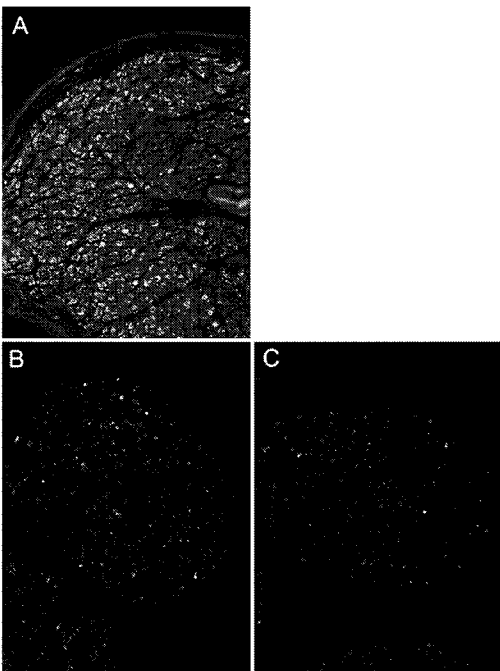
【 図 7 】



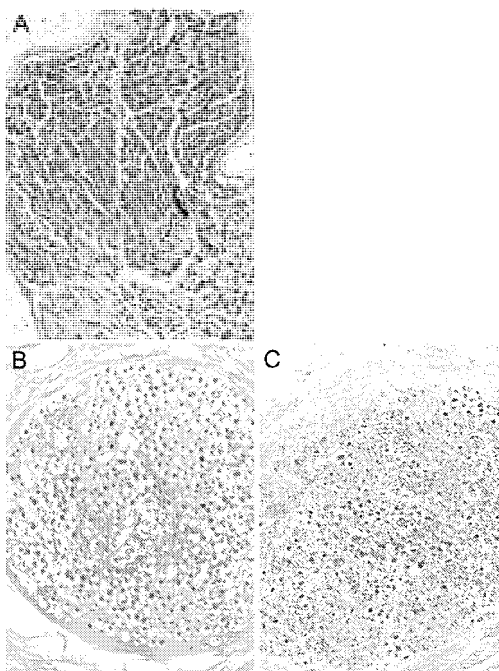
【 図 8 】



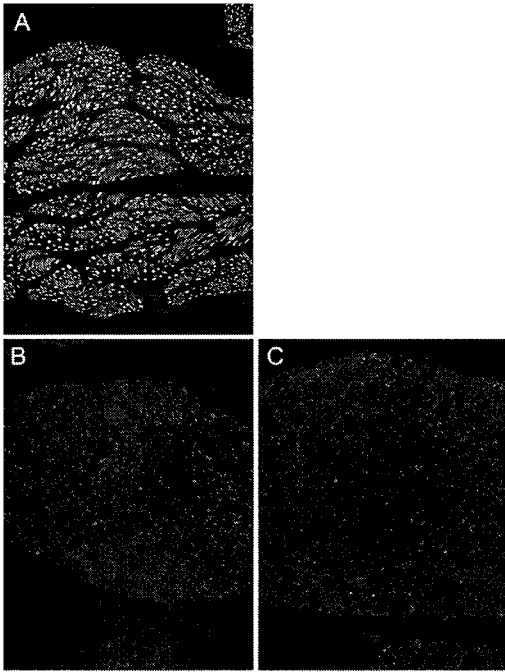
【 図 9 】



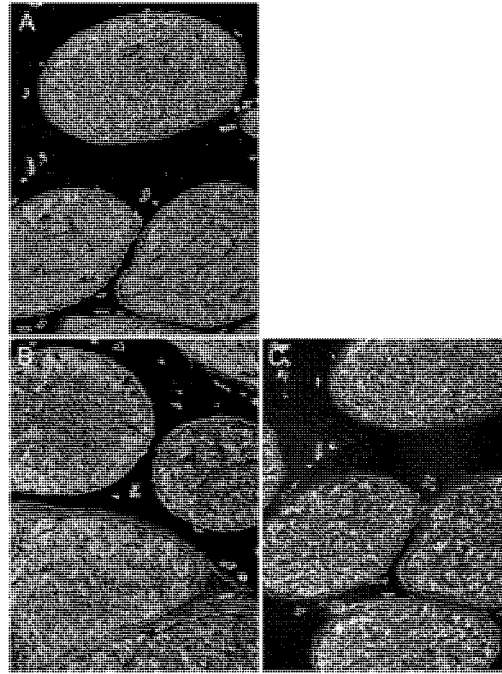
【 図 10 】



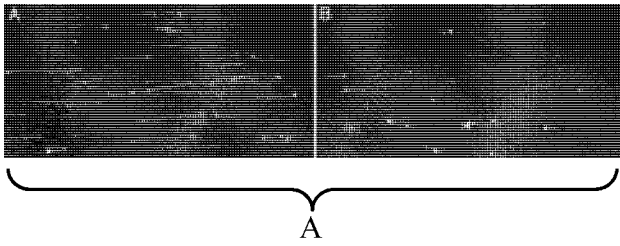
【図 1 1】



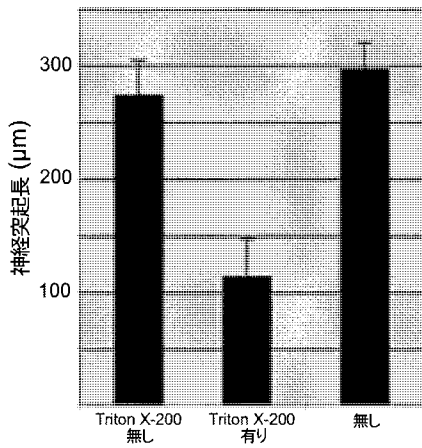
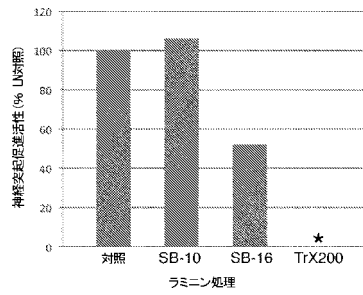
【図 1 2】



