

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第3806426号  
(P3806426)

(45) 発行日 平成18年8月9日(2006.8.9)

(24) 登録日 平成18年5月19日(2006.5.19)

(51) Int. Cl.	F I		
<b>A 6 1 L 27/00 (2006.01)</b>	A 6 1 L 27/00		U
	A 6 1 L 27/00		V
	A 6 1 L 27/00		Y

請求項の数 1 (全 17 頁)

(21) 出願番号	特願2003-532109 (P2003-532109)	(73) 特許権者	599029420 田畑 泰彦 京都府宇治市琵琶台3-8-16
(86) (22) 出願日	平成14年9月25日(2002.9.25)	(73) 特許権者	000190943 新田ゼラチン株式会社 大阪府大阪市浪速区桜川4丁目4番26号
(86) 国際出願番号	PCT/JP2002/009893	(74) 代理人	100073461 弁理士 松本 武彦
(87) 国際公開番号	W02003/028782	(72) 発明者	田畑 泰彦 京都府宇治市琵琶台3-8-16
(87) 国際公開日	平成15年4月10日(2003.4.10)	(72) 発明者	平岡 陽介 大阪府八尾市二俣2丁目2番地 新田ゼラチン株式会社大阪工場内
審査請求日	平成16年2月12日(2004.2.12)		
(31) 優先権主張番号	特願2001-297888 (P2001-297888)		
(32) 優先日	平成13年9月27日(2001.9.27)		
(33) 優先権主張国	日本国(JP)		

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 生体組織再生用複合材料

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

天然高分子と生体分解吸収性合成高分子とからなる複合材料であって、  
天然高分子からなるスポンジ中に生体分解吸収性合成高分子が繊維状の形態で存在しており、

前記天然高分子は、コラーゲンであって、熱脱水架橋法により架橋されてなり、

前記生体分解吸収性合成高分子の繊維は、その隣接する繊維間に、当該繊維状の生体分解吸収性合成高分子よりも融点の低い生体分解吸収性合成高分子の融解・凝固により形成された結合点を有しているとともに、

前記生体分解吸収性合成高分子の含有量が前記天然高分子に対する重量比で0.2～10.0である、

ことを特徴とする生体組織再生用複合材料。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】

本発明は、例えば、生体組織を再生するための細胞の足場材料として用いられる生体組織再生用複合材料に関する。

【0002】

【背景技術】

生体組織を再生するために用いられる細胞の足場材料としては、1) 細胞との親和性を 20

有すること、2) 組織再生に要する期間、十分な力学的強度が保持できること、3) 生体分解吸収性を有し、組織再生の経過を妨げないようにその進行に応じて速やかに分解消失させること、4) 細胞が入り易くし、かつ入り込んだ細胞に対する酸素や栄養の供給を可能にするために、多孔質であること、が要求される。このような足場材料としては、従来から、天然高分子であるコラーゲンを用いたスポンジ状成形体が知られているが、力学的強度が低いという欠点があり、実際に生体内に埋入した場合あるいは細胞接種のため細胞混濁液に浸漬した場合、その形状が維持できないといった問題があった。力学的強度の問題を解決する生体組織再生用材料として、例えば、ポリ乳酸、ポリグリコール酸、あるいはこれらの共重合体、もしくはこれらと  $\epsilon$ -カプロラクトンとの共重合体等の生体分解性の合成高分子を用いたスポンジ状成形体や不織布等が提案されているが、生体分解性合成高分子のみからなる材料では、コラーゲンに比べて細胞との親和性に劣ると同時に、その分解消失期間も組織再生の観点からは長すぎるといった問題があった。このように、コラーゲンもしくは生体分解性合成高分子を単独に用いた材料では、上記1)~3)を同時に満足させることは難しかった。

10

**【0003】**

そこで、両者の短所を補う1つの方法として、近年、コラーゲンと生体分解性合成高分子との複合材料の開発がなされている。例えば、特許文献1では、コラーゲンからなるスポンジ材料の少なくとも一部を生体分解性プラスチックで被覆した複合材料が提案されている。しかし、該複合材料は、その表面に合成高分子が存在するため、力学的強度には優れるものの、生体適合性については依然として低く、改良の余地があるものであった。他

方、非特許文献2には、乳酸/グリコール酸共重合体から作製したスポンジをコラーゲン溶液に浸漬した後、凍結乾燥して得られる複合材料が報告されている。しかし、このようにして得られた複合材料は、コラーゲンに対する合成高分子の比率が高く、細胞との親和性という点ではやはり十分に満足いく性能が得られるものでなく、しかも材料が体内で分解吸収されるのに要する期間も組織再生の観点からは長すぎるといった問題があった。

20

**【0004】****【特許文献1】**

特開平7-236688号公報

**【0005】****【非特許文献2】**

「人工臓器」29巻2号, 463-467(2000年)

30

**【0006】****【発明の開示】****【発明が解決しようとする課題】**

そこで、本発明は、細胞との親和性に優れ、組織再生に要する期間には十分な力学的強度が保持でき、しかも組織再生の経過を妨げないようにその進行に応じて速やかに分解消失させることができる適度な生体分解吸収性を兼ね備えた、生体組織再生用複合材料を提供することを目的とする。

**【0007】****【課題を解決するための手段】**

本発明者らは、前記課題に鑑み、コラーゲン等の天然高分子と生体分解吸収性合成高分子との複合材料において、合成高分子の含有率を低く抑ながら効果的に力学的強度を保持させるべく、鋭意検討を行なった。その結果、生体分解吸収性合成高分子を繊維状の形態で存在させるとともに、天然高分子を架橋させることにより、前記課題を解決しうることを見出し、本発明を完成した。

40

**【0008】**

すなわち、本発明の生体組織再生用複合材料は、天然高分子と生体分解吸収性合成高分子とからなる複合材料であって、天然高分子からなるスポンジ中に生体分解吸収性合成高分子が繊維状の形態で存在しており、

50

前記天然高分子は、コラーゲンであって、熱脱水架橋法により架橋されてなり、  
前記生体分解吸収性合成高分子の繊維は、その隣接する繊維間に、当該繊維状の生体分  
解吸収性合成高分子よりも融点の低い生体分解吸収性合成高分子の融解・凝固により形成  
された結合点を有しているとともに、

前記生体分解吸収性合成高分子の含有量が前記天然高分子に対する重量比で0.2～1  
0.0である、  
ことを特徴とする。

【0009】

【発明の効果】

本発明によれば、細胞との親和性に優れ、組織再生に要する期間には十分な力学的強度  
が保持でき、しかも組織再生後には速やかに分解消失させることができる適度な生体分解  
吸収性を兼ね備えた、生体組織再生用複合材料を提供することができる。

10

【0010】

【発明を実施するための最良の形態】

本発明の生体組織再生用複合材料は、天然高分子の溶液中に繊維状の生体分解吸収性合  
成高分子を含浸させた状態で凍結乾燥を行い、その後架橋処理を施すことにより、得るこ  
とができる。

【0011】

本発明における天然高分子としては、特に制限はないが、例えば、コラーゲン、ゼラチ  
ン、フィブリン、グルテン、フィブロイン等のタンパク質およびこれらの誘導體；ポリア  
ミノ酸およびこれらの誘導體；キチン、キトサン、ヒアルロン酸、アルギン酸、デンプン  
、デキストラン等の多糖およびこれらの誘導體；これらの2種以上からなる混合物および  
化学結合により作製された複合体；等が挙げられる。なお、天然高分子は1種のみを用い  
てもよいし、2種以上を併用してもよい。

