



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2018년10월17일
 (11) 등록번호 10-1909328
 (24) 등록일자 2018년10월11일

- (51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61L 27/36 (2006.01) *A61K 35/28* (2015.01)
A61L 27/12 (2006.01) *A61L 27/22* (2006.01)
A61L 27/26 (2006.01)
- (52) CPC특허분류
A61L 27/3616 (2013.01)
A61K 35/28 (2013.01)
- (21) 출원번호 10-2015-7000557
- (22) 출원일자(국제) 2013년05월17일
 심사청구일자 2016년08월08일
- (85) 번역문제출일자 2015년01월09일
- (65) 공개번호 10-2015-0040848
- (43) 공개일자 2015년04월15일
- (86) 국제출원번호 PCT/JP2013/063827
- (87) 국제공개번호 WO 2014/017147
 국제공개일자 2014년01월30일
- (30) 우선권주장
 JP-P-2012-167382 2012년07월27일 일본(JP)
- (56) 선행기술조사문헌
 US08070827 B2*
 W02010005917 A2*
 *는 심사관에 의하여 인용된 문헌

- (73) 특허권자
 가부시키가이샤 지씨
 일본국 도쿄도 분쿄구 혼고 3초메 2반 14고
- (72) 발명자
 사카이 유희로
 일본 1748585 도쿄도 이타바시쿠 하스누마쵸 76반 1고 가부시키가이샤 지씨 내
 야마나카 가즈유키
 일본 1748585 도쿄도 이타바시쿠 하스누마쵸 76반 1고 가부시키가이샤 지씨 내
 (뒷면에 계속)
- (74) 대리인
 장수길, 이석재

전체 청구항 수 : 총 15 항

심사관 : 정재철

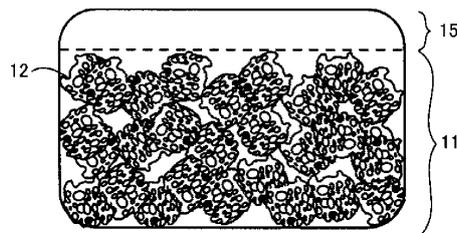
(54) 발명의 명칭 **조직 재생 컨스트럭트 및 조직 재생 컨스트럭트의 제조 방법**

(57) 요약

본 발명은 생착성이 우수하고, 대상 부위에 안정되고 양호한 재생을 촉진시키는 것을 가능하게 하는 조직 재생 컨스트럭트를 제공한다. 이식 재생 대상 부위에 적용되어 조직을 재생하는 부재인 조직 재생 컨스트럭트로서, 이식체 및 해당 이식체의 외표면 중 적어도 일부에 겹쳐서 배치되는 생착층을 갖고, 이식체는 지지체와, 지지체 사이의 공간 부분 및 지지체의 내측에 형성된 공공에 의한 공간 부분 중 적어도 한쪽에 배치된 조직을 재생하기 위한 세포와, 세포를 보유 지지하기 위한 기재를 갖고, 생착층의 기재는 젤 상태로 되어 있음과 함께, 생착층은 지지체가 존재하지 않는 층인 것으로 한다.

대표도 - 도1

10



(52) CPC특허분류

A61L 27/12 (2013.01)

A61L 27/22 (2013.01)

A61L 27/26 (2013.01)

(72) 발명자

야마모토 가츠시

일본 1748585 도쿄도 이타바시쿠 하스누마쵸 76반
1고 가부시키키가이샤 지씨 내

시게미츠 유스케

일본 1748585 도쿄도 이타바시쿠 하스누마쵸 76반
1고 가부시키키가이샤 지씨 내

가네코 다다시

일본 1748585 도쿄도 이타바시쿠 하스누마쵸 76반
1고 가부시키키가이샤 지씨 내

명세서

청구범위

청구항 1

이식 재생 대상 부위에 적용되어 조직을 재생하는 부재인 조직 재생 컨스트럭트로서,
 이식체 및 해당 이식체의 외표면 중 적어도 일부에 겹쳐서 배치되는 생착층을 갖고,
 상기 이식체는,
 지지체와,
 상기 지지체 사이의 공간 부분 및 지지체의 내측에 형성된 공공(空孔)에 의한 공간 부분 중 적어도 한쪽에 배치된 상기 조직을 재생하기 위한 세포를 갖고,
 상기 생착층은,
 상기 조직을 재생하기 위한 세포와,
 상기 세포를 보유 지지하고, 응고 반응에 의해 고분자화된 혈장 피브린을 함유하는 기재를 포함하고,
 상기 생착층의 상기 기재는 겔 상태로 되어 있음과 함께, 상기 생착층은 상기 지지체가 존재하지 않는 층이고,
 상기 생착층의 상기 세포는 0.2×10^4 세포/ mm^2 이상의 세포 밀도로 상기 생착층에 포함되는, 조직 재생 컨스트럭트.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 생착층에 포함되는 상기 세포는 세포 사이 기질이 분해되어 분산된 상태인 것을 특징으로 하는, 조직 재생 컨스트럭트.

청구항 3

삭제

청구항 4

제1항 또는 제2항에 있어서, 상기 생착층에 포함되는 기재는, 젤라틴, 콜라겐, 세포 외 매트릭스 단백질, 인공 단백질 및 펩티드 중에서 선택되는 적어도 하나인 것을 특징으로 하는, 조직 재생 컨스트럭트.

청구항 5

제1항 또는 제2항에 있어서, 상기 이식체에 포함되는 상기 세포 및 상기 생착층에 포함되는 상기 세포 중 적어도 한쪽의 세포가 미분화 간엽계 줄기 세포인, 조직 재생 컨스트럭트.

청구항 6

제1항 또는 제2항에 있어서, 상기 이식체에 포함되는 상기 세포 및 상기 생착층에 포함되는 상기 세포 중 적어도 한쪽의 세포가 분화 세포인, 조직 재생 컨스트럭트.

청구항 7

제1항 또는 제2항에 있어서, 상기 이식체에 포함되는 상기 세포 및 상기 생착층에 포함되는 상기 세포 중 적어도 한쪽의 세포가 줄기 세포로부터 분화 배양된 조직 전구 세포인, 조직 재생 컨스트럭트.

청구항 8

제1항 또는 제2항에 있어서, 상기 이식체의 상기 지지체가 히드록시아파타이트, 탄산 아파타이트, β -TCP(β -트리칼슘 포스페이트), OCP(옥타칼슘 포스페이트) 및 인산 칼슘으로부터 선택되는 적어도 하나를 함유해서 형성되

어 있는, 조직 재생 컨스트럭트.

청구항 9

제1항 또는 제2항에 있어서, 상기 이식체의 상기 지지체가, PLGA(폴리(락트-코-글리콜산)), PLLA(폴리-L-락트산), PLC(폴리락티드 카보네이트) 및 생체 친화성 인공 중합체 중에서 선택되는 적어도 하나를 함유해서 형성되어 있는, 조직 재생 컨스트럭트.

청구항 10

제1항 또는 제2항에 기재된 조직 재생 컨스트럭트를 제조하는 방법으로서, 틀 안에 상기 지지체를 배치하는 공정과, 상기 지지체를 배치한 상기 틀 안에, 상기 조직을 재생하는 상기 세포 및 해당 세포를 보유 지지하는 기재를 함유한 기재 현탁액을 상기 지지체의 상면보다 수위가 높아지도록 주입하는 공정과, 상기 기재를 겔 상태로 하는 공정을 포함하는, 조직 재생 컨스트럭트의 제조 방법.

청구항 11

제1항 또는 제2항에 기재된 조직 재생 컨스트럭트를 제조하는 방법으로서, 틀 안에, 상기 틀의 내면 중 적어도 하나에 상기 지지체가 접촉하는 일 없이 간극을 갖고서 상기 지지체를 배치하는 공정과, 상기 지지체를 배치한 상기 틀 안에, 상기 조직을 재생하는 상기 세포 및 해당 세포를 보유 지지하는 기재를 함유한 기재 현탁액을 주입하는 공정과, 상기 기재를 겔 상태화하는 공정을 포함하는, 조직 재생 컨스트럭트의 제조 방법.

청구항 12

제1항 또는 제2항에 기재된 조직 재생 컨스트럭트를 제조하는 방법으로서, 틀 안에 상기 이식체를 배치하는 공정과, 상기 이식체를 배치한 상기 틀 안에, 상기 조직을 재생하는 상기 세포 및 해당 세포를 보유 지지하는 기재를 함유한 기재 현탁액을 상기 지지체의 상면보다 수위가 높아지도록 주입하는 공정과, 상기 기재를 겔 상태로 하는 공정을 포함하는, 조직 재생 컨스트럭트의 제조 방법.

청구항 13

제1항 또는 제2항에 기재된 조직 재생 컨스트럭트를 제조하는 방법으로서, 틀 안에, 상기 틀의 내면 중 적어도 하나에 상기 이식체가 접촉하는 일 없이 간극을 갖고서 상기 이식체를 배치하는 공정과, 상기 이식체를 배치한 상기 틀 안에, 상기 조직을 재생하는 상기 세포 및 해당 세포를 보유 지지하는 기재를 함유한 기재 현탁액을 주입하는 공정과, 상기 기재를 겔 상태로 하는 공정을 포함하는, 조직 재생 컨스트럭트의 제조 방법.

청구항 14

제1항 또는 제2항에 있어서, 상기 생착층의 상기 세포의 세포 밀도가 0.5×10^4 세포/ mm^2 이상인, 조직 재생 컨스트럭트.

청구항 15

제1항 또는 제2항에 있어서, 상기 생착층의 상기 세포의 세포 밀도가 1.0×10^4 세포/ mm^2 이상인, 조직 재생 컨스

트럭트.

청구항 16

제1항 또는 제2항에 있어서, 상기 생착층의 상기 세포의 세포 밀도가 1.5×10^4 세포/ mm^2 이상인, 조직 재생 컨스트럭트.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 생체로부터 채취한 세포를 사용하여, 동물이나 인간의 조직을 유효하게 재생시키기 위해서 사용하는 조직 재생 컨스트럭트(construct) 및 그 제조 방법에 관한 것이다.

[0002] 여기서 「컨스트럭트」는 소정의 요소가 관련됨으로써 구성되는 구조체인 것을 의미한다.

배경 기술

[0003] 세포 배양 기술의 발달 및 의료의 발달에 의해, 종래의 약제나 인공 재료로는 치유가 어려운 대상 부위에 대하여, 줄기 세포를 비롯한 각종 세포를 사용한 조직 재생 치료를 적용함으로써, 유효하면서, 또한 단기간에 치유하는 방법에 대한 기대가 높아지고 있다. 대상이 되는 부위는, 생체에 원래 구비되어 있는 자연 치유력으로는 낮지 않는 대규모 조직 결손이다. 이러한 조직 재생이 필요한 부위(조직 재생 대상 부위)에 대해서는 세포와, 해당 세포를 담지 가능하면서, 또한 조직 재생의 공간을 형성하는 역할을 하는 지지체(스캐폴드)를 조합한 이식체를 적용하는 것이 알려져 있다(특허문헌 1 내지 3).