【図 1 3】

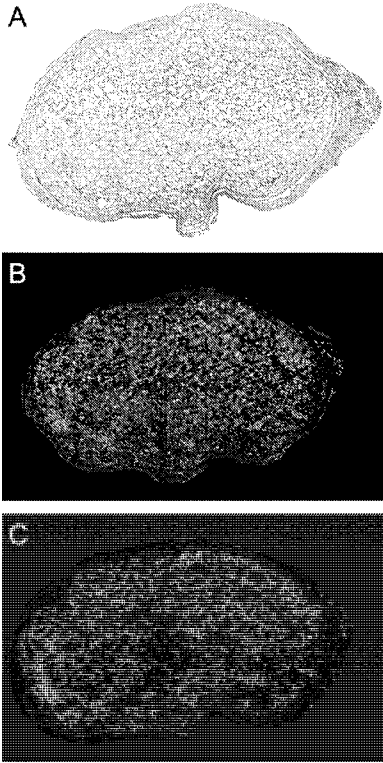


【図 1 4】

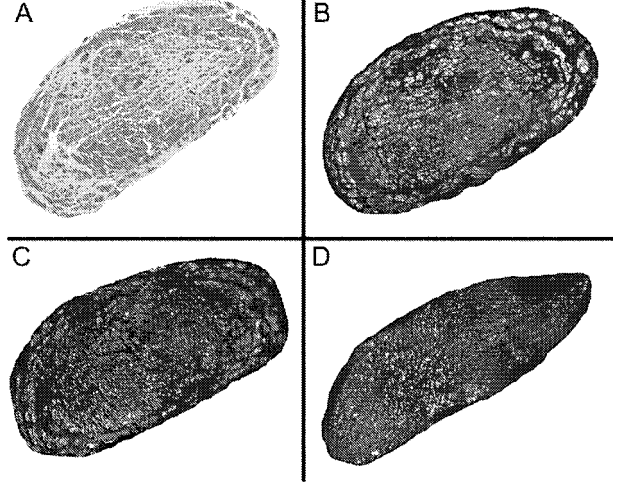


B



【 図 15 】



【 図 16 】



【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/US2014/030688
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER		
A61L 27/38(2006.01)i, A61F 2/02(2006.01)i, A01N 1/00(2006.01)j		
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) A61L 27/38; A61F 2/02; A61F 2/00; A61K 35/12; A01N 1/00		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched Korean utility models and applications for utility models Japanese utility models and applications for utility models		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) cKOMPASS(KIPO internal) & Keywords:sulfobetaine, sulphobetaine, SB-10, SB-16, amphoteric, ampholyte, zwitterion, CHAPS, decellularize, acellular, graft, allograft, autograft		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	Thermoscientific, 'Thermo Scientific Pierce Cell Lysis Technical Handbook', 2008 See page 1, Thermo Scientific Pierce Cell Lysis Reagents Selection Guide; page 6, right column.	1-4,7-8,17-20
Y		5-6,9-16
Y	US 2005-0043819 A1 (SCHMIDT, C. et al.) 24 February 2005 See abstract; claims 1-40.	5-6,9-16
A		1-4,7-8,17-20
A	CN 101095963 A (CHINESE PLA GENERAL HOSPITAL) 2 January 2008 See abstract; claims 1-10.	1-20
A	MOORE, A. M. et al. "Acellular nerve allografts in peripheral nerve regeneration: A comparative study", Muscle & Nerve, August 2011, Vol. 44, No. 2, pages 221-234 See the whole document.	1-20
A	KVIST, M. et al., "Regeneration in, and properties of, extracted peripheral nerve allografts and xenografts", Journal of plastic surgery and hand surgery, June, 2011, Vol. 45, No. 3, pages 122-128 See the whole document.	1-20
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input checked="" type="checkbox"/> 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 25 July 2014 (25.07.2014)		Date of mailing of the international search report 06 August 2014 (06.08.2014)
Name and mailing address of the ISA/KR  International Application Division Korean Intellectual Property Office 189 Cheongsa-ro, Seo-gu, Daejeon Metropolitan City, 302-701, Republic of Korea Facsimile No. +82-42-472-7140		Authorized officer Han, Inho  Telephone No. +82-42-481-3362