20

【0012】

本発明の好ましい形態においては、天然高分子はコラーゲンであることが好ましい。コ  
ラーゲンとしては、特に制限はなく、動物の骨や皮等を原料として得られる従来公知の酸  
可溶化コラーゲン、酵素可溶化コラーゲン、アルカリ可溶化コラーゲン、またはこれら可  
溶化コラーゲンの化学修飾コラーゲンや、可溶化コラーゲンからコラーゲン繊維を再生さ  
せた再生コラーゲン等のコラーゲン溶液を用いることができる。具体的には、例えば、豚  
皮由来I型コラーゲン、豚腱由来I型コラーゲン、牛鼻軟骨由来II型コラーゲン、魚か  
ら抽出したI型コラーゲン等が挙げられる。

30

【0013】

前記天然高分子としてコラーゲンを用いる場合、コラーゲン溶液の濃度としては、特に  
制限はないが、0.1～4重量%とすることが好ましく、0.3～2重量%とすることが好  
ましく、0.3～2重量%とすることがより好ましい。

また、前記天然高分子としてコラーゲンを用いる場合、前記コラーゲン溶液には、効果  
的に発泡させて得られるコラーゲンスポンジのポアサイズを最適な範囲にする目的で、  
水と混合しない性質をもつ有機溶媒を添加することもできる。このような有機溶媒として  
は、例えば、クロロホルム、四塩化炭素、塩化メチレン等のハロゲン化炭化水素；酢酸エ  
チル、プロピオン酸エチル等のエステル類；ベンゼン、トルエン等の芳香族炭化水素類；  
ヘキサン、シクロヘキサン等の脂肪族炭化水素類；ジエチルエーテル、ジイソプロピルエ  
ーテル等のエーテル類；等が挙げられ、これらは1種のみを用いてもよいし、2種以上を  
併用してもよい。なお、これら有機溶媒を添加する場合、その効果を十分に発揮させるた  
めには、添加した後の有機溶媒濃度が2重量%以上となるようにすることが好ましい。

40

【0014】

さらに、前記天然高分子としてコラーゲンを用いる場合、前記コラーゲン溶液には、コ  
ラーゲンスポンジの製造において従来から用いられている各種添加剤を、本発明の効果  
を損なわない範囲で、必要に応じて添加しておいてもよい。例えば、ムコ多糖類、細胞接着  
因子、細胞成長因子、サイトカイン、ケモカイン等、あるいはこれらの物質の有する生理

50

活性をもつタンパク質やペプチド等を添加しておくことにより、生体適合性をより向上させることができる。

【0015】

本発明における生体分解吸収性合成高分子としては、例えば、ポリグリコール酸、ポリ乳酸、ポリ- -カプロラクトン、ポリジオキサノン、ポリ- -リンゴ酸、ポリオルソエステル、ポリジアミノホスファゼン、およびこれらの共重合体等が挙げられる。これらの中でも特に、一般的な組織再生の期間に適した生体分解吸収性を有する点から、ポリグリコール酸、ポリ乳酸、ポリ- -カプロラクトン、あるいはこれらの共重合体が好ましい。なお、生体分解吸収性合成高分子は1種のみを用いてもよいし、2種以上を併用してもよい。

10

【0016】

前記生体分解吸収性合成高分子は、繊維状になっていることが重要である。生体分解吸収性合成高分子を繊維状の形態で存在させることにより、少ない含有量で十分な力学的強度を保持させることができるのである。詳しくは、該繊維は、長繊維であっても短繊維であってもよいが、例えば不織布をほぐした状態のように、十分に絡まりあっていることが好ましい。また、その繊維径も特に限定されるものではなく、例えば1~100 $\mu$ m径のものを好ましく用いることができる。

【0017】

前記生体分解吸収性合成高分子の繊維は、その隣接する繊維間に結合点を有していることが好ましい。これにより、生体分解吸収性合成高分子繊維の強度を補強し、得られる複 20  
合材料により優れた力学的強度を付与することができる。また、これにより、より少ない量の生体分解吸収性合成高分子繊維で得られる複合材料に十分な力学的強度を付与することができることとなる。

【0018】

前記生体分解吸収性合成高分子の繊維の隣接する繊維間に結合点を形成する方法としては、特に制限されないが、例えば、前記繊維状の生体分解吸収性合成高分子に、例えば、ポリ乳酸、乳酸とグリコール酸との共重合体、ポリ- -カプロラクトン、乳酸と -カプロラクトンとの共重合体など、前記繊維状の生体分解吸収性合成高分子として用いる高分子よりも融点が高い生体分解吸収性合成高分子(以下、低融点高分子と称す。)をコーティングした後、該コーティングされた低融点高分子のみが融解するような条件で熱処理 30  
するようにすればよい。繊維状の生体分解吸収性合成高分子にこのような処理を施すことにより、繊維にコーティングされた低融点高分子のみが融解し、この融解した低融点高分子が繊維の交点にて凝固し、隣接する繊維間に結合点が形成されることとなる。具体的には、前記低融点高分子をコーティングするには、例えば、該低融点高分子を、例えばクロロホルム、酢酸エチル、ジオキサン等の溶媒に溶解させた溶液とし、該溶液を噴霧器等を用いて繊維の表面にスプレーした後、凍結乾燥するなどして前記溶媒を除去するようにすればよい。なお、このとき、前記低融点高分子のコーティング量は、繊維状の生体分解吸収性合成高分子に対して0.1~50重量%の範囲とすることが好ましい。また、熱処理する際の条件は、例えば、前記低融点高分子のみが融解するような条件であれば、特に制限はされないが、例えば、0.1~0.5トル未満の真空下、160~250 で5~ 40  
60分間とすればよい。

【0019】

生体分解吸収性合成高分子の含有量は、生体分解吸収性合成高分子/天然高分子(重量比)=0.2~10.0となるようにすることが好ましい。本発明においては生体分解吸収性合成高分子が繊維状の形態を呈しているので、前記範囲のように生体分解吸収性合成高分子の含有量が少なくても十分な力学的強度を保持させることができる。そして、生体分解吸収性合成高分子の含有量が少ないことにより、優れた細胞との親和性を発現すると同時に、組織再生後に速やかに分解消失させることができる。前記天然高分子としてコラーゲンを用いる場合、実際には、生体分解吸収性合成高分子は、前記コラーゲン溶液(前記有機溶媒や各種添加剤を添加する前の状態)に対して0.01~10重量%とすること 50

が好ましく、0.4～1重量%とすることがより好ましい。

#### 【0020】

凍結乾燥は、例えば、前記繊維状の生体分解吸収性合成高分子を入れた容器内に前記天然高分子の溶液を加え、生体分解吸収性合成高分子繊維を含ませた状態にして行なえばよい。このとき、容器に加える天然高分子の溶液は、通常ホモジナイザー等を用いて充分には発泡させておくことが好ましい。

凍結乾燥の方法については、常法に従って行なえばよく、例えば、凍結の際の温度は-4～-196とすればよい。

#### 【0021】

凍結乾燥により得られたスポンジには、続いて架橋処理を施すことが重要である。該架橋処理でコラーゲン等の天然高分子を架橋することにより、生体分解吸収性合成高分子の含有量が少なくても十分な力学的強度を保持させることができるのである。

架橋処理の方法については、特に制限はなく、例えば、従来公知の化学架橋法、真空下での熱脱水架橋法、紫外線照射による架橋法等を採用すればよい。具体的には、化学架橋を行なう場合には、グルタルアルデヒド等の架橋剤を用いればよく、真空下で熱脱水架橋させる場合には、100～150で2～120時間程度の条件で行なえばよく、紫外線照射による場合には、例えば254nmの紫外線を1分～24時間程度照射すればよい。

#### 【0022】

このようにして得られる本発明の生体組織再生用複合材料は、天然高分子からなる架橋されたマイクロポラスなスポンジの中に、繊維状の生体分解吸収性合成高分子がランダムに埋入された構造を有している。