[0004] 이러한 이식체의 적용은 일정한 효과가 인정되고, 그것을 배경으로 이 분야의 연구(전 임상 동물 실험 및 임상 연구)가 활발히 행해지고 있다. 오늘날에는 조직 공학, 재생 의료라고 불리는 영역으로서, 대상으로 하는 질환이나 사용하는 세포의 다양성 등을 확장하면서 발전하고 있다.

선행기술문헌

특허문헌

- [0005] (특허문헌 0001) 일본 특허 공개 제2002-209573호 공보
- (특허문헌 0002) 일본 특허 공개 제2005-608호 공보
- (특허문헌 0003) 국제 공개 제02/40071호

발명의 내용

해결하려는 과제

[0006] 그러나, 특허문헌 1 내지 3에 기재된 바와 같은 종래의 기술로는, 치료의 효과가 기대한 만큼 얻어지지 않는 케이스가 존재한다. 조직 재생 대상 부위의 상태에 따라서는, 이식체의 생착이 양호하지 않고, 그 결과, 조직 재생 대상 부위와 이식체가 물리적, 생물학적으로 가교되지 않기 때문에, 치료 효과가 한정되거나, 또는 효과를 얻지 못하는 경우가 있었다.

[0007] 예를 들어, 골조직의 재생을 예로 들면, 조직 재생 대상 부위의 골수 조직이 노출되고, 출혈이 있으며, 혈관이나 골수 세포가 노출되어 있는(소위, 갓 생긴 상처 표면) 결손일 경우의 이식 시에는, 조직 재생 대상 부위측으로부터 이식체로의 생착 능력이 높아, 이식체와 조직 재생 대상 부위가 일체로 되고, 양호하게 조직 재생이 일어나는 것이 기대된다. 그러나, 재생 의료에 있어서 치유가 기대되는 대상은 이러한 부위에 한정되지 않는다. 조직이 손상을 입고 시간이 경과하여 위축성(atrophic)의 상태이거나, 혈관 등의 노출이 없는 조직 표면, 열이나 물리적, 화학적인 장애에 의해 표면의 일부 조직이 괴사해버린 표면, 물리적 형상의 영향으로 안정되기 어려운 상태에 있기도 하거나, 또는 이들이 혼재하는 일도 있다. 이러한 경우, 종래의 이식체로는 충분한 생착을 얻을 수 없는 경우가 많았다. 또한, 소위 갓 생긴 상처 표면과 같이, 조직 재생 대상 부위의 표면이 조직 재생에 바람직한 상황이었다고 하더라도, 결손의 사이즈가 큰 경우, 즉 재생을 기대하는 영역이 큰 경우에는 일반적

으로 신속한 생착이 실현되지 않으면 조직 재생이 곤란하다.

[0008] 이에 본 발명은 상기 문제점을 감안하여, 생착성이 우수하고, 대상 부위에 안정되고 양호한 재생을 촉진시키는 것을 가능하게 하는 조직 재생 컨스트럭트를 제공하는 것을 과제로 한다. 또한, 조직 재생 컨스트럭트의 제조 방법을 제공한다.

과제의 해결 수단

[0009] 본 발명자들은, 상기 과제를 해결하기 위해서, 다양한 각도에서 검토를 하고, 연구 개발을 행하였다. 그 결과, 조직 재생 대상 부위와 이식체와의 생착을 도모하기 위해서, 양자 간에 생착층을 개재한 형태가 되는 조직 재생 컨스트럭트로 하는 것이 유효한 것을 알아내어 본 발명을 완성시켰다. 이하, 본 발명에 대해서 설명한다.

[0010] 첫째로 본 발명은, 이식 재생 대상 부위에 적용되어 조직을 재생하는 부재인 조직 재생 컨스트럭트로서, 이식체 및 해당 이식체의 외표면 중 적어도 일부에 겹쳐서 배치되는 생착층을 갖고, 이식체는 지지체와, 지지체 사이의 공간 부분 및 지지체의 내측에 형성된 공공(空孔)에 의한 공간 부분 중 적어도 한쪽에 배치된 조직을 재생하기 위한 세포를 갖고, 생착층은 조직을 재생하기 위한 세포와, 세포를 보유 지지하기 위한 기재를 포함하고, 생착층의 기재는 겹 상태로 되어 있음과 함께, 생착층은 지지체가 존재하지 않는 층인, 조직 재생 컨스트럭트이다.

[0011] 상기 조직 재생 컨스트럭트에 있어서, 생착층에 포함되는 세포는 세포 사이 기질이 분해되어 분산된 상태여도 좋다.

[0012] 상기 조직 재생 컨스트럭트에 있어서, 생착층에 포함되는 기재는, 응고 반응에 의해 고분자화된 혈장 피브린을 함유할 수 있다.

[0013] 상기 조직 재생 컨스트럭트에 있어서, 생착층에 포함되는 기재는, 젤라틴, 콜라겐, 세포 외 매트릭스 단백질, 인공 단백질 및 펩티드 중에서 선택되는 적어도 하나여도 좋다.

[0014] 상기 조직 재생 컨스트럭트에 있어서, 이식체에 포함되는 세포 및 생착층에 포함되는 세포 중 적어도 한쪽의 세포가 미분화 간엽계 줄기 세포여도 좋다.

[0015] 상기 조직 재생 컨스트럭트에 있어서, 이식체에 포함되는 세포 및 생착층에 포함되는 세포 중 적어도 한쪽의 세포가 분화 세포여도 좋다.

[0016] 상기 조직 재생 컨스트럭트에 있어서, 이식체에 포함되는 세포 및 생착층에 포함되는 세포 중 적어도 한쪽의 세포가 줄기 세포로부터 분화 배양된 조직 전구 세포여도 좋다.

[0017] 상기 조직 재생 컨스트럭트에 있어서, 이식체의 지지체가, 히드록시아파타이트, 탄산 아파타이트, β -TCP(β -트리칼슘 포스페이트), OCP(옥타칼슘 포스페이트) 및 인산 칼슘 중에서 선택되는 적어도 하나를 함유해서 형성되어도 좋다.

[0018] 상기 조직 재생 컨스트럭트에 있어서, 이식체의 지지체가, PLGA(폴리(락트-코-글리콜산)), PLLA(폴리-L-락트산), PLC(폴리락티드 카보네이트) 및 생체 친화성 인공 중합체 중에서 선택되는 적어도 하나를 함유해서 형성되어도 좋다.

[0019] 둘째로 본 발명은, 상기 조직 재생 컨스트럭트를 제조하는 방법으로서, 틀 안에 지지체를 배치하는 공정과, 지지체를 배치한 틀 안에, 조직을 재생하는 세포 및 해당 세포를 보유 지지하는 기재를 함유한 기재 현탁액을 지지체의 상면보다 수위가 높아지도록 주입하는 공정과, 기재를 겹 상태로 하는 공정을 포함하는, 조직 재생 컨스트럭트의 제조 방법이다.

[0020] 셋째로 본 발명은, 상기 조직 재생 컨스트럭트를 제조하는 방법으로서, 틀 안에, 상기 틀의 내면 중 적어도 하나에 지지체가 접촉하는 일 없이 간극을 갖고서 지지체를 배치하는 공정과, 지지체를 배치한 틀 안에, 조직을 재생하는 세포 및 해당 세포를 보유 지지하는 기재를 함유한 기재 현탁액을 주입하는 공정과, 기재를 겹 상태로 하는 공정을 포함하는, 조직 재생 컨스트럭트의 제조 방법이다.

[0021] 넷째로 본 발명은, 상기 조직 재생 컨스트럭트를 제조하는 방법으로서, 틀 안에 이식체를 배치하는 공정과, 이식체를 배치한 틀 안에, 조직을 재생하는 세포 및 해당 세포를 보유 지지하는 기재를 함유한 기재 현탁액을 지지체의 상면보다 수위가 높아지도록 주입하는 공정과, 기재를 겹 상태로 하는 공정을 포함하는, 조직 재생 컨스트럭트의 제조 방법이다.

[0022] 다섯째로 본 발명은, 상기 조직 재생 컨스트럭트를 제조하는 방법으로서, 틀 안에, 상기 틀의 벽면 중 적어도

하나에 이식체가 접촉하는 일 없이 간극을 갖고서 이식체를 배치하는 공정과, 이식체를 배치한 틀 안에, 조직을 재생하는 세포 및 해당 세포를 보유 지지하는 기재를 함유한 기재 현탁액을 주입하는 공정과, 기재를 썬 상태로 하는 공정을 포함하는, 조직 재생 컨스트럭트의 제조 방법이다.

발명의 효과

[0023] 본 발명의 조직 재생 컨스트럭트에 의하면, 생착층이 조직 재생 대상 부위와 이식체와의 사이에 개재된 상태로 당해 대상 부위에 이식됨으로써, 생착이 촉진되어, 조직 재생 컨스트럭트와 조직 재생 대상 부위와의 물리적, 생물학적인 가교가 빠르게 이루어진다. 이에 의해, 이식체에 조직으로부터의 분화 등의 자극이 가해지는 것이나 조기의 혈관 조직 침윤이 기대되고, 조직 재생 대상 부위측으로부터의 영양이나 세포의 공급도 용이하게 되어, 안정되고 양호하면서, 또한 보다 광범위한 조직 재생을 도모하는 것이 가능하게 된다.

