

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第3816534号

(P3816534)

(45) 発行日 平成18年8月30日(2006.8.30)

(24) 登録日 平成18年6月16日(2006.6.16)

(51) Int. Cl.	F I
A 6 1 L 27/00 (2006.01)	A 6 1 L 27/00 Z
A 6 1 F 2/04 (2006.01)	A 6 1 F 2/04
C 1 2 N 5/06 (2006.01)	C 1 2 N 5/00 E

請求項の数 8 (全 9 頁)

(21) 出願番号	特願平10-510114	(73) 特許権者	チルドレンズ メディカル センター コーポレーション
(86) (22) 出願日	平成9年8月15日(1997.8.15)		アメリカ合衆国 02115 マサチューセッツ州 ボストン、シャタックストリート 55
(65) 公表番号	特表2000-516503(P2000-516503A)	(74) 代理人	弁理士 石田 喜樹
(43) 公表日	平成12年12月12日(2000.12.12)	(74) 代理人	弁理士 齊藤 純子
(86) 国際出願番号	PCT/US1997/014604	(72) 発明者	アタラ アンソニー
(87) 国際公開番号	W01998/006445		アメリカ合衆国 02193 マサチューセッツ州 ウェストン、ウェスタリーロード 74
(87) 国際公開日	平成10年2月19日(1998.2.19)		
審査請求日	平成16年8月11日(2004.8.11)		
(31) 優先権主張番号	60/024,029		
(32) 優先日	平成8年8月16日(1996.8.16)		
(33) 優先権主張国	米国(US)		
(31) 優先権主張番号	60/024,069		
(32) 優先日	平成8年8月16日(1996.8.16)		
(33) 優先権主張国	米国(US)		

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 細胞を接種された組織再建術用膀胱粘膜下組織

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

対象の組織に見られる種類の細胞が接種された、単離された膀胱粘膜下組織。

【請求項 2】

前記対象がヒトであって、その組織を増強、修復又は再建するために用いられる請求項 1 に記載の膀胱粘膜下組織。

【請求項 3】

前記組織が膀胱組織である請求項 1 又は 2 に記載の膀胱粘膜下組織。

【請求項 4】

前記対象と同種又は異種である請求項 1 乃至 3 の何れかに記載の膀胱粘膜下組織。

【請求項 5】

前記組織の成長を促進する成長因子をさらに含む、請求項 1 乃至 4 の何れかに記載の膀胱粘膜下組織。

【請求項 6】

第一及び第二表面を有すると共に、前記第一表面上に第一細胞種が接種され、前記第二表面上に第二細胞種が接種されている請求項 1 乃至 5 の何れかに記載の膀胱粘膜下組織。

【請求項 7】

前記第一細胞種が尿路上皮細胞を含み、前記第二細胞種が筋細胞を含む、請求項 6 に記載の膀胱粘膜下組織。

【請求項 8】

10

20

対象の組織に見られる種類の細胞を接種された、単離された膀胱粘膜下組織を得るための方法であって、
単離された膀胱粘膜下組織を提供するステップと、
前記単離された膀胱粘膜下組織に前記細胞を接種するステップと
を含む、方法。

【発明の詳細な説明】

発明の背景

再建手術は長年の間、先天的な組織異常の治療や、損傷した臓器及び組織を修復させるために用いられてきた。組織再建のための理想的な材料は、生体適合性があり、組織にとって有害な反応を引き起こすことなく天然組織に組み込むことのできるものであると同時に、解剖学的かつ機能的性質（例えば大きさ、強度、耐久性、等々）が適切なものでなければならぬ。合成ポリマ及び天然由来のポリマを含めた数多くの医用生体材料が組織再建又は増大術に利用されてきた（例えば、"Textbook of Engineering" Eds. Lanza, R., Langer, R., and Chick, W., ACM Press Colorado(1996)及びそこで引用された文献を参照されたい）が、すべての用途に満足のいく材料は現れていない。

例えば、膀胱再建術の分野では、ポリビニルやゼラチンのスポンジ、4ふっ化エチレン樹脂（テフロン）のフェルト、及びサイラステックのパッチといった合成医用生体材料を用いた再建はかなりが不成功に終わっているが、その原因は一般的には異物反応である（例えば、Kudish, H. G., J. Urol. 78:232(1957); Ashkar, L and Heller, E., J. Urol. 98:91(1967); Kelami, A. et al., J. Urol 104:693(1970)を参照されたい。ポリマ材料が接種細胞用の「足場」として用いられてきたが、この場合に接種される足場は、新しい細胞の成長のためのマトリックスとなるよう、移植できるものである（例えば、Atala, A. et al., J. Urol. 148(2 Pt 2): 658-62(1992); Atala, A., et al. J. Urol. 150(2 Pt 2); 608-12(1993)を参照されたい）。凍結乾燥させた硬膜、非上皮化（原語：deepithelialized）させた腸管セグメント、及び小腸粘膜下組織（SIS）などの天然由来の材料もまた、膀胱置換術に提案されてきた（一般的な参考文献としては、"Textbook of Tissue Engineering" Eds. Lanza, R., Langer, R., and Chick, W., ACM Press Colorado(1996)のMooney, D. et al., "Tissue Engineering: Urogenital System" を参照されたい）。