#### 【0023】

##### 【実施例】

##### <実施例1>

ポリグリコール酸からなる不織布3mg分を切り出し、ピンセットで均一にほぐして繊維状にし、シリコン(「シグマコート」SIGMA社製)でコーティングしたアルミキャップ(20mm、34mmH)の中に入れた。次に、0.3重量%の豚皮由来I型コラーゲン溶液1.5gに、クロロホルムをクロロホルム濃度が約5重量%となるように添加し、ジェネレーターシャフト付ホモジナイザーを用いて12000rpmで3分間攪拌した後、該溶液を前記アルミキャップに添加した。次いで、該アルミキャップの内容物を-80で12時間凍結した後、0.1トル未満の真空下で24時間凍結乾燥を行った。その後、140、0.1トル未満の真空下で12時間熱脱水架橋を行い、ポリグリコール酸/コラーゲン=0.67(重量比)である本発明の複合材料を得た。

#### 【0024】

##### <実施例2～4>

ポリグリコール酸からなる不織布の重量を、実施例2においては6mg、実施例3においては12mg、実施例4においては24mgとしたこと以外は、実施例1と同様にして、本発明の複合材料を得た。

#### 【0025】

##### <比較例1>

0.3重量%の豚皮由来I型コラーゲン溶液1.5gに、クロロホルムをクロロホルム濃度が約5重量%となるように添加し、ジェネレーターシャフト付ホモジナイザーを用いて12000rpmで3分間攪拌した後、該溶液を、シリコン(「シグマコート」SIGMA社製)でコーティングしたアルミキャップ(20mm、34mmH)に入れた。次いで、該アルミキャップの内容物を-80で12時間凍結した後、0.1トル未満の真空下で24時間凍結乾燥を行った。その後、140、0.1トル未満の真空下で12時間熱脱水架橋を行い、比較用のコラーゲン単独材料を得た。

#### 【0026】

##### <比較例2>

熱脱水架橋を施さないこと以外は、実施例2と同様にして、比較用の複合材料を得た。

10

20

30

40

50

## &lt; 比較例 3 &gt;

熱脱水架橋を施さないこと以外は、比較例 1 と同様にして、比較用のコラーゲン単独材料を得た。

## 【 0 0 2 7 】

( 走査型電子顕微鏡による観察 )

実施例 1 および比較例 1 で得られた材料の断面を走査型電子顕微鏡を用いて観察した。実施例 1 の断面を図 1 に、比較例 1 の断面を図 2 に、それぞれ示す。

図 1 と図 2 から、本発明の複合材料には、繊維状の生体分解吸収性合成高分子が認められ、しかも、生体分解吸収性合成高分子繊維の有無に関わらずポアサイズに差はないことが判る。

10

## 【 0 0 2 8 】

( 圧縮試験 )

実施例 4 および比較例 1 で得られた材料を用いて、以下の圧縮試験を行なった。

得られた材料を、直径 18 mm、高さ 3 mm の円柱形に切り出し、圧縮試験機 ( 「オートグラフ A G S - 1 0 k N D 」 島津製作所製 ) を用いて、1 mm / 分で高さの 5 0 % を圧縮したときの応力 - ひずみ曲線を得、該曲線から圧縮弾性率を求めた。

上記の結果、実施例 4 の材料では圧縮弾性率は 3 9 . 4 M P a であるのに対して、比較例 1 の材料では圧縮弾性率は 6 . 6 M P a であった。このことから、生体分解吸収性合成高分子繊維を含有させた本発明の複合材料は、インプラントした際にも、コラーゲン単独材料に比べ、より高い圧縮に対して抵抗性を発揮しうることが示唆された。

20

## 【 0 0 2 9 】

( in - vitro における収縮試験 )

実施例 1 ~ 3 および比較例 1 で得られた材料を、直径 15 mm、高さ 3 mm の円柱形の試験片とし、これを 7 0 % エタノール中に 3 分間浸漬した後、Eagle ' s M E M 培地 ( 1 0 % F C S 含む ) に 3 回浸漬した。培地を除去した後、試験片をプレートに入れ、その中に、L 9 2 9 線維芽細胞 (  $2 \times 10^6$  cells / ml ) を含む Eagle ' s M E M 培地 ( 1 0 % F C S 含む ) 1 ml を加え、3 7 °C でインキュベートした。そして、6 時間後の試験片の直径を測定し、浸漬前の試験片直径に対する浸漬後の試験片直径の割合を求めた。結果を図 3 に示す。なお、結果は、各材料について 3 回ずつ行なったときの平均値で表わした。

## 【 0 0 3 0 】

他方、L 9 2 9 線維芽細胞 (  $2 \times 10^6$  cells / ml ) を含む Eagle ' s M E M 培地 ( 1 0 % F C S 含む ) の代わりに、L 9 2 9 線維芽細胞 (  $2 \times 10^6$  cells / ml ) を含まない Eagle ' s M E M 培地 ( 1 0 % F C S 含む ) を用いたこと以外は上記と同様にして、6 時間後の試験片の直径を測定し、浸漬前の試験片直径に対する浸漬後の試験片直径の割合を求めた。結果を図 4 に示す。なお、結果は、各材料について 3 回ずつ行なったときの平均値で表わした。

30

## 【 0 0 3 1 】

図 3 および図 4 の結果から、培地中の細胞の有無に関わらず、コラーゲン単独材料は、培地に浸漬することにより大きく収縮するが、生体分解吸収性合成高分子繊維を含有させた本発明の複合材料では、収縮を小さく抑えられることが明らかであった。これは、生体分解吸収性合成高分子繊維が材料スポンジ内で骨格の役割をなしているためであると推測される。また、生体分解吸収性合成高分子繊維の含有量が同じ場合、培地中の細胞の有無によって、収縮の差は認められなかった。

40

## 【 0 0 3 2 】

( in - vitro における生体親和性試験 )

実施例 2 および比較例 1 で得られた材料を、直径 15 mm、高さ 3 mm の円柱形の試験片とし、これを 7 0 % エタノール中に 3 分間浸漬した後、Eagle ' s M E M 培地 ( 1 0 % F C S 含む ) に 3 回浸漬した。培地を除去した後、試験片をプレートに入れ、その中に、L 9 2 9 線維芽細胞 (  $2 \times 10^6$  cells / ml ) を含む Eagle ' s M E M 培地 ( 1 0 % F C S 含む ) 0 . 5 ml を加え、3 7 °C でインキュベートした。そして、6 時間後の接着細胞数を

50

、細胞のDNAを定量することにより測定した。

上記の結果、実施例2の材料では22,109個であり、比較例1の材料では19,908個であり、両者の間に有意な差は認められなかった。これらの結果は、生体分解吸収性合成高分子繊維を有無によってコラーゲンスポンジの細胞親和性は変わらないことを示している。

#### 【0033】

以上のin-vitroにおける試験結果から、細胞懸濁液をスポンジに加えた段階でスポンジが収縮すれば、細胞の培養足場基材としての利用は難しいことが判る。これに比べて、本発明の材料ではこのような収縮は認められず、本来のコラーゲンと同じ細胞親和性をもち、in-vitroにおける細胞の培養足場としても優れていることが明らかであった。

10

#### 【0034】

(マウス背部皮下へのインプラント試験1)

実施例1～4および比較例1で得られた材料をEOG殺菌した後、5mm×5mm×5mmの大きさの試験片を切り出した。マウス(ddy、清水実験材料)の背部の一部を切り、そこから前記試験片2個をマウスの背部皮下に埋入した後、縫合した。そして、3日後および7日後に試験片を取り出し、力学的強度および細胞との親和性を以下のようにして評価した。

#### 【0035】

1) 力学的強度；取り出した試験片の体積を測定し、インプラント前の試験片体積に対するインプラント後の試験片体積の割合を求めた。結果を図5に示す。なお、結果は、各材料について3回ずつ行なったときの平均値で表わした。