[0024] 또한, 본 발명의 조직 재생 컨스트럭트의 제조 방법에 의하면, 이러한 조직 재생 컨스트럭트를 효율적으로 제조할 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0025] 도 1은 일 형태에 관한 조직 재생 컨스트럭트(10)의 외관도이다.
 도 2의 (a)는 조직 재생 컨스트럭트의 제조 방법에 1을 설명하기 위한 한 장면을 도시하는 도면이다. 도 2의 (b)는 조직 재생 컨스트럭트의 제조 방법에 1을 설명하기 위한 다른 장면을 도시하는 도면이다.
 도 3은 조직 재생 컨스트럭트의 제조 방법에 1을 설명하기 위한 다른 장면을 도시하는 도면이다.
 도 4의 (a)는 조직 재생 컨스트럭트의 제조 방법에 2를 설명하기 위한 한 장면을 도시하는 도면이다. 도 4의 (b)는 조직 재생 컨스트럭트의 제조 방법에 2를 설명하기 위한 다른 장면을 도시하는 도면이다.
 도 5의 (a)는 조직 재생 컨스트럭트의 제조 방법에 2를 설명하기 위한 다른 장면을 도시하는 도면이다. 도 5의 (b)는 조직 재생 컨스트럭트의 제조 방법에 2를 설명하기 위한 다른 장면을 도시하는 도면이다.
 도 6의 (a)는 조직 재생 컨스트럭트의 제조 방법에 2를 설명하기 위한 다른 장면을 도시하는 도면이다. 도 6의 (b)는, 도 6의 (a)의 후에 있어서의 조직 재생 컨스트럭트의 제조 방법에 2를 설명하기 위한 다른 장면을 도시하는 도면이다.
 도 7은 다른 형태에 관한 조직 재생 컨스트럭트(20)의 외관도이다.
 도 8의 (a)는 조직 재생 컨스트럭트의 제조 방법에 3을 설명하기 위한 한 장면을 도시하는 도면이다. 도 8의 (b)는 조직 재생 컨스트럭트의 제조 방법에 3을 설명하기 위한 다른 장면을 도시하는 도면이다.
 도 9는 조직 재생 컨스트럭트의 제조 방법에 3을 설명하기 위한 다른 장면을 도시하는 도면이다.
 도 10은 다른 형태에 관한 조직 재생 컨스트럭트(30)의 외관도이다.
 도 11의 (a)는 조직 재생 컨스트럭트의 제조 방법에 4를 설명하기 위한 한 장면을 도시하는 도면이다. 도 11의 (b)는 조직 재생 컨스트럭트의 제조 방법에 4를 설명하기 위한 다른 장면을 도시하는 도면이다.
 도 12는 조직 재생 컨스트럭트의 제조 방법에 4를 설명하기 위한 다른 장면을 도시하는 도면이다.
 도 13의 (a)는 실시예 1의 결과를 설명하는 도면, 도 13의 (b)는 도 13의 (a)의 일부를 확대한 도면이다.
 도 14의 (a)는 비교예 1의 결과를 설명하는 도면, 도 14의 (b)는 도 14의 (a)의 일부를 확대한 도면이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0026] 본 발명의 상기한 작용 및 이득은, 다음에 설명하는 발명을 실시하기 위한 구체적인 내용으로부터 밝혀진다. 단, 본 발명은 이들 형태에 한정되는 것은 아니다.

[0027] <조직 재생 컨스트럭트(10)>

[0028] (조직 재생 컨스트럭트(10)의 구조)

[0029] 도 1은 일 형태에 관한 조직 재생 컨스트럭트(10)의 외관을 모식적으로 도시한 도면이다. 도 1로부터 알 수 있는 바와 같이 조직 재생 컨스트럭트(10)는, 이식체(11) 및 생착층(15)을 갖고 있다.

- [0030] 이식체(11)는 지지체(12) 및 조직 재생을 담당하는 세포를 포함하여 구성되어 있다.
- [0031] 지지체(12)는 그 내부에 세포를 보유 지지 가능한 다공질 구조를 가진 인공 또는 생체 유래의 고분자, 또는 인산 칼슘 등의 무기 재료에 의해 형성되어 있다. 예를 들어, 히드록시아파타이트, 탄산 아파타이트, β -TCP(β -트리칼슘 포스페이트), OCP(옥타칼슘 포스페이트), 인산 칼슘, PLGA(폴리(락트-코-글리콜산)), PLLA(폴리-L-락트산), PLC(폴리락티드 카보네이트) 및 생체 친화성 인공 중합체 등을 들 수 있다. 지지체를 구성하는 재료는 비흡수성이어도, 흡수성이어도 좋다. 비흡수성 재료의 경우에는 지지체 사이나 지지체 내부의 공공 부분에서 조직이 재생되고, 흡수성 재료의 경우에는 그에 더하여 지지체가 흡수해서 생긴 영역에도 조직이 재생된다.
- [0032] 따라서, 지지체(12)는 이식체(11)의 골격을 이루는 것인 점에서, 조직 재생 대상 부위의 형상에 맞추면 더욱 효율이 좋은 조직 재생을 행할 수 있다. 이러한 관점에서는 지지체(12)의 전체적인 형상은 특별히 한정되지는 않지만, 이식되는 조직 재생 대상 부위의 형상에 걸맞는 형상으로 할 수도 있다. 단, 범용적인 형태로서 입방체, 직육면체, 반구, 원판, 기둥 형상 등, 각종 기본적인 형상이 준비되어 있어도 좋다. 또한, 지지체의 최소부의 두께는 바람직하게는 2.2mm 내지 100mm, 더욱 바람직하게는 3mm 내지 100mm이다. 본 발명에서는 이러한 큰 형상도 가능하고, 조직 재생 대상 부위가 큰 경우에도 적절하게 대응할 수 있다.
- [0033] 또한 지지체는, 소정의 입도로까지 미세하게 입자상으로 된 과립 형상이 집합한 것이어도 좋고, 소정의 형상을 갖는 블록 형상이어도 좋다. 이하에 예로서 과립 형상이 집합한 지지체의 일례, 및 블록 형상의 지지체의 일례의 구성을 각각 설명한다.
- [0034] 과립 형상이 집합한 것인 일례로서의 지지체(12)는 각 입자가 다공질 형상인 것이어도, 공공을 갖지 않은 치밀체여도 좋다. 다공질 형상의 과립인 경우, 각 입자에 포함되는 공공의 평균 구멍 직경은 50 μ m 내지 500 μ m인 것이 바람직하다. 공공을 갖지 않은 치밀체 및 공공을 가진 입자여도, 무수한 과립 사이에 형성되는 간극에 의해 공간이 형성되고, 이것이 다공질 형상의 공공과 마찬가지로 기능한다.
- [0035] 다공질 형상이든 치밀체인 것이든, 과립 직경은 300 μ m 내지 2000 μ m인 것이 바람직하다. 또한, 과립을 적당한 용기에 가득 넣었을 경우의 과립 사이 및 과립 내부의 공공의 체적의 합이 동 용기의 용적에 대한 비율(충전시의 공공률)은 40% 내지 90%인 것이 바람직하다. 또한, 이 충전시의 공공률은 X선 CT 촬영 데이터를 사용한 3차원 형태 해석에 의해 산출할 수 있다.
- [0036] 블록 형상인 일례로서의 지지체(12)는 다공질체이다. 그 구멍 직경은 180 μ m 내지 3500 μ m, 평균 구멍 직경이 350 μ m 내지 2000 μ m의 연통된 소직경 구조를 갖고, 기공률이 60% 내지 95%로 되어 있는 것이 바람직하다. 또한, 지지체의 압축 강도는 0.05MPa 이상이 되도록 구성되어 있는 것이 바람직하다. 여기서, 지지체 구멍의 구멍 직경이란, 10 μ m를 하회하는 액체만을 통과시키는 미소 기공은 고려하지 않고, 지지체 전체에 있어서 10 μ m 이상의 기공의 80% 이상이 구멍 직경 180 μ m 내지 3500 μ m인 것을 의미하고 있다. 또한, 「기공률」은, 지지체에 사용된 원료 덩어리의 중량에 대한 동 체적의 지지체의 중량으로부터 산출할 수 있다.
- [0037] 이식체(11)에 포함되는 세포는, 지지체(12) 내에 포함되어서 목적으로 하는 조직 재생에 적합한 것이라면 특별히 한정되는 경우는 없다. 예를 들어, 뼈, 연골, 지방 조직의 재생을 도모하는 경우에는, 그것들로 분화되는 능력을 가진 미분화 간엽계 줄기 세포 등의 줄기 세포, 간엽계 등의 줄기 세포로부터 분화 배양된 조직 전구 세포, 또는 재생하고자 하는 조직을 통상 구성하고 있는 분화 세포 등을 사용할 수 있다.
- [0038] 지지체(12)의 내부 또는 외주 표면의 세포는 그것 자체 단독으로, 또는 외부로부터 침입해 온 혈관 등의 세포와 공동으로 지지체(12)가 확보한 공간에 재생 조직을 구축한다.
- [0039] 생착층(15)은 이식체(11)의 외표면 중 적어도 일부에 겹쳐서 배치된 층으로, 지지체(12)를 포함하지 않고, 그 분세포가 기재에 높은 밀도로 분산, 보유 지지된 층이다. 생착층(15)은 세포와 기재와의 혼합물(통상은 배양액과의 혼합액)로서, 기재가 젤 상태로 되어 있다. 조직 재생 컨스트럭트를 조직 재생 대상 부위에 적용했을 때, 이 생착층이 조직 재생 대상 부위에 있어서의, 생착을 촉진해서 조직이 재생되어야 할 표면의 적어도 일부에 접촉해서 배치된다.
- [0040] 생착층(15)에 포함되는 세포의 종류는, 이식체(11)에 포함되는 세포와 마찬가지로이다. 단, 생착층(15)에 포함되는 세포는 효소 처리 등에 의해, 세포 사이를 연결 고정하고 있는 단백질(세포간 기질)을 분해해서 풀어, 분산된(분해한) 세포이다. 여기에서 말하는 분산이란, 반드시 전부가 단일 상태에서 분산된 세포일 필요는 없다. 이렇게 분산된 세포를 생착층(15)에 포함함으로써, 조직 재생 컨스트럭트(10)의 생착을 촉진할 수 있다.
- [0041] 이것은, 분산된 세포는 기재 중을 자유롭게 유주(遊走) 가능하고, 그것에 의해, 생착층(15) 내의 세포가 조직

재생 대상 부위 및 이식체(11)의 방향으로 증생(아웃그로스)하는 것이 가능하게 됨에 따른 것이다. 그리고, 이에 의해 이식체(11)와 조직 재생 대상 부위가 생착하고, 이식체(11)와 조직 재생 대상 부위가 가교된다.