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US2014/030688

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	US 2011-0195107 A1 (MIN, B.-H. et al.) 11 August 2011 See abstract; claims 1-20.	1-20
A	MA, X.-L. et al., "Biomechanical properties of peripheral nerve after acellular treatment", Chinese Medical Journal, December 2011, Vol. 124, No. 23, pages 3925-3929 See abstract.	1-20

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No.

PCT/US2014/030688

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
US 2005-0043819 A1	24/02/2005	US 2009-030269 A1 US 7402319 B2	29/01/2009 22/07/2008
CN 101095963 A		None	
US 2011-0195107 A1	11/08/2011	CN 102238970 A EP 2345435 A2 EP 2345435 A4 JP 05-483035 B2 JP 2012-505013 A KR 10-1056069 B1 KR 2010-0041027 A WO 2010-044577 A2 WO 2010-044577 A3	09/11/2011 20/07/2011 04/12/2013 07/05/2014 01/03/2012 10/08/2011 22/04/2010 22/04/2010 19/08/2010

フロントページの続き

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
A 6 1 K 35/35 (2015.01)	A 6 1 K 35/35	
A 6 1 K 35/34 (2015.01)	A 6 1 K 35/34	
A 6 1 F 2/08 (2006.01)	A 6 1 F 2/08	
A 6 1 F 2/04 (2013.01)	A 6 1 F 2/04	
A 6 1 F 2/28 (2006.01)	A 6 1 F 2/28	
A 0 1 N 1/02 (2006.01)	A 0 1 N 1/02	

(81) 指定国 AP(BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, T M), EP(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, R S, SE, SI, SK, SM, TR), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG), 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, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, H R, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JP, KE, KG, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, 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, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US

(74) 代理人 100142929
弁理士 井上 隆一

(74) 代理人 100148699
弁理士 佐藤 利光

(74) 代理人 100128048
弁理士 新見 浩一

(74) 代理人 100129506
弁理士 小林 智彦

(74) 代理人 100114340
弁理士 大関 雅人

(74) 代理人 100114889
弁理士 五十嵐 義弘

(74) 代理人 100121072
弁理士 川本 和弥

(72) 発明者 ミューア デイビッド エフ .
アメリカ合衆国 フロリダ州 ゲインズビル ノースウェスト フォーティセンプンス コート
7 1 2 5

F ターム (参考) 4C081 AB04 AB11 AB12 AB13 AB18 BA12 BA16 CD34 DA16 DB08
EA05 EA13
4C087 AA01 AA02 AA03 BB45 BB46 BB47 BB50 BB63
4C097 AA01 AA14 AA15 AA21 AA26 BB01
4H011 BB07 BC18 CA01 CB05 CD01 CD06