20

図5の結果から、コラーゲン単独材料では、3日でインプラント前の10%程度、7日後にはインプラント前の2%弱にまで体積が減少するのに比べ、生体分解吸収性合成高分子繊維を含有させた本発明の複合材料ではいずれも、体積の減少を有意的に抑制することができることが明らかであった。

#### 【0036】

2) 細胞との親和性；7日後に取り出した試験片(実施例2を除く)を試験片中心部位で切断して、ヘマトキシリン・エオシンによる染色を行い、それらの断面に観察された細胞数を測定した。その結果、各材料について3回ずつ行なったときの平均値は、比較例1の材料では696.4個、実施例1の材料では716.2個、実施例3の材料では1680.9個、実施例4の材料では1768.1個であった。このとき使用した、比較例1の材料のヘマトキシリン・エオシン(H・E)染色像を図6に、実施例1の材料のH・E染色像を図7に、実施例3の材料のH・E染色像を図8に、実施例4の材料のH・E染色像を図9に、それぞれ示す。

30

上記細胞数の結果から、材料内へ侵入した細胞数は、生体分解吸収性合成高分子繊維を含有させることによって増加し、その繊維含有量の増加に応じて増えていることが明らかであった。これは、生体分解吸収性合成高分子繊維を含有させることにより、材料の収縮が抑制され、コラーゲンスポンジの残存体積が大きくなることが起因していると考えられる。

#### 【0037】

(マウス背部皮下へのインプラント試験2)

実施例2および比較例2で得られた材料を用い、上記インプラント試験1と同様にして、試験片を作製しマウス背部皮下にインプラントした。そして、14日後に試験片を取り出し、力学的強度および細胞との親和性を以下のようにして評価した。

40

#### 【0038】

1) 力学的強度；取り出した試験片の1辺の長さを測定して、力学的強度を評価した。その結果、各材料について3回ずつ行なったときの平均値は、実施例2の材料では0.93mm、架橋を施していない比較例2の材料では0.40mmであった。

#### 【0039】

2) 細胞との親和性；取り出した試験片を試験片中心部位で切断して、ヘマトキシリン

50

・エオシンによる染色を行い、それらの断面に観察された細胞数を測定し、単位面積当たりの細胞数を求めた。その結果、各材料について3回ずつ行なったときの平均値は、比較例2の材料では601.5個/mm<sup>2</sup>、実施例2の材料では817.0個/mm<sup>2</sup>であった。また、比較例2の材料のヘマトキシリン・エオシン(H・E)染色像を図10に、実施例2の材料のH・E染色像を図11に、それぞれ示す。

#### 【0040】

図10、図11および上記細胞数の結果から、架橋を施していない比較例2の材料では、インプラント後14日間で、H・E染色像による埋入コラーゲンの残存が認められず、コラーゲンは埋入部位から分解消失していた。このように速く分解してしまえば、コラーゲンスポンジは体内における細胞の増殖・分化のための足場になりえないと考えられる。これに対して、架橋を施した本発明の材料では、この時点でも埋入コラーゲンは残存しており、そのスポンジ内に細胞が侵入し、増殖していることが確認された。

10

#### 【0041】

他方、比較例1および比較例3で得られた材料を用い、上記インプラント試験1と同様にして、試験片を作製しマウス背部皮下にインプラントし、7日後のマウス背部皮下における材料の残存状態を観察した。比較例3の材料の残存状態を撮影したものを図12のAに、比較例1の材料の残存状態を撮影したものを図12のBに、それぞれ示す。その結果、図12のAに示されるように、架橋を施していない比較例3の材料では、インプラント7日後で完全に消失しているのに対して、架橋を施した比較例1の材料では、図12のBにおいて矢印で示す部分に、コラーゲンスポンジがその形状を維持して残存していることが確認できた。生体分解吸収性合成高分子繊維の含有がコラーゲンスポンジ自体の分解性に影響を与えるとは考えにくく、架橋を施していないコラーゲンスポンジは少なくとも7日以内に分解してしまうと考えられる。

20

上記マウス背部皮下へのインプラント試験2の結果から、生体組織の再生を目的とする場合、少なくとも7~14日間程度は分解吸収されずに体内に残存しなければ細胞の増殖・分化の足場材料としては不適切であると考えられる。この条件を達成するためには、コラーゲンスポンジを架橋処理することが不可欠であることが示された。

#### 【0042】

##### <実施例5>

ポリグリコール酸からなる不織布1.5mg分を切り出し、ピンセットで均一にほぐして繊維状にし、24ウェルプレート(coaster 3526, corning, NY)の中に入れた。次に、0.3重量%の豚皮由来I型コラーゲン溶液0.75gを前記24ウェルプレートに添加した。次いで、該24ウェルプレートの内容物を-80で12時間凍結した後、0.1トル未満の真空下で24時間凍結乾燥を行った。その後、140、0.1トル未満の真空下で12時間熱脱水架橋を行い、ポリグリコール酸/コラーゲン=0.67(重量比)である本発明の複合材料を得た。

30

#### 【0043】

##### <実施例6~8>

ポリグリコール酸からなる不織布の重量を、実施例6においては3mg、実施例7においては6mg、実施例8においては12mgとしたこと以外は、実施例5と同様にして、本発明の複合材料を得た。

40

#### 【0044】

##### <比較例4>

0.3重量%の豚皮由来I型コラーゲン溶液0.75gを、24ウェルプレート(coaster 3526, corning, NY)に入れた。次いで、該24ウェルプレートの内容物を-80で12時間凍結した後、0.1トル未満の真空下で24時間凍結乾燥を行った。その後、140、0.1トル未満の真空下で12時間熱脱水架橋を行い、比較用のコラーゲン単独材料を得た。

#### 【0045】

(マウス背部皮下へのインプラント試験3)

50

実施例 5 ~ 8 および比較例 4 で得られた材料を用い、上記インプラント試験 1 と同様に、試験片を作製しマウス背部皮下にインプラントした。そして、24 時間後に試験片を取り出し、細胞との親和性を判断する指標として、材料に侵入した全細胞数および侵入した細胞の材料表面からの距離を以下のようにして評価した。

【0046】

1) 材料に侵入した全細胞数；24 時間後に取り出した試験片を PBS (リン酸緩衝液) で洗浄した後、DNA アッセイを行い、材料中の全細胞数を測定した。細胞数は、L929 線維芽細胞にて算出した標準曲線から計算により求めた。

上記の結果、実施例 5 の材料では 2,084,938 個であり、実施例 6 の材料では 2,000,960 個であり、実施例 7 の材料では 3,777,916 個であり、実施例 8 の材料では 5,825,916 個であり、比較例 4 の材料では 849,226 個であった。これらの結果をグラフにして図 13 に示す。これらの結果から、材料内へ侵入した細胞数は、生体分解吸収性合成高分子繊維を含有させることによって増加し、その繊維含有量の増加に応じて増えていることが明らかであった。

【0047】

2) 侵入した細胞の材料表面からの距離；24 時間後に取り出した試験片を 4%ホルマリン溶液で固定し、ヘマトキシリン・エオシンによる染色を行った。そして、Image-Pro Plus 3.01 (Silver Spring, MD) を用いて、複数の異なる部位の組織切片を観察し、任意に選択した 500 個の細胞について表面からの距離を測定した。結果を図 14 に示す。

【0048】

図 14 の結果から、コラーゲン単独材料では、99%の細胞が材料の表面から 0.4 mm 以内に存在しており、細胞が材料内部まで侵入しにくいことが明らかであるのに比べ、生体分解吸収性合成高分子繊維を含有させた本発明の複合材料では、細胞が材料内部にまで侵入しており、しかもその繊維含有量の増加に応じて侵入距離が大きくなり、より材料内部にまで侵入することが明らかであった。