- [0042] 이러한 관점에서, 보다 효율이 높은 생착의 촉진을 위해서, 단일로 분산된 세포가 많은 쪽이 바람직하다.
- [0043] 생착층(15)에 포함되는 기제는, 세포를 높은 밀도로 생착층에 분산, 보유 지지하는 기능을 갖고, 겔 상태로 하기(이후, 간단히 「겔 상태화」라고 표현하는 경우가 있음) 전의 상태는 액상이다. 기제의 재료로는, 피브린(재응고반응에 의해 고분자화된 혈장 피브린(PRP(Platelet rich plasma), PPP(Platelet Poor Plasma) 및 피브린 풀을 포함), 젤라틴, 콜라겐, 기타 세포 외 매트릭스 단백질(매트리겔 등), 인공 단백질 및 펩티드를 수용액으로 하여(통상은 배양액에 더해서) 사용할 수 있다. 모두 겔 상태화 가능한 것이고, 최종적으로 조직 재생 컨스트럭트로 되었을 때에는 겔 상태화되어 있다. 그리고, 이 겔 상태화에 의해 기제는 수축한다. 생착층(15)에는 지지체를 포함하지 않는 것 외에, 이 수축에 의해, 생착층(15) 내의 세포 밀도가 상승함으로써, 생착층(15) 내의 높은 세포 밀도를 유지할 수 있고, 생착층으로서의 능력 향상을 기대할 수 있다. 또한, 이 겔 상태화에 의해, 조직 재생 컨스트럭트는 사용시에 있어서 유동성을 갖지 않은 상태로 되고, 조직 재생 대상 부위에 안정되게 적용하는 것이 가능하게 된다.
- [0044] 생착층(15)의 두께는 0mm보다 크고, 1mm 이하가 바람직하고, 보다 바람직하게는 0.5mm 이하, 더욱 바람직하게는 0.2mm 이하이다. 또는, 생착층(15)의 두께 t의 방향과 동일한 방향의 이식체(11)의 크기 T에 대하여 t/T가 0.03 내지 1.0인 것이 바람직하다. 더욱 바람직하게는 0.03 내지 0.5이다.
- [0045] 생착층(15)의 세포 밀도는, 조직 재생 대상 부위와의 접촉 면적당 세포 밀도가 높을수록 좋고, 0.2×10^4 세포/ mm^2 이상이 바람직하고, 보다 바람직하게는 0.5×10^4 세포/ mm^2 이상, 더욱 바람직하게는 1.0×10^4 세포/ mm^2 이상, 가장 바람직하게는 1.5×10^4 세포/ mm^2 이상이다.
- [0046] 생착층(15)에는 지지체(12)가 존재하지 않고, 세포가 고밀도로 존재하는 점에서, 그것들이 산생하는 액성 인자(성장 인자 등의 단백질)의 국소 농도도 높기 때문에, 조직 재생 대상 부위로부터의 세포 동원의 촉진, 및 그것들에 대한 활성화 자극을 부여하는 것도 가능하다.
- [0047] 이상 설명한 조직 재생 컨스트럭트(10)에 있어서, 이식체(11)와 생착층(15)은 일체로 제작해서 조직 재생 컨스트럭트(10)로 해도 좋고, 생착층(15)만을 미리 어느 한쪽 부위(예를 들어, 조직 재생 대상 부위여도 좋음)의 표면에 설치해 두고, 거기에 이식체(11)를 직접 접촉시켜서 조직 재생 컨스트럭트(10)로 해도 좋다. 이하에 조직 재생 컨스트럭트(10)의 제조 방법의 예를 설명한다.
- [0048] (조직 재생 컨스트럭트의 제조 방법에 1)
- [0049] 도 2, 도 3에 조직 재생 컨스트럭트(10)의 제조 방법에 1을 설명하는 개념 도를 도시하였다.
- [0050] 도 2의 (a)에 도시한 바와 같이, 과립 형상의 지지체(12)를 소정의 체적이 되도록 틀(4) 안에 넣어 둔다.
- [0051] 이어서, 조직 재생에 사용하는 세포를 기제에 분산시킨 현탁액(기제 현탁액)을 틀(4) 안에 주입한다. 그 때, 도 2의 (b)에 도시한 바와 같이, 틀(4) 내에 배치된 지지체(12)의 상면보다도 현탁액의 상면 쪽이 높아지도록 주입한다. 이에 의해, 틀(4) 내 중의 하부는 지지체(12)와 현탁액 층이 되고, 상부는 지지체(12)가 존재하지 않는 현탁액만의 층이 된다.
- [0052] 지지체(12) 사이나 지지체(12)의 내부 구멍에 현탁액이 널리 퍼지도록 잘 교반(피펫팅)한다.
- [0053] 이어서, 기제의 겔 상태화를 행한다. 예를 들어, 기제의 재료로서 혈장 피브린을 사용한 경우에는, 염화 칼슘 수용액, 경우에 따라서는 트롬빈 수용액을 첨가해서 교반(피펫팅)한다. 이에 의해 겔 상태화된다. 또한, 기제의 재료로서 콜라겐, 매트릭겔, 젤라틴을 사용하는 경우에는 온도를 조정함으로써 겔 상태화시킨다. 콜라겐, 매트릭겔에 대해서는 37℃ 부근, 젤라틴에 대해서는 4℃ 부근으로 조정함으로써 겔 상태화가 가능하다.
- [0054] 이러한 겔 상태화에 의해, 도 3에 도시한 바와 같이 상기 수축이 일어나고, 생착층 내의 세포 밀도가 상승한다. 또한, 겔 상태화에 의해 3차원 그물눈에 세포를 가두기 때문에 세포가 보유 지지된다. 도 3에 도시한 과선은 겔 상태화 전의 기제 현탁액의 수위이다. 이렇게 겔 상태화에 의해 수축이 일어나는 것을 알 수 있다.
- [0055] 이에 의해 틀(4) 내에, 상부가 겔 상태화된 기제와 세포를 포함하는 생착층(15)이고, 하부가 지지체(12), 세포, 기제를 포함하는 이식체(11)인, 조직 재생 컨스트럭트(10)가 완성된다. 본 예에서는 이식체(11)와 생착층(15)의 세포 및 기제는 동일한 것이 된다.

- [0056] (조직 재생 컨스트럭트의 제조 방법에 2)
- [0057] 다음으로 조직 재생 컨스트럭트(10)의 제조 방법의 다른 예(조직 재생 컨스트럭트의 제조 방법에 2)를 설명한다.
- [0058] 이 방법은, 생착층(15)만을 미리 조직 재생 대상 부위의 표면에 설치해 두고, 거기에 이식체(11)를 직접 접촉시켜서 조직 재생 대상 부위에서 조직 재생 컨스트럭트(10)를 제작하는 방법이다.
- [0059] 본 방법에서는 미리 과립 형상의 집합인 지지체와 세포의 기재 현탁액을 균일하게 분산 혼합시키고, 겔 상태화 등의 방법에 의해 일체로 해서 성형해 둔 것, 또는, 미리 다공질 블록 형상의 지지체 내부 구멍에 세포를 도입해 둔 것을 준비해 두고, 이것을 이식체(11)로 한다. 이식체(11)는 세포를 도입한 상태에서 배양을 거친 것이어도 좋다.
- [0060] 여기서 「과립 형상의 집합인 지지체와 세포의 기재 현탁액을 균일하게 분산 혼합시키고, 겔 상태화 등의 방법에 의해 성형해 둔 것」의 제작은, 예를 들어 조직 재생 컨스트럭트의 제조 방법에 1에서 설명한 바와 같이, 틀에 넣은 과립 형상의 집합인 지지체에 현탁액을 주입하고, 조직 재생 컨스트럭트의 제조 방법에 1과 같이 겔 상태화함으로써 형성할 수 있다. 그때에는 과립 형상의 집합인 지지체의 상면과 주입한 현탁액의 상면의 위치를 대략 동일하게 하면 이식체만을 제작할 수 있다.
- [0061] 또한, 조직 재생 컨스트럭트의 제조 방법에 1에서 형성한 조직 재생 컨스트럭트(10)를 그대로 사용해도 좋다.
- [0062] 「다공질 블록 형상의 지지체 내부 구멍에 세포를 도입해 둔 것」에 대해서는, 세포는 지지체 내에 균일하게 분산되어 있는 것이 바람직하고, 그러기 위해 압입, 탈포 및 기타의 방법을 사용할 수 있다. 구체적으로는, 예를 들어 다음과 같이 제작할 수 있다. 도 4, 도 5에 제작의 과정을 설명하기 위한 모식도를 도시하였다.
- [0063] 먼저, 도 4의 (a)에 도시한 바와 같이, 물에 대한 접촉각이 15° 내지 90° 인 수지판 또는 유리판인 보유 지지판(5) 상에 지지체(12)를 적재한다.
- [0064] 다음으로 도 4의 (b)에 도시한 바와 같이 지지체(12)에 기재 현탁액을, 예를 들어 적하나 주입 등의 방법으로 도입한다. 이에 의해, 도 5의 (a)에 도시한 바와 같이, 현탁액이 지지체(12) 내에 침투함과 함께, 지지체(12)가 현탁액에 의해 전체가 채워진 상태로 된다.
- [0065] 또한, 도 5의 (a)에서 도시한 상태로부터, 보유 지지판(5)이 위, 현탁액이 포함된 지지체(12)가 아래가 되도록 반전시켜, 도 5의 (b)에 도시된 바와 같은 자세로 한다. 즉, 중력 방향으로부터 볼 때, 보유 지지판(5)이 지지체(12)의 상측이 되고, 또한 보유 지지판(5)의 무게가 지지체(12)에 가해지지 않은 상태로 기재 중에서 정지시킨다. 이 상태에서 정지를 유지하고, 도입된 세포를 지지체(12)의 구멍의 내벽에 접촉시켜서 과종이 완료된다. 이에 의해 이식체(11)를 제작할 수 있다. 지지체(12)에 세포를 접촉시키기 위해서 기재 중에서 정지시키는 시간은, 지지체(12)의 재질이나 과종하는 세포의 종류에 따라 상이하지만, 20분 내지 300분이다.
- [0066] 한편, 상기한 이식체(11)와는 별도로, 생착층(15)이 되는 부재를 제작해 둔다. 이것은 생착층(15)에 사용하는 세포를 기재에 분산시킨 기재 현탁액을 준비해서 필요한 면적, 두께가 되도록 틀에 유입한다. 그 후, 기재의 겔 상태화 조작을 행한다. 겔 상태화는 조직 재생 컨스트럭트의 제조 방법에 1과 마찬가지로의 방법으로 행할 수 있다. 이에 의해 생착층(15)이 되는 부재가 이식체(11)와는 별도로 제조된다.
- [0067] 이상과 같이, 이식체(11)와 생착층(15)을 별도로 준비해 두고, 조직 재생 대상 부위를 노출시켜, 여기에 조직 재생 컨스트럭트(10)를 형성한다. 도 6에 설명을 위한 도면을 도시하였다. 도 6의 (a)에 도시한 바와 같이, 노출시킨 조직 재생 대상 부위 중 생착을 촉진해서 조직을 재생해야 할 표면의 적어도 일부에 상기 제작한 생착층(15)을 처음에 배치한다. 다음으로 도 6의 (b)에 도시한 바와 같이, 배치한 생착층(15) 위에 제작해 둔 이식체(11)를 올려, 조직 재생 대상 부위 위에서 조직 재생 컨스트럭트(10)를 완성시킨다. 본 예에 의해 제조한 조직 재생 컨스트럭트(10)는, 이식체(11)의 세포 및 생착층(15)의 세포의 종류는 동일해도 좋고, 상이해도 좋다. 또한, 본 예에 의해 제조한 조직 재생 컨스트럭트(10)에서는, 이식체(11) 및 생착층(15)에 포함되는 기재의 종류에 대해서도 동일해도 좋고, 상이해도 좋다.
- [0068] 또한, 본 예에서는, 조직 재생 대상 부위에 직접 조직 재생 컨스트럭트를 형성하는 예를 설명했지만, 반드시 조직 재생 대상 부위에 직접일 필요는 없고, 예를 들어 틀 안이나 어떠한 판 위에서 마찬가지로 조직 재생 컨스트럭트를 제작할 수도 있다.
- [0069] <조직 재생 컨스트럭트(20)>

- [0070] (조직 재생 컨스트럭트(20)의 구조)
- [0071] 도 7에는, 다른 형태에 관한 조직 재생 컨스트럭트(20)의 외관을 모식적으로 도시하였다.
- [0072] 도 7로부터 알 수 있는 바와 같이, 조직 재생 컨스트럭트(20)도 이식체(21) 및 생착층(25)을 갖고 있다. 조직 재생 컨스트럭트(20)는, 이식체(21)의 외표면 중 복수의 면에 생착층(25)이 형성되어 있다. 생착층(25)이 형성되는 이식체(21)의 외표면은 특별히 한정되지 않고, 모든 면이어도 좋고, 일부의 복수의 면이어도 좋다.
- [0073] 이식체(21), 생착층(25)을 구성하는 재료에 대해서는 상기한 이식체(11), 생착층(15)과 마찬가지로이다.
- [0074] 조직 재생 컨스트럭트(20)를 제작하는 방법은 특별히 한정되지는 않지만, 예를 들어 다음과 같이 제작할 수 있다.
- [0075] (조직 재생 컨스트럭트의 제조 방법 예 3)
- [0076] 도 8, 도 9에 조직 재생 컨스트럭트의 제조 방법 예 3에 대해서 설명하는 도면을 도시하였다.
- [0077] 본 방법 예 3에서는, 미리 과립 형상의 집합인 지지체와 세포의 기재 현탁액을 균일하게 분산 혼합시키고, 겔 상태화 등의 방법에 의해 일체로 성형해 둔 것, 또는, 미리 다공질 블록 형상의 지지체의 내부 구멍에 세포를 도입해 둔 것을 준비해 두고, 이것을 이식체(21)로 한다. 이식체(21)는 세포를 도입한 상태에서 배양을 거친 것 이어도 좋다. 이들 이식체(21)의 제작은, 상기한 조직 재생 컨스트럭트의 제조 방법 예 2에서 설명한 이식체(11)의 제조 방법예와 마찬가지로 행할 수 있다. 또는, 조직 재생 컨스트럭트의 제조 방법 예 1에서 제작한 조직 재생 컨스트럭트(10)를 그대로 사용해도 좋다.
- [0078] 제작한 이식체(21)를 해당 이식체(21)의 높이 보다도 깊이가 깊은 틀(4) 안으로 넣는다. 도 8의 (a)에 모식적으로 도시하였다. 이때, 생착층(25)을 형성하려고 하는 면은 틀(4)의 벽면과의 사이에 간극을 형성해 두는 한편, 생착층(25)을 형성하지 않는 면은 틀(4)의 내면에 접촉하도록 이식체(21)를 배치한다. 틀(4)의 내면 중 저면에 대향하는 이식체(21)의 외표면에 생착층(25)이 필요한 경우에는, 틀(4)의 저면으로부터 이식체(21)를 점 또는 선으로 지지하는 지주를 사용할 수 있다. 또는 핀셋과 같은 것으로 이식체(21)를 위에서 파지하여, 틀(4)의 저면으로부터 이식체(21)를 뜨게 한 상태를 유지해도 좋다.
- [0079] 그 후, 생착층(25)에 사용하는 세포를 분산시킨 기재 현탁액을 틀(4) 내에 주입한다. 도 8의 (b)에 모식적으로 도시하였다. 현탁액에 잠겨 있는 높이까지 생착층(25)이 형성되기 때문에, 현탁액의 양을 이식체(21)의 높이 보다도 높아지도록 설정하면, 지지체(21)의 상면측에도 생착층(25)을 형성할 수 있다. 이렇게 필요에 따라서 생착층(25)을 설정한다.
- [0080] 그 후, 기재의 겔 상태화 조작을 실시한다. 겔 상태화는 상기 조직 재생 컨스트럭트의 제조 방법 예 1에서 설명한 방법과 마찬가지로의 방법을 적용하는 것이 가능하다.
- [0081] 이러한 겔 상태화에 의해, 도 9에 도시한 바와 같이 상기 수축이 일어나고, 생착층 내의 세포 밀도가 상승한다. 또한, 겔 상태화에 의해 3차원 그물눈에 세포를 가두기 때문에 세포가 보유 지지된다. 도 9에 도시한 과선은 겔 상태화 전의 기재 현탁액의 수위이다. 이렇게 겔 상태화에 의해 수축이 일어나는 것을 알 수 있다.
- [0082] 이상에 의해, 이식체(21) 주위의 임의의 면에 생착층(25)이 형성된 조직 재생 컨스트럭트(20)를 효율적으로 제조할 수 있다. 본 예에 의해 제작한 조직 재생 컨스트럭트(20)에서는, 이식체(21) 및 생착층(25)에 포함되는 세포의 종류는 동일해도 좋고, 상이해도 좋다. 또한, 본 예에 의해 제조한 조직 재생 컨스트럭트(20)에서는, 이식체(21) 및 생착층(25)에 포함되는 기재의 종류에 대해서도 동일해도 좋고, 상이해도 좋다.
- [0083] <조직 재생 컨스트럭트(30)>
- [0084] (조직 재생 컨스트럭트(30)의 구조)
- [0085] 도 10에는, 다른 형태에 관한 조직 재생 컨스트럭트(30)의 외관을 모식적으로 도시하였다. 도 10으로부터 알 수 있는 바와 같이, 조직 재생 컨스트럭트(30)도 이식체(31) 및 생착층(35)을 갖고 있다. 조직 재생 컨스트럭트(30)는 이식체(31)의 외표면 중 복수의 면에 생착층(35)이 형성되고, 적어도 하나의 면에는 생착층이 형성되어 있지 않다. 생착층(35)이 형성되는 이식체(31)의 외표면은 특별히 한정되지는 않고, 하나의 면을 제외한 모든 면이어도 좋고, 그 밖에도 생착층이 형성되어 있지 않은 면이 있어도 좋다.
- [0086] 이식체(31), 생착층(35)을 구성하는 재료에 대해서는 상기한 이식체(11), 생착층(15)과 마찬가지로이다.

- [0087] 조직 재생 컨스트럭트(30)를 제작하는 방법은 특별히 한정되지는 않지만, 예를 들어 다음과 같이 제작할 수 있다.
- [0088] (조직 재생 컨스트럭트의 제조 방법 예 4)
- [0089] 도 11, 도 12에 조직 재생 컨스트럭트의 제조 방법 예 4에 대해서 설명하는 도면을 도시하였다.
- [0090] 본 방법 예 4에서는, 미리 과립 형상의 집합인 지지체와 기재 현탁액을 균일하게 분산 혼합시키고, 겔 상태화 등의 방법에 의해 성형해 둔 것, 또는, 미리 다공질 블록 형상의 지지체 내부 구멍에 세포를 도입해 둔 것을 준비해 두고, 이것을 이식체(31)로 한다. 이식체(31)는 세포를 도입한 상태에서 배양을 거친 것이어도 좋다. 이들 이식체(31)의 제작은, 상기한 조직 재생 컨스트럭트의 제조 방법 예 2에서 설명한 이식체(11)의 제조 방법 예와 마찬가지로 행할 수 있다. 또는, 조직 재생 컨스트럭트의 제조 방법 예 1에서 제작한 조직 재생 컨스트럭트(10)를 그대로 사용해도 좋다.
- [0091] 제작한 이식체(31)를 틀(4) 안에 넣는다. 도 11의 (a)에 모식적으로 도시하였다. 이때, 생착층(35)을 형성하고자 하는 면은 틀(4)의 내면과의 사이에 간극을 형성해 두는 한편, 생착층(25)을 형성하지 않는 면은 틀(4)의 내면에 접촉하도록 이식체(31)를 배치한다. 틀(4)의 내면 중 저면에 대향하는 이식체(31)의 외표면에 생착층(35)이 필요한 경우에는, 틀(4)의 저면으로부터 이식체(31)를 점 또는 선으로 지지하는 지주를 사용할 수 있다. 또는 핀셋과 같은 것으로 이식체(31)를 위에서 과지하여, 틀(4)의 저면으로부터 이식체(31)를 뜨게 한 상태를 유지해도 좋다.
- [0092] 그 후, 생착층(35)에 사용하는 세포를 분산시킨 기재 현탁액을 틀(4) 내에 주입한다. 도 11의 (b)에 모식적으로 도시하였다. 현탁액에 잠겨 있는 높이까지 생착층(35)이 형성되기 때문에, 본 예에서는, 그 수위를 이식체(31)의 상면과 동일하게 하였다. 이에 의해 적어도 도 11의 (b)에서 상면측에는 생착층(35)이 형성되지 않는다.
- [0093] 그 후, 기재의 겔 상태화 조작을 실시한다. 겔 상태화는 상기 조직 재생 컨스트럭트의 제조 방법 예 1에서 설명한 방법과 마찬가지로의 방법을 적용하는 것이 가능하다.
- [0094] 이러한 겔 상태화에 의해, 도 12에 도시한 바와 같이 상기 수축이 일어나고, 생착층 내의 세포 밀도가 상승한다. 또한, 겔 상태화에 의해 3차원 그물눈에 세포를 가두기 위해서 세포가 보유 지지된다. 도 12에 도시한 파선은 겔 상태화 전의 현탁액의 수위이다. 이렇게 겔 상태화에 의해 수축이 일어나는 것을 알 수 있다.
- [0095] 이상에 의해, 도 10에 도시한 바와 같은, 이식체(31) 주위의 소정의 면에 생착층(35)이 형성된 조직 재생 컨스트럭트(30)를 효율적으로 제조할 수 있다. 본 예에 의해 제조한 조직 재생 컨스트럭트(30)에서는, 이식체(31) 및 생착층(35)에 포함되는 세포의 종류는 동일해도 좋고, 상이해도 좋다. 또한, 본 예에 의해 제조한 조직 재생 컨스트럭트(30)에서는, 이식체(31) 및 생착층(35)에 포함되는 기재의 종류에 대해서도 동일해도 좋고, 상이해도 좋다.
- [0096] <조직 재생 컨스트럭트의 작용>
- [0097] 조직 재생 컨스트럭트(10, 20, 30)에 의하면, 재생해야 할 대상이 되는 세포를 보유 지지한 지지체를 구비한 이식체에 더하여, 지지체를 갖지 않고서 세포가 높은 밀도로 포함된 생착층을 구비하고 있다. 생착층이 조직 재생 대상 부위 중, 생착을 촉진해서 조직을 재생해야 할 면의 적어도 일부에 접해서 배치됨으로써, 생착이 촉진되고, 조직 재생 컨스트럭트와 조직 재생 대상 부위와의 물리적·생물학적인 가교가 빠르게 행해지므로, 재생의 촉진을 도모할 수 있다.
- [0098] 이식체에 조직으로부터의 분화 등의 자극이 가해지는 것이나, 조기의 혈관 조직 침윤, 영양이나 세포의 공급이 용이하게 된다. 또한, 산생하는 액성 인자(성장 인자 등의 단백질)에 의한 조직 재생 대상 부위로부터의 세포 동원의 촉진, 및 그것들에 대한 활성화 자극을 줄 수도 있을 것이라 생각된다.
- [0099] 또한, 생착층 중의 세포가 효소 처리 등에 의해 분산되어 있음으로써, 세포는 생착층 중을 자유롭게 유주 가능하고, 생착층 내의 세포가 조직 재생 대상 부위, 이식체를 향해서 증생할 수 있으며, 이식체와 조직 재생 대상 부위와의 생착 및 가교가 촉진된다.
- [0100] 또한, 조직 재생 대상 부위가 비교적 큰 경우에도, 생착층을 개재한 생착층중의 세포 및, 조직 재생 대상 부위의 세포의 유주, 증생이 효율적으로 일어나서, 이식체의 세포를 잘 자극하고, 또한 그 효과가 이식체 전역의 세포로 효율적으로 전파되기 때문에, 재생의 촉진이 도모된다. 따라서, 조직 재생 컨스트럭트(10, 20, 30)에 의

하면, 조직 재생 대상 부위의 크기의 허용 범위를 확장할 수 있다.