上記マウス背部皮下へのインプラント試験 3 の結果から、生体組織の再生を目的とする場合、本発明の材料は、コラーゲン単独材料に比べ、in-vivo における細胞の侵入性に有意に優れていることが確認された。

【0049】

<実施例 9>

ポリグリコール酸からなる不織布 3.0 mg 分を切り出し、ピンセットで均一にほぐして繊維状にし、円柱状 (半径約 8 mm、高さ約 3 mm) に成形したポリグリコール酸繊維 (A) とした。ポリ乳酸 (分子量 2 万、WAKO) をクロロホルムに溶解させた 5 重量%ポリ乳酸溶液を噴霧器 (YT-03、TORICON) に入れ、15 cm の距離から前記繊維体の表面に数秒間スプレーし、その後、凍結乾燥してクロロホルムを除去して、ポリグリコール酸に対して 20 重量%のポリ乳酸をコーティングしたポリグリコール酸繊維 (B) を得た。次いで、該ポリグリコール酸繊維 (B) を 0.1 トール未満の真空下、195 で 30 分間熱処理して、ポリ乳酸をコーティングした後熱処理したポリグリコール酸繊維 (C) を得た。

【0050】

このポリグリコール酸繊維 (C) を 24 ウェルプレート (coaster 3526, corning, NY) の中に入れ、次に、0.3 重量%の豚皮由来 I 型コラーゲン溶液 0.75 g を前記 24 ウェルプレートに添加した。次いで、該 24 ウェルプレートの内容物を -80 で 12 時間凍結した後、0.1 トール未満の真空下で 24 時間凍結乾燥を行った。その後、140、0.1 トール未満の真空下で 12 時間熱脱水架橋を行い、ポリグリコール酸/コラーゲン = 1.33 (重量比) である本発明の複合材料を得た。

【0051】

なお、上記ポリグリコール酸繊維 (A)、ポリ乳酸をコーティングしたポリグリコール酸繊維 (B)、およびポリ乳酸をコーティングした後熱処理したポリグリコール酸繊維 (

10

20

30

40

50

C)の各断面を、走査型電子顕微鏡を用いて観察した。結果を図15に示す。図15において、Aがポリグリコール酸繊維(A)であり、Bがポリグリコール酸繊維(B)であり、Cがポリグリコール酸繊維(C)である。図15の結果から、ポリグリコール酸繊維(C)には隣接繊維間に結合点が形成されていることが明らかであり、ポリ乳酸をコーティングした後熱処理することにより、コーティングされたポリ乳酸のみが融解・凝固し、隣接繊維間に結合点を形成できることが示された。

#### 【0052】

(マウス背部皮下へのインプラント試験4)

実施例9および実施例6(ポリグリコール酸繊維にポリ乳酸をコーティングした後熱処理する操作を行わないこと以外は、実施例9と同様)で得られた材料を用い、上記インプラント試験1と同様にして、試験片を作製しマウス背部皮下にインプラントした。そして、3日後および7日後に試験片を取り出し、マウス背部皮下へのインプラント試験1と同様の方法で力学的強度を評価した。結果を図16に示す。

#### 【0053】

図16の結果から、隣接繊維間に結合点を有するポリグリコール酸繊維を用いた材料は、隣接繊維間に結合点を有さないポリグリコール酸繊維を用いた材料に比べ、インプラント後に残存する体積が大きいことが明らかであった。これは、隣接繊維間に結合点を有するポリグリコール酸繊維を用いた材料は、隣接繊維間に結合点を有さないポリグリコール酸繊維を用いた材料に比べ、より力学的強度が高いことを示している。

#### 【0054】

(マウス背部皮下における脂肪再生試験)

足場材料として、実施例6で得られた材料とコラーゲン単独材料(コラーゲンスポンジ「ペルナック」グンゼ(株)製)とを用い、それぞれ10mm×10mm×3mmに切り出して、各足場材料にそれぞれ、ヒト由来脂肪前駆細胞と、塩基性線維芽細胞増殖因子を含浸したゼラチン粒子とを組み合わせ、マウス背部皮下にて脂肪を再生させた。

#### 【0055】

まず、ヒト由来脂肪前駆細胞は、京都大学にてインフォームドコンセントを得た患者の乳癌切除時に採取した脂肪組織から、次のようにして単離して得た。すなわち、前記脂肪組織をPBS(リン酸緩衝液)で洗浄し、コラゲナーゼ(新田セラチン社製)を用いて37℃で20分間処理した。その後、10重量%のウシ胎仔血清を含む培地(Medium 199)を加え、遠心分離(200g当たり5分間)を行い、上澄みを除去し、さらに、ウシ胎仔血清を含む培地を加え遠心分離する同様の操作を2回繰り返した。次いで、0.1μg/mlの塩基性線維芽細胞増殖因子を添加した培地を加え、細胞培養フラスコ(75cm<sup>2</sup>、CORNING 43072, 1×10<sup>3</sup> cells/cm<sup>2</sup>)にて5%CO<sub>2</sub>存在下、37℃で7日間培養して得た。

#### 【0056】

一方、塩基性線維芽細胞増殖因子を含浸したゼラチン粒子は、エマルジョン状態のゼラチン溶液にグルタルアルデヒド架橋を施して調製したゼラチン粒子2mgに対して、1μgの塩基性線維芽細胞増殖因子(50μl)を添加した後、1時間室温で放置することにより、ゼラチン粒子と塩基性線維芽細胞増殖因子とを結合させて得た。

次に、上記で得られた塩基性線維芽細胞増殖因子を含浸したゼラチン粒子に対して、1×10<sup>5</sup> cells/培地(50μl)の細胞密度のヒト由来脂肪前駆細胞を混合して懸濁液とし、該懸濁液を足場材料に加えて、3時間インキュベートした。

#### 【0057】

このようにして得られたヒト由来脂肪前駆細胞および塩基性線維芽細胞増殖因子を含浸したゼラチン粒子に各足場材料(実施例6の材料およびコラーゲン単独材料)を組み合わせ、この両試料を、それぞれ別のヌードマウス(BALB/c, 6w)の背部の一部を切り、そこからマウスの背部皮下に埋入した後、縫合した。そして、42日後に犠牲死させたのち、背部を切り開いて、試料を観察した。

コラーゲン単独材料を用いた試料をデジタルカメラで撮影したものを図17のAに、実

10

20

30

40

50

実施例 6 の材料を用いた試料をデジタルカメラで撮影したものを図 17 の B に、それぞれ示す。図 17 の結果から、どちらの試料とも、試料内に血管が侵入し、脂肪様の組織が形成されていることが確認できた。

【 0 0 5 8 】

また、両試料の残存体積を測定したところ、実施例 6 の材料を用いた試料の残存体積は  $36.9 \text{ mm}^3$  であるのに対し、コラーゲン単独材料を用いた試料の残存体積は  $26.8 \text{ mm}^3$  であった。これらの結果をグラフにして図 18 に示す。この結果から、実施例 6 の材料を用いた試料は、コラーゲン単独材料を用いた試料に比べ、その残存体積が有意に大きいことが明らかであった。これは、ポリグリコール酸繊維を含有させることによって、コラーゲンスポンジの低い力学強度を改善して、優れた力学特性を付与していることを示している。

10

【 0 0 5 9 】

上記マウス背部皮下における脂肪再生試験の結果から、ポリグリコール酸繊維は、コラーゲンの細胞親和性を損なうことなく材料強度を向上させ、しかも、繊維の残存は、その使用量が少ないため、脂肪組織の再生を妨げないことが明らかであった。その結果、本発明の材料は、より体積の大きな組織再生の足場として働き、再生された脂肪組織の体積を有意に増加させることが示された。なお、コラーゲン自体の生体分解吸収性は、ポリグリコール酸繊維の有無に関わらず同じであることも判っている。