- [0101] [실시에]
- [0102] 이하에, 본 발명을 실시예에 기초하여 더욱 상세하게 해설하지만, 이것은 본 발명을 전혀 한정하는 것이 아니다.
- [0103] <실시에 1>
- [0104] 실시예 1은 다음과 같은 과정을 거쳐서 조직 재생 컨스트럭트를 제작하고, 그 후 이식을 행하였다.
- [0105] (라트 골수 유래 간엽계 줄기 세포의 배양)
- [0106] 4주령 F344 래트의 대퇴골, 경골을 채취하고, 배양액을 사용해서 골수를 씻어내어(flush out) 회수한 골수 세포 (대퇴골 2개분, 경골 2개분)를 10% FBS, 1% 페니실린 스트렙토 마이신을 포함하는 α MEM 배지 30ml를 넣은 배지에 파종하였다. 37°C, 5% 탄산 가스 분위기의 조건 하에서 증식 배양하였다. 3일째에 배지를 교환하여 비접착 세포를 제거하고, 이후 3일에 1회의 비율로 배지 교환을 하였다. 최초의 배지 교환 시부터 배지에 bFGF 3ng/ml를 첨가해서 배양하였다. 10일 전후에 거의 집밀(콘플루언트) 상태로 된 것을 확인하였다. 그 후, 배지를 제거하여, 트립신(0.05%)+EDTA(0.2mM)에서 2분간 배양(인큐베이트)하고, 진동을 부여하여, 가급적 빠르게 세포를 박리해서 분해하고, 즉시 배지를 첨가해서 트립신 활성을 멈추었다.
- [0107] 세포수를 계측하여, 5000세포/cm²로 계대해서 배양하였다. 또한 5일간 배양한 시점에 상기와 마찬가지로 세포를 박리해서 분산시켜서(분해해서) 이하의 실험에 사용하였다.
- [0108] (조직 재생 컨스트럭트의 제조)
- [0109] Nunc사 제조의 라브텍 챔버 슬라이드 16웰(틀로 사용, 내경 7mm, 바닥 면적 38.5mm²)의 1웰당 높이 3mm가 되도록, 지지체로 하는 히드록시아파타이트 다공질체 과립(ϕ 0.5mm 내지 ϕ 2.0mm)을 충전하였다. 웰의 내경은 7mm이고, 용량은 115 μ l이다. 웰에 대한 충전 상태에서의 지지체의 공공률은 75%였으므로, 전용량 115 μ l 중의 86.25 μ l가 간극으로서 존재하게 된다.
- [0110] 거기에, F344 래트 유래의 혈장 120 μ l에, 상기와 같이 제작한 래트 골수 유래의 간엽계 줄기 세포를 200×10^4 세포 현탁한 것을 첨가하여, 세포가 전체에 널리 퍼지도록 교반(피펫팅)하였다. 여기에, 12 μ l의 3.3% 염화 칼슘 수용액을 첨가하여 널리 잘 퍼지도록 교반(피펫팅)하였다. 그것을 37°C에서 배양(인큐베이트)하고, 응고 반응인 혈장 중의 피브리노겐 중합체화를 촉진시켜 피브린화하였다. 그 결과, 웰 내에서 혈장 내에 세포와 지지체가 봉입된 덩어리가 형성되었다. 웰 내에 충전된 지지체의 상면에는, 응고한 피브린에 세포가 봉입된 지지체가 존재하지 않는 두께 약 1.2mm의 층이 올려져 겹쳐져 있는 상태이다. 이 층이 생착층이다. 생착층 중의 세포수는 약 69×10^4 세포이고, 면적당 약 1.8×10^4 세포/mm²였다.
- [0111] (이식)
- [0112] 이소플루란을 사용한 전신 마취 하에서 래트의 두개부의 털을 깎고, 이소딘으로 소독한 후, 골막까지 도달하도록 1.5cm 정도 메스로 절개하고, 그 절개선으로부터 골막 박리자를 넣어서 골막과 상피를 함께 터널 형상으로 뼈로부터 박리하였다. 제작한 조직 재생 컨스트럭트는 직전까지 37°C에서 유지하고, 이식 직전에 챔버 슬라이드의 웰 벽을 떼어내어, 조직 재생 컨스트럭트를 취출하였다. 그 후, 조직 재생 컨스트럭트 상부의 생착층을 두개골측을 향해서 박리한 터널 내에 설치하였다. 본 실시예 1은 두개골 위에 조직 재생 컨스트럭트가 생착하여, 조직 재생 컨스트럭트가 이식된 영역이 뼈가 되고, 뼈가 부풀어 오른 듯한 형상으로 증생되는 것을 기대하는 것이다.
- [0113] 이식 후에는 절개선을 봉합하여, 래트를 케이지로 되돌려 놓았다.
- [0114] <비교예 1>
- [0115] 상기한 실시예 1과 마찬가지로 제작한 조직 재생 컨스트럭트를 준비하고, 마찬가지로 래트 두개골 위에 설치해서 이식하였다. 단, 본 비교예 1에서는 생착층을 두개골측을 향하지 않고, 상측의 골막측을 향해서 설치하였다.
- [0116] 즉, 비교예 1은 상기 실시예 1과의 대비에서, 투여한 세포수는 동일하지만, 조직 재생 대상 부위에 대하여 생착층이, 조직 재생 대상 부위 중 생착을 촉진해서 조직을 재생시켜야 할 표면에는 접하고 있지 않고, 생착층의 개

재가 없는 예이다. 따라서, 본 비교예 1은 실질적으로 생착층을 형성하지 않은 조직 재생 컨스트럭트의 예이다.

- [0117] 이식 후에는 상기와 마찬가지로 절개선을 봉합하여, 래트를 케이지로 되돌려 놓았다.
- [0118] [조직학적 평가]
- [0119] (표본의 준비)
- [0120] 실시예 1, 비교예 1에 있어서의 실험 동물은 8주의 치유 기간 후, 도살해서 조직을 회수하고, 포르말린 고정, 파라핀 포매 후, 이식한 조직 재생 컨스트럭트의 중앙부의 얇게 썬 표본을 5개 제작하였다. 그 후, HE 염색을 실시하고, 조직학적 평가를 행하였다.
- [0121] (결과)
- [0122] 도 13에 실시예 1의 표본 중 하나를 도시하였다. 도 13의 (a)는 전체 형상을 도시한 도면, 도 13의 (b)는 도 13의 (a) 중 사각으로 둘러싼 부위의 확대도이다. 또한, 도 14에는 비교예 1의 표본 중 하나를 마찬가지로 도시하였다.
- [0123] 그 결과, 실시예 1에서는, 광범위에서 두개골과 조직 재생 컨스트럭트가 연속된 골형성이 보였다. 도 13의 (b)로부터 알 수 있는 바와 같이 실시예 1에서는 신생골(「N」으로 나타냄)이 많이 형성되어 있는 것도 알 수 있다. 또한, 신생골 영역의 표면에는 활성이 높은 골아세포가 배열되어 있어, 추가적인 뼈의 신생이 기대되었다.
- [0124] 한편, 비교예 1에서는, 컨스트럭트 중의 지지체의 주위에 산발적으로 골형성이 보이는 정도였다. 도 14의 (b)로부터 알 수 있는 바와 같이 골형성이 보이지 않는 영역은, 섬유성 조직(「F」로 나타냄)으로 채워져 있었다.
- [0125] 또한, 정량적으로는 다음과 같은 결과를 얻을 수 있었다.
- [0126] (1) 상기 얇게 썬 표본의 관찰에서, 지지체를 제외한 영역에서의 신생골의 면적 비율이 60% 이상인 표본은, 5개의 예 중, 실시예 1에서는 5개(전부), 비교예 1에서는 1개뿐이었다.
- [0127] (2) 상기 얇게 썬 표본의 관찰에서, 조직 재생 컨스트럭트의 저면과 기존 두개골이, 신생골에 의해 연속해서 생착되고, 기존 두개골로부터 조직 재생 컨스트럭트 내부의 지지체까지 골가교를 나타낸 계면의 길이가 50% 이상인 표본은, 5개의 예 중, 실시예 1에서는 5개(전부), 비교예 1에서는 1개뿐이었다.
- [0128] 이상에서, 조직 재생 컨스트럭트에 생체충이 구비되고, 조직 재생 대상 부위와의 사이에 생착층이 개재됨으로써 골형성이 촉진되고 있는 것이 확인되어, 본 발명의 조직 재생 컨스트럭트가 뼈의 증생에 유효한 것이 밝혀졌다.
- [0129] <실시예 2>
- [0130] 실시예 2에서는 다음과 같은 과정을 거쳐서 조직 재생 컨스트럭트를 제작하여 이식을 행하였다.
- [0131] (래트 골수 유래 간엽계 줄기 세포의 배양)
- [0132] 4주령 F344 래트의 대퇴골, 경골을 채취하고, 배양액을 사용해서 골수를 씻어내어(flush out) 회수한 골수 세포(대퇴골 2개분, 경골 2개분)를 10% FBS, 1% 페니실린 스트렙트 마이신을 포함하는 α MEM 배지 30ml를 넣은 배지에 파종하였다. 37℃, 5% 탄산 가스 분위기의 조건 하에서 증식 배양하였다. 3일째에 배지를 교환하여 비접착 세포를 제거하고, 이후 3일에 1회의 비율로 배지 교환을 하였다. 최초의 배지 교환 시부터 배지에 bFGF 3ng/ml를 첨가해서 배양하였다. 10일 전후에 거의 집밀(콘플루언트) 상태로 된 것을 확인하였다. 그 후, 배지를 제거하여, 트립신(0.05%)+EDTA(0.2mM)로 2분간 인큐베이트하고, 그 후 진동을 부여하여, 가급적 빠르게 세포를 박리해서 분해하고, 즉시 배지를 첨가해서 트립신 활성을 멈추었다.
- [0133] 세포수를 계측하여, 5000세포/cm²에서 계대해서 배양하였다. 또한 5일간 배양한 시점에 상기와 마찬가지로 세포를 박리해서 분산시켜서(분해해서) 이하의 실험에 사용하였다.
- [0134] (조직 재생 컨스트럭트의 제조)
- [0135] 니푸로사 제조의 1ml 시린지(내경 4.5mm)의 선단을 절단한 것을 틀로 준비하였다. 선단을 절단한 시린지의 단부로부터 길이 10mm의 부분에 피스톤 선단을 맞추고, 거기에 지지체로 하는 히드록시아파타이트 다공질체 과립(ϕ 0.5mm 이상 ϕ 2.0mm 이하)을 충전하였다. 선단을 절단한 시린지의 단부로부터 피스톤 선단까지의 체적은 159 μ l가 된다. 용기 충전 상태에서의 지지체의 공공률은 75%였으므로, 119 μ l가 간극으로서 존재하게 된다. 거

기에, F344 래트의 혈장 107 μ l에 상기와 같이 배양한 F344 래트 골수 유래의 간엽계 줄기 세포를 200 $\times 10^4$ 세포 현탁한 것을 첨가하였다. 전체에 균일하게 세포가 널리 퍼지도록, 27G 주사 바늘을 장착한 시린지로 교반(피펫팅)하였다. 또한, 12 μ l의 3.3% 염화 칼슘 수용액을 첨가해서 널리 잘 퍼지도록, 교반(피펫팅)하였다. 그것을 37 $^{\circ}$ C에서 배양(인큐베이트)하고, 응고 반응인 혈장 중의 피브리노겐 중합체화를 촉진시켰다. 그 결과, 1ml 시린지 내에 혈장 피브린 내에 세포와 지지체가 봉입된 덩어리(이식체 본체 부분)가 형성되었다. 이 경우, 이 시점에서 생착층에 상당하는 것은 존재하지 않는다.

[0136] 이어서, 상기에 의해 제작한 이식체를 시린지의 피스톤을 밀어서, 원기둥 형상의 덩어리로서 취출하였다. 이것을 멸균 완료된 ϕ 10mm 원기둥 형상 용기 내에 넣고, 핀셋으로 파지하여, 원형의 용기 저면으로부터 3mm 두께로 상태로 보유 지지하였다. 거기에, F344 래트의 혈장에 상기 F344 래트 골수 유래의 간엽계 줄기 세포를 200 $\times 10^4$ 세포/1000 μ l로 현탁시킨 것 1097 μ l를 주입해서 잘 교반(피펫팅)하였다. 거기에 또한 110 μ l의 3.3% 염화 칼슘 수용액을 첨가하여, 잘 교반(피펫팅)하였다. 이에 의해 응고 반응이 진행되어 왔을 때를 적당히 가늠해서, 37 $^{\circ}$ C에서 더 배양(인큐베이트)하여, 응고 반응인 혈장 중의 피브리노겐 중합체화를 촉진시켰다. 이에 의해, 이식체의 상하 3mm 두께로 생착층이 형성되었다. 또한, 동시에 원기둥 형상 이식체 부분의 측면에도 생착층이 형성되었다. 생착층은 경시적으로 수축하여, 최종적으로 약 0.3mm 이하의 두께가 되었다. 이렇게 해서 완성한 원기둥 형상의 조직 재생 컨스트럭트의 상하면에 존재하는 생착층의 세포 밀도는 약 0.5 $\times 10^4$ 세포/mm²가 된다.

[0137] (이식 및 그 평가)

[0138] F344 래트 대퇴부의 상피를 절개하여, 대퇴골 주위의 근막, 근육을 찢어 대퇴골을 노출시켰다. 계속해서 노출된 대퇴골을 창외 고정기로 고정해서 간극 10mm의 골결손을 제작하였다. 이 골결손 모델에 대하여 상기 원기둥 형상의 조직 재생 컨스트럭트를 골단면에 원기둥 형상의 상하에 있는 생착층이 정확히 접하도록 집어넣어 이식하였다.

[0139] 조직 재생 컨스트럭트는 한 덩어리이고, 골단면에 끼워 넣어짐으로써 고정성이 양호하였다.

[0140] 근육과 근막을 봉합하고, 또한 상피도 봉합해서 상처를 단았다. 치유 과정은 1, 2, 4, 8주째의 결손부의 렌트겐 촬영에 의해 평가하였다. 이식 후 4주째에는 골단부와 조직 재생 컨스트럭트의 단부와의 경계가 불명료해지고, 골가교가 일어나고 있는 것이 시사되었다. 또한, 이식 후 8주에 대퇴골을 적출하여, μ CT 및 병리 조직학적으로 평가하였다.

[0141] 그 결과, 조직 재생 컨스트럭트와 잔존 대퇴골이 골가교되고 있는 것이 확인되었다. 또한, 조직 재생 컨스트럭트의 이식체에도 지지체로서 사용한 히드록시아파타이트 과립을 덮도록 성숙한 골형성이 보이고, 일부 골수 모양의 조직의 형성도 보였다. 이식한 조직 재생 컨스트럭트 전체가 한 덩어리로 대퇴골로 정확히 치환된 모습이었다.

[0142] 이상에 의해, 본 발명의 조직 재생 컨스트럭트를 이식함으로써, 자연 치유가 도저히 불가능한 정도로 대규모의 래트 대퇴골 결손의 치유가 가능한 것이 확인되었다.

부호의 설명

[0143] 10, 20, 30: 조직 재생 컨스트럭트

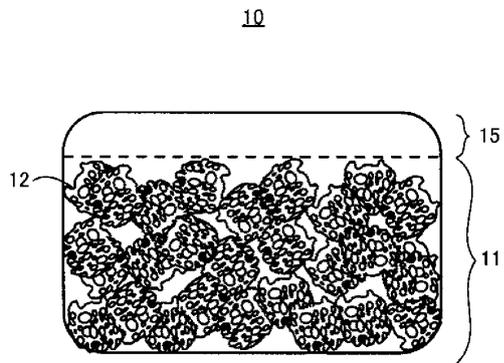
11, 21, 31: 이식체

12: 지지체

15, 25, 35: 생착층

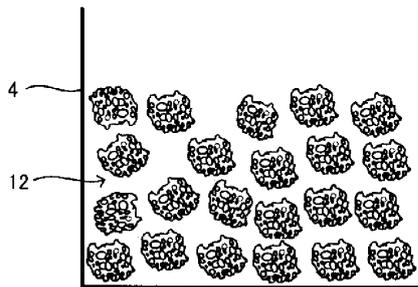
도면

도면1

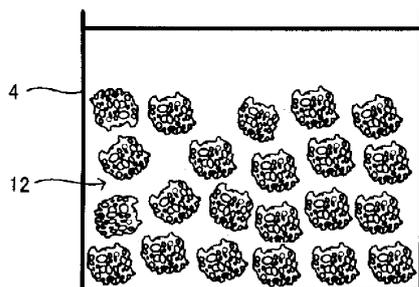
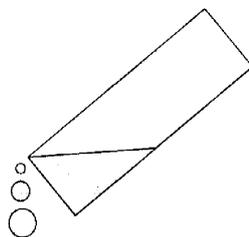


도면2

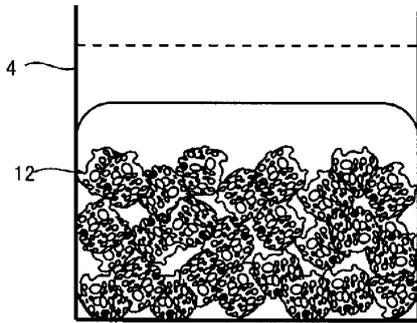
(a)



(b)

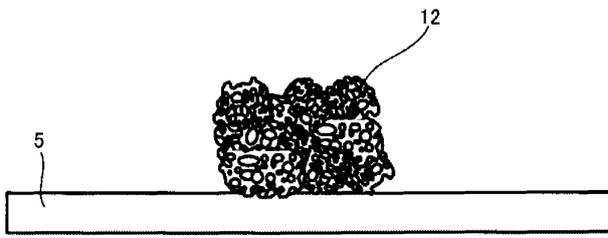


도면3

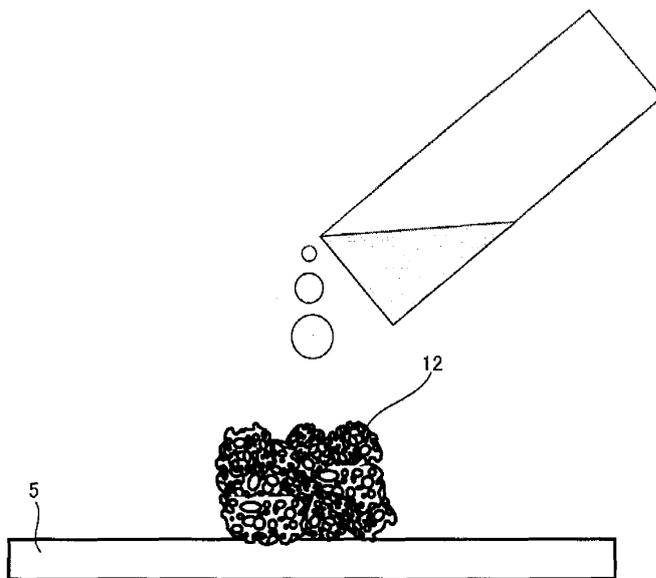


도면4

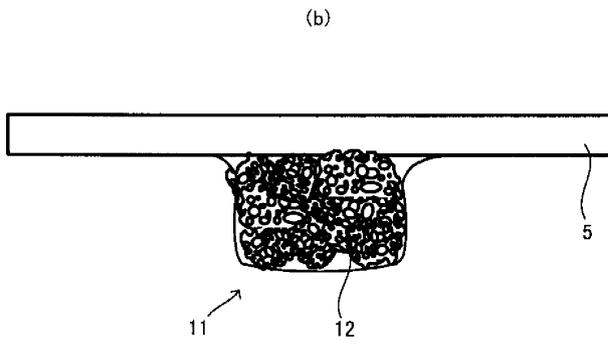
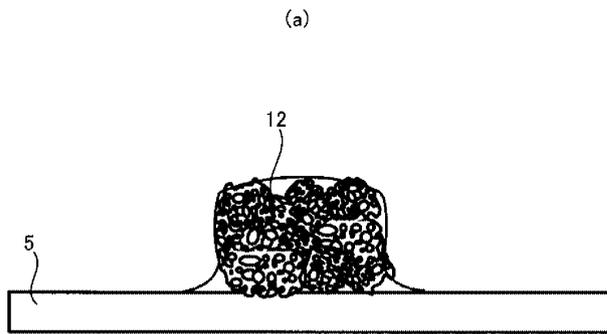
(a)