【 0 0 6 0 】

【 産業上の利用可能性 】

20

本発明の生体組織再生用複合材料は、細胞との親和性に優れ、組織再生に要する期間には十分な力学的強度が保持でき、しかも組織再生後には速やかに分解消失させることができる適度な生体分解吸収性を兼ね備えたものである。例えば、皮膚、筋肉および脂肪等の軟組織、神経組織、軟骨組織、骨組織、肝臓や腎臓等の実質組織、食道や胃腸等の消化管、気管、膀胱、尿管および尿道等の泌尿器器官、歯周組織、腱、じん帯等の欠損部を再生させるため、細胞の増殖・分化を行なう際の足場材料として有用である。また、本発明の生体組織再生用複合材料は、幹細胞など種々の細胞の in-vitro における増殖・分化のための培養足場材料としても利用可能である。

【 0 0 6 1 】

【 図面の簡単な説明 】

30

【 図 1 】 実施例 1 で得られた複合材料の断面を走査型電子顕微鏡で撮影して得た図である。

【 図 2 】 比較例 1 で得られた材料の断面を走査型電子顕微鏡で撮影して得た図である。

【 図 3 】 収縮試験（培地中に細胞を含む場合）の結果を示すグラフである。

【 図 4 】 収縮試験（培地中に細胞を含まない場合）の結果を示すグラフである。

【 図 5 】 マウス背部皮下へのインプラント試験 1 における力学的強度の結果を示すグラフである。

【 図 6 】 マウス背部皮下へのインプラント試験 1 において比較例 1 の材料の細胞との親和性をみたときの H・E 染色像を示す図である。

【 図 7 】 マウス背部皮下へのインプラント試験 1 において実施例 1 の材料の細胞との親和性をみたときの H・E 染色像を示す図である。

40

【 図 8 】 マウス背部皮下へのインプラント試験 1 において実施例 3 の材料の細胞との親和性をみたときの H・E 染色像を示す図である。

【 図 9 】 マウス背部皮下へのインプラント試験 1 において実施例 4 の材料の細胞との親和性をみたときの H・E 染色像を示す図である。

【 図 10 】 マウス背部皮下へのインプラント試験 2 において比較例 2 の材料の細胞との親和性をみたときの H・E 染色像を示す図である。

【 図 11 】 マウス背部皮下へのインプラント試験 2 において実施例 2 の材料の細胞との親和性をみたときの H・E 染色像を示す図である。

【 図 12 】 マウス背部皮下へのインプラント試験 2 においてインプラント時の材料の残

50

存状態を撮影して得た図であって、図のAは比較例3の材料の残存状態を、図のBは比較例1の材料の残存状態を、それぞれ示す。

【図13】 マウス背部皮下へのインプラント試験3における材料に侵入した全細胞数の結果を示すグラフである。

【図14】 マウス背部皮下へのインプラント試験3における侵入した細胞の材料表面からの距離の結果を示すグラフである。

【図15】 実施例9における、ポリグリコール酸繊維(A)、ポリ乳酸をコーティングしたポリグリコール酸繊維(B)、およびポリ乳酸をコーティングした後195℃で30分間熱処理したポリグリコール酸繊維(C)の各断面を走査型電子顕微鏡で撮影して得た図であって、図のAはポリグリコール酸繊維(A)を、図のBはポリグリコール酸繊維(B)を、図のCはポリグリコール酸繊維(C)を、それぞれ示す。

10

【図16】 マウス背部皮下へのインプラント試験4における力学的強度の結果を示すグラフである。

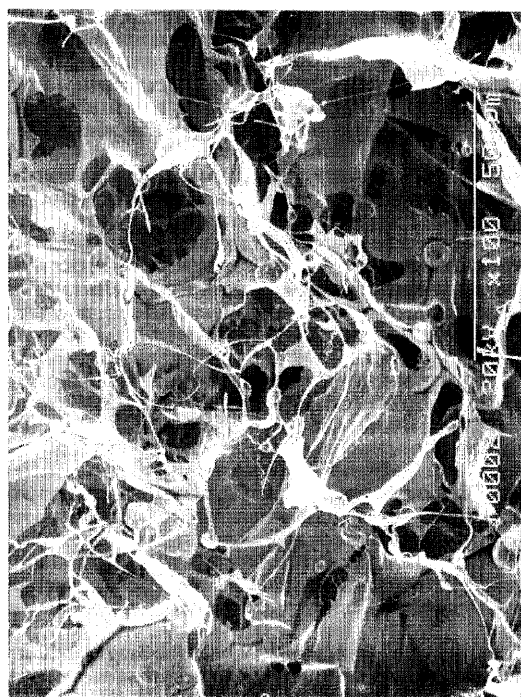
【図17】 マウス背部皮下における脂肪再生試験において試料の外観をデジタルカメラで撮影して得た図であって、図のAはコラーゲン単独材料を用いた試料の外観を、図のBは実施例6の材料を用いた試料の外観を、それぞれ示す。

【図18】 取り出した試料の残存体積の結果を示すグラフである。

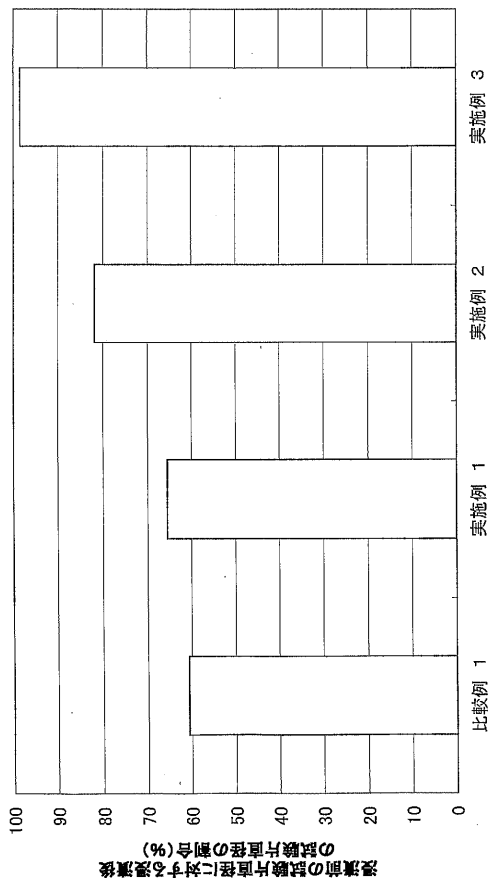
【図1】  
第1図



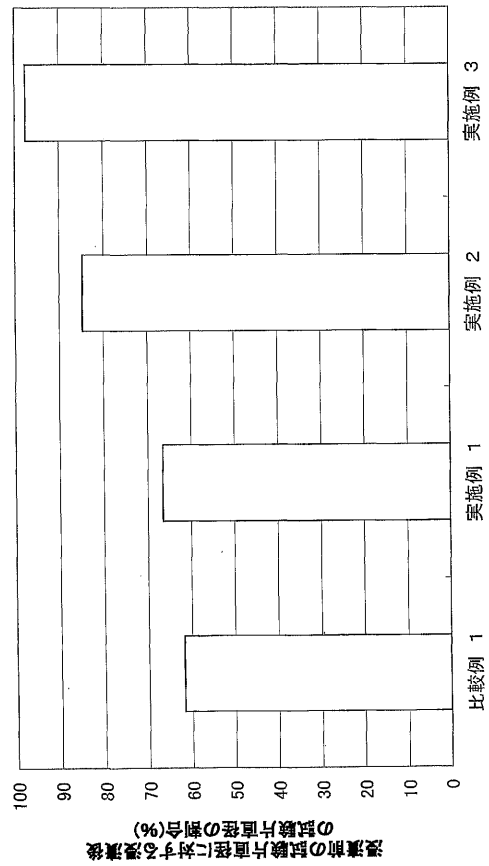
【図2】  
第2図



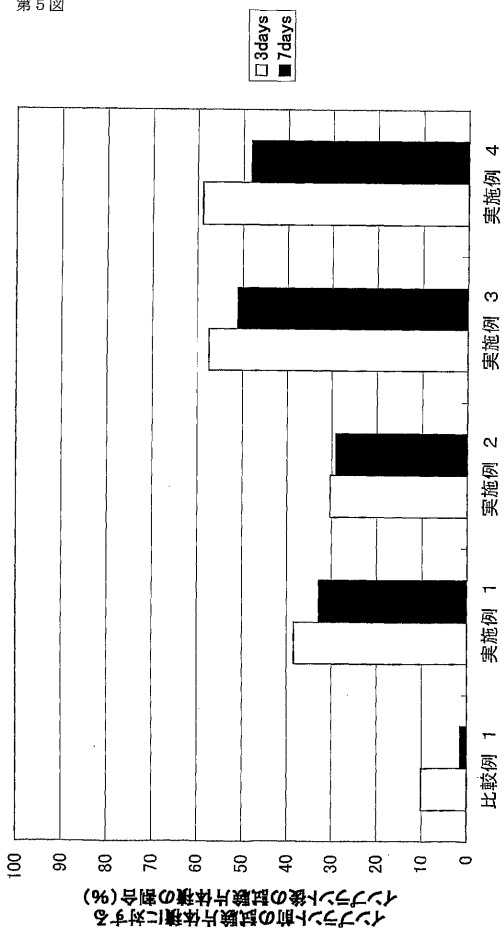
【図3】  
第3図



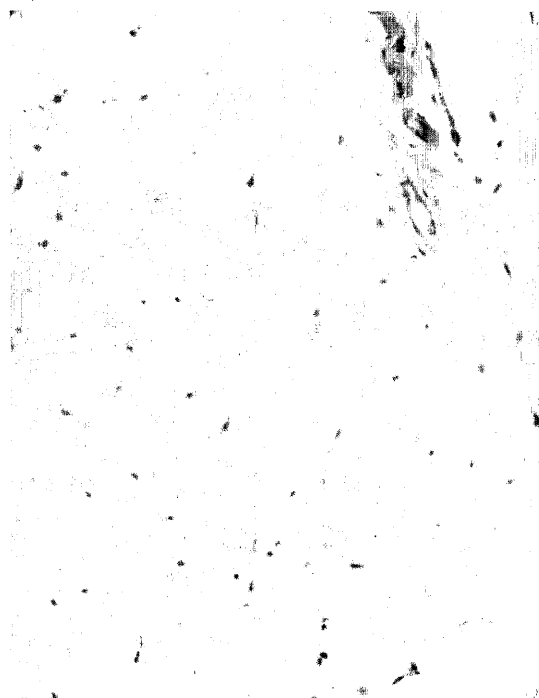
【図4】  
第4図



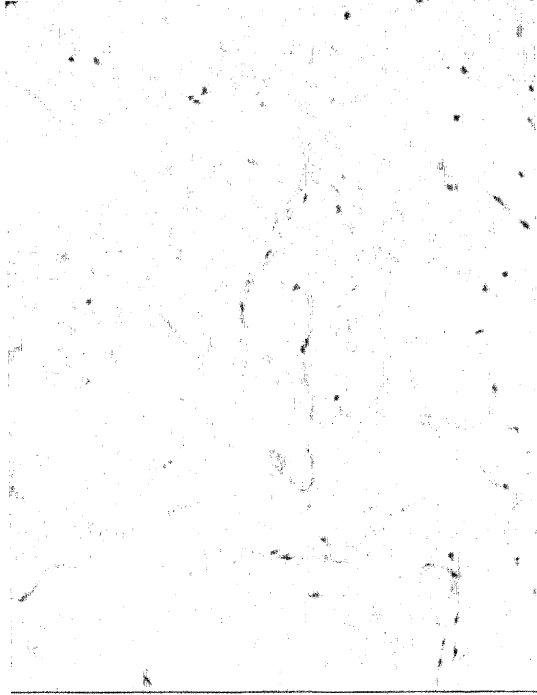
【図5】  
第5図



【図6】  
第6図



【 図 7 】  
第 7 図



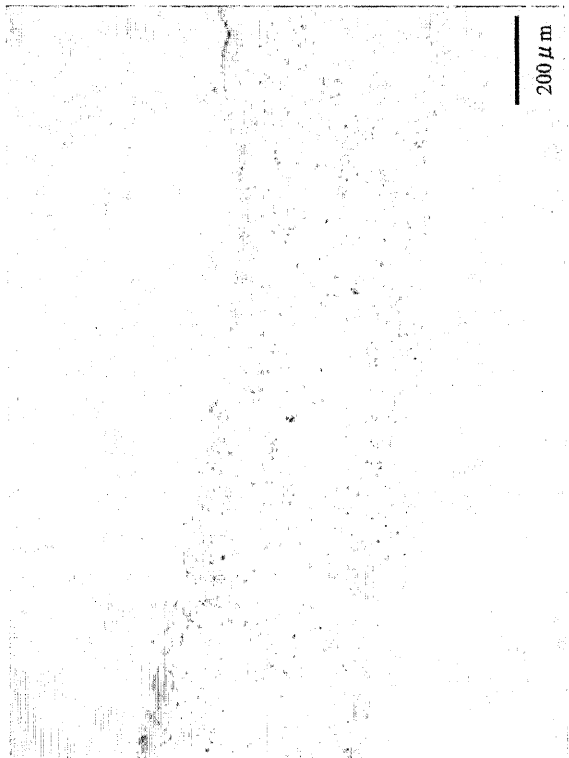
【 図 8 】  
第 8 図



【 図 9 】  
第 9 図



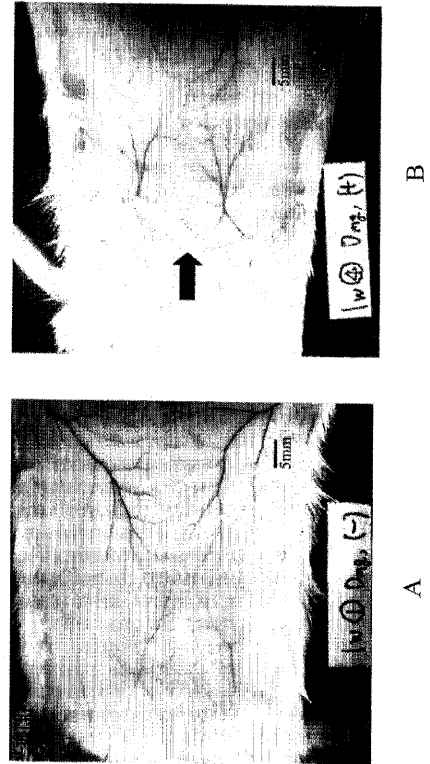
【 図 10 】  
第 10 図



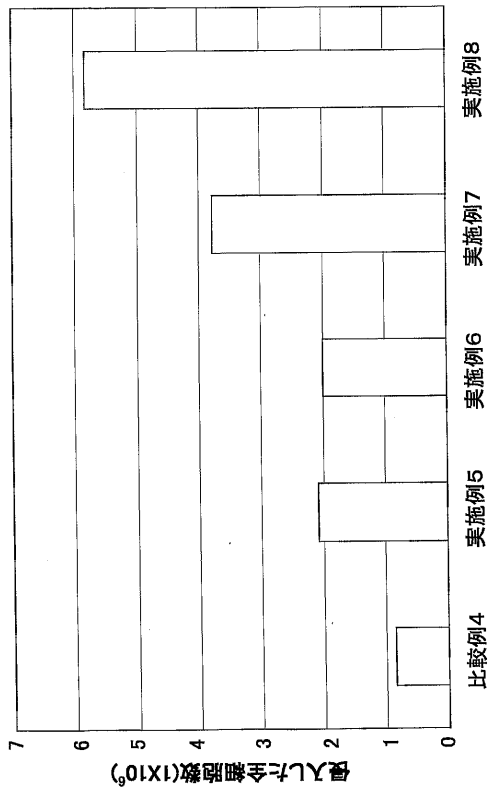
【図 1 1】  
第 1 1 図