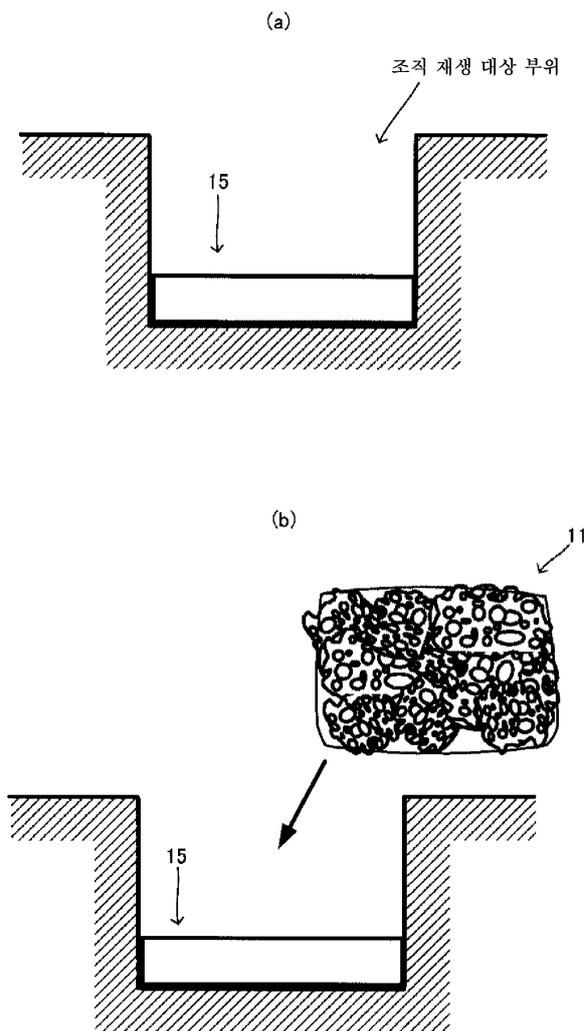
(b)



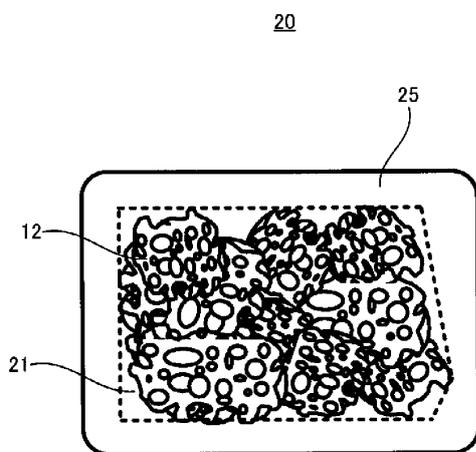
도면5



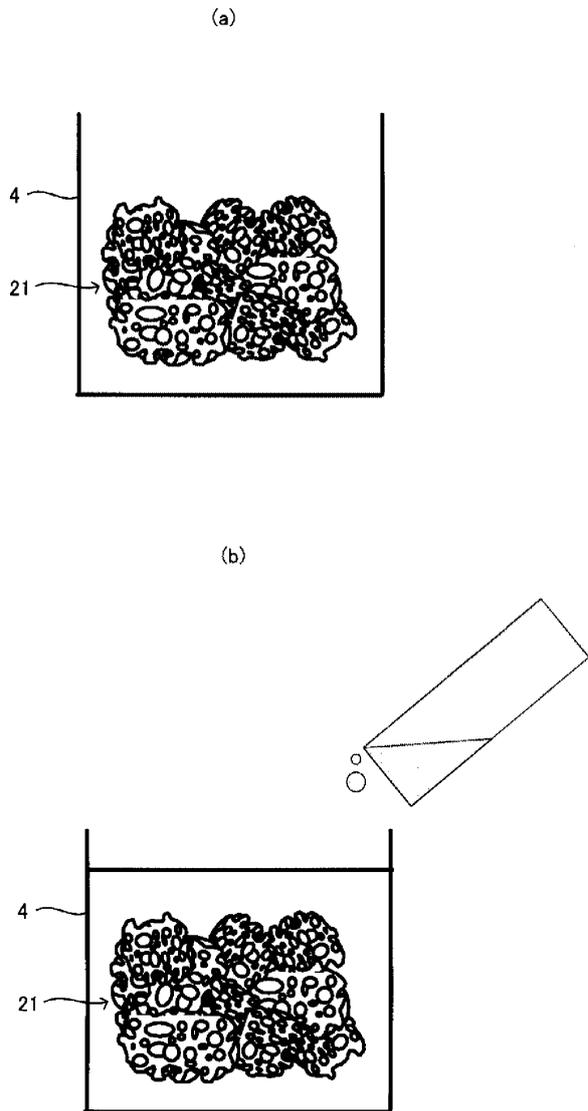
도면6



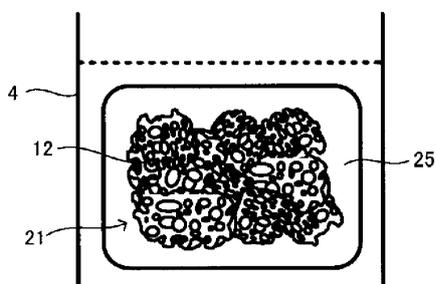
도면7



도면8

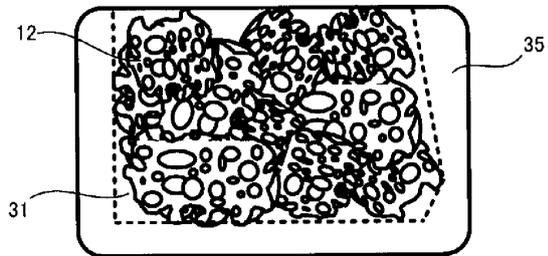


도면9



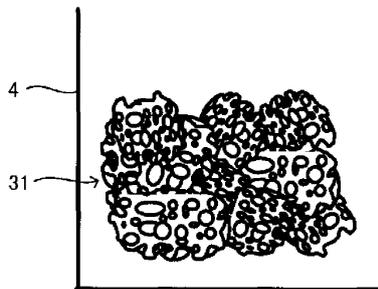
도면10

30

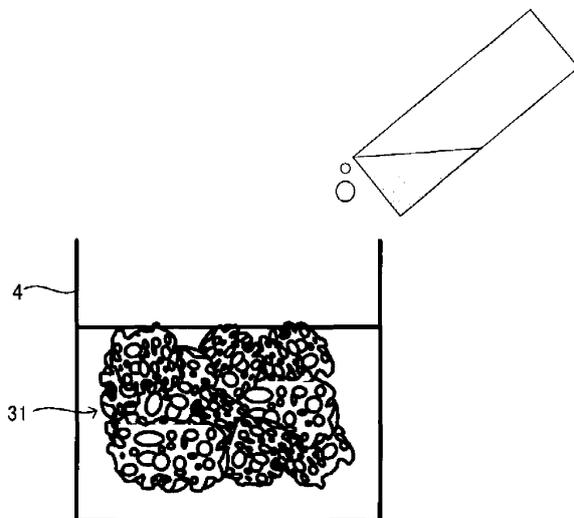


도면11

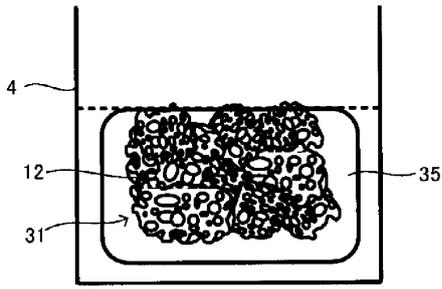
(a)



(b)

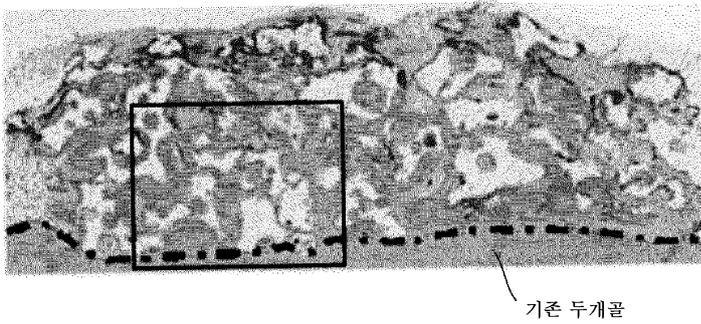


도면12

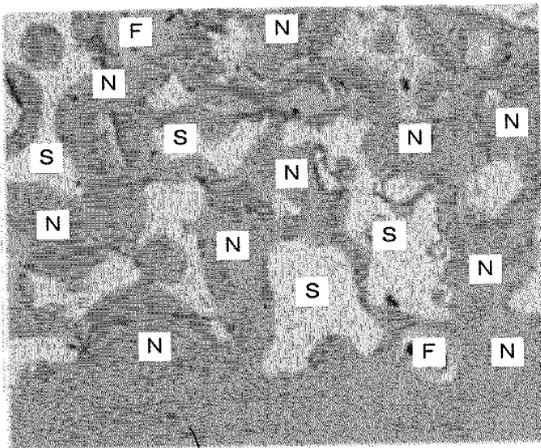


도면13

(a)



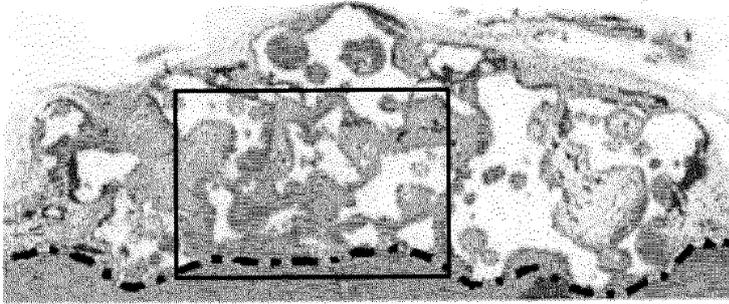
(b)



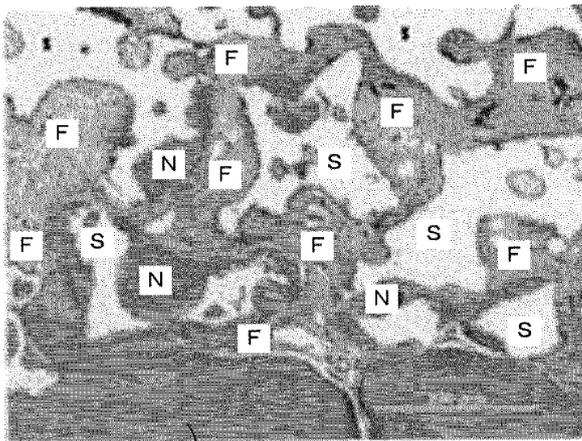
S: 지지체
N: 신생골
F: 섬유성 조직

도면14

(a)



(b)



기존 두개골

S: 지지체
N: 신생골
F: 섬유성 조직