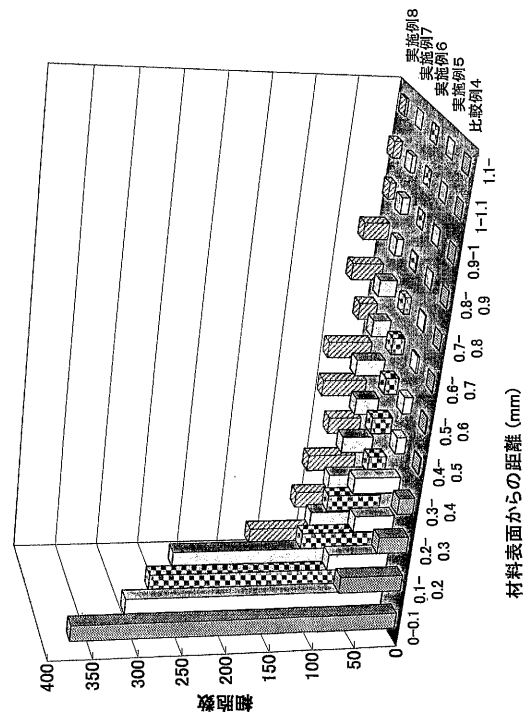
【図 1 2】  
第 1 2 図



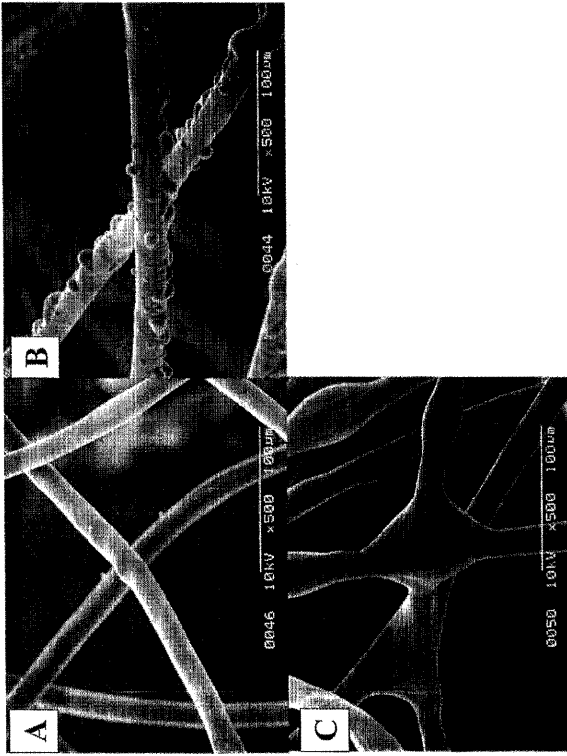
【図 1 3】  
第 1 3 図



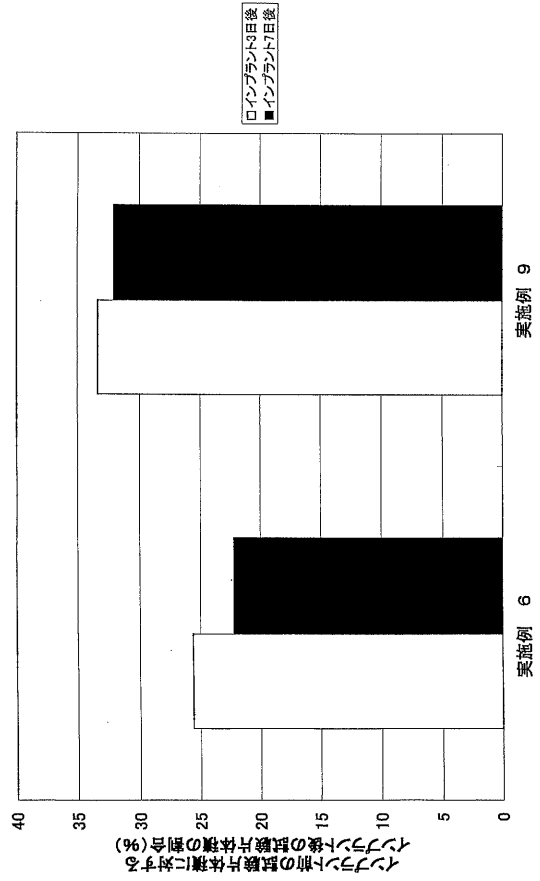
【図 1 4】  
第 1 4 図



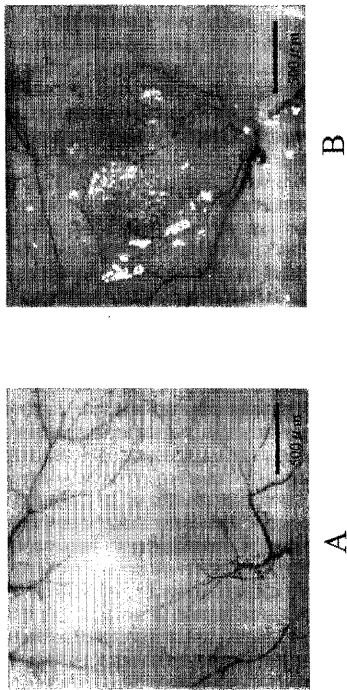
【 15 】  
第 15 図



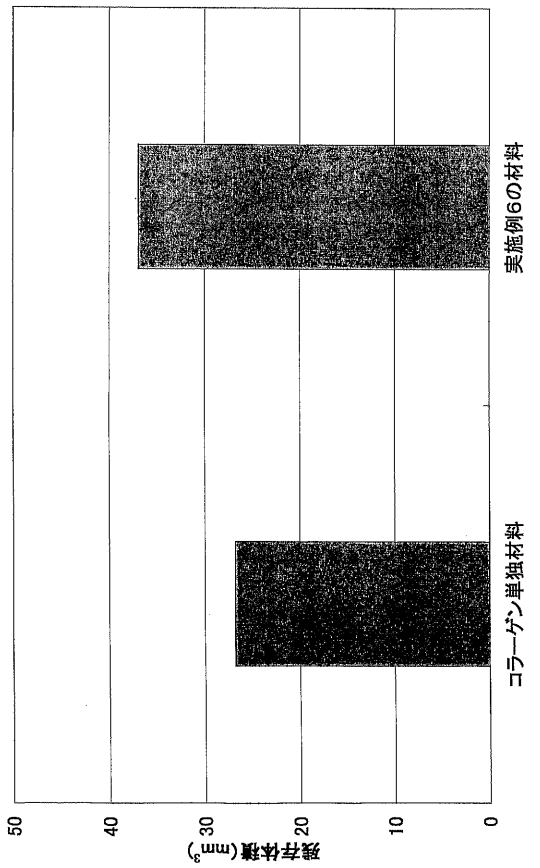
【 16 】  
第 16 図



【 17 】  
第 17 図



【 18 】  
第 18 図



---

フロントページの続き

(72)発明者 萬代 佳宣

大阪府八尾市二俣2丁目2番地 新田ゼラチン株式会社大阪工場内

審査官 八原 由美子

(56)参考文献 特開平03-023864(JP,A)

特開2000-060956(JP,A)

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

A61L 27/00