硬膜、腹膜、胎盤、及び筋膜により増大させた膀胱は徐々に萎縮することが報告されている（Kelami, A et al., J. Urol. 105:518(1971)）。非上皮化させた腸管セグメントは膀胱の再建に使用すると尿路上皮を充分覆うことができることが示されているが、粘膜の再成長か又はセグメントの線維化、あるいはこれらの両方といった点で問題が残る。腸管セグメントの非上皮化は粘膜の再成長につながることもあるが、この粘膜及び粘膜下組織を除去すると腸管セグメントが退縮してしまうことがある（例えばAtala, A., J Urol. 156:338(1996)を参照されたい）ことが示されている。

最近、異種であるブタのSISを用いて良い結果が出されている（例えば、Kropp, B. P. et al, Urology 46:396(1995)）。この生体分解性のコラーゲンを豊富に含んだ異種膜は従来、血管移植片として用いることができるか、研究が重ねられてきたものである（例えば、Hiles et al., J. Biomed. Materials Research 27:139(1993)を参照されたい）。しかしながらSISではその移植片が覆うことのできる最大の大きさに制限があり、膀胱の置換術には充分でないことがある。

特定の胃腸管セグメントを膀胱手術に用いることには、感染、穿孔、結石、代謝障害、及び場合によっては腫瘍の発生といった問題が他にも報告されている。ホルマリン保管された膀胱切片も膀胱再建に用いられてきている（例えば、Tsuji et al., J Urol. 98:91(1967)を参照されたい）。しかしながら、ホルマリン保管された材料を用いると、長期的な治療効果が低いことが多い。

また、ポリマ及び天然由来の「足場」を用いて骨欠損部への骨格の再成長を助けようという試みも行われてきた（例えば、米国特許第5,112,354号及び第4,172,128号を参照されたい。一般的な参考文献としては、Yaszemski, M. J.; et al., Biomat

10

20

30

40

50

erials 17(2): 175-85(1996)及びそこで引用された文献を参照されたい)。骨由来のコラーゲン移植片は骨の修復に用いられてきた。しかしながら、これらの材料は必ずしも、骨の長期的な修復にとって必要となる強度、柔軟性、又は非免疫原性を提供するものではない。

発明の概要

本発明は組織を修復又は増大させるための材料及び方法に関する。より具体的には、本発明は、膀胱粘膜下組織を用いた組織再建又は修復の方法と、組織再建又は修復に利用するのに適した膀胱粘膜下組織セグメントを調製する方法と、組織再建又は修復に利用される材料とに関するものである。

ある態様では、本発明は被験者の組織を外科的に増大させるための方法を提供するものである。当該方法は、分離された膀胱粘膜下組織を用いて被験者の組織を増大させるステップを含む。好適な実施例では、この分離された膀胱粘膜下組織は、細胞を接種された、分離された膀胱粘膜下組織を含む。細胞は、被験者の組織に見つかった種類の細胞でもよい。被験者の組織は膀胱組織であってもよい。分離された膀胱粘膜下組織は異種のもでもよいが、あるいはより好ましくは同種の膀胱粘膜下組織であるとよい。さらに分離された膀胱粘膜下組織には、組織の成長を促進する成長因子が含まれていてもよい。被験者は、ヒトを含め、ほ乳類でよい。

10

別の実施例では、本発明は損傷した組織を修復するための方法を提供するものであり、当該方法は、損傷した組織が修復されるよう、組織の成長が起きるような条件下で、細胞を接種された、分離された膀胱粘膜下組織に損傷した組織を接触させるステップを含む。損傷した組織は膀胱組織であってもよい。

20

別の態様では、本発明は組織の再建又は増大のための材料を提供する。当該材料は細胞を接種された、分離された膀胱粘膜下組織を含む。分離された膀胱粘膜下組織は第一表面及び第二表面を有していてもよく、またその第一表面に第一の細胞種を、そしてその第二表面に第二の細胞種を接種されていてもよい。この第一細胞種は尿路上皮細胞であってもよく、またこの第二細胞種は筋細胞であってもよい。

別の態様では、本発明は細胞を接種された、分離された膀胱粘膜下組織を調製するための方法を提供するものである。当該方法は、分離された膀胱粘膜下組織を提供するステップと、この分離された膀胱粘膜下組織に細胞を接種するステップとを含む。

【図面の簡単な説明】

30

図1は、膀胱粘膜下組織及び細胞の採取と、細胞を接種された膀胱粘膜下組織による膀胱の増大とを示した概略図である。

図2は、接種された細胞を選択に応じて含む、分離された膀胱粘膜下組織を用いた膀胱増大術の結果を示したチャートである。

発明の詳細な説明

本発明は組織再建及び修復のための方法及び材料を提供するものである。大まかに言うと、本発明は、分離された膀胱粘膜下組織を組織の修復及び増大のために用いることを特徴とする。

生体分解性のポリマは膀胱修復術において細胞送達用伝播体として用いられてきたが、その際、再構成された筋細胞がポリマの一方の側に積層され、尿路上皮細胞が反対側に積層されてきた。こうして、細胞 - ポリマの試験管内構築物は、動物の膀胱、尿管及び尿道での組織置換術に用いられてきた(例えば、Atala, A. et al., J Urol. 148(2 Pt 2):658-62(1992); Atala, A., et al. J. Urol. 150(2 Pt 2);608-12(1993); Yoo, J.J. et al., J Urol. Pt. 2, 153:375A(1995)を参照されたい)。このポリマはいくつかの目的には充分であるが、分離された膀胱粘膜下組織は、組織修復、再建及び増大への利用に好ましい弾性などの特定の特徴を有する。

40

生体内の膀胱組織には三つの主要な層が含まれている。粘膜下組織層と、筋層と尿路上皮層である。ここで用いられる場合の「分離された膀胱粘膜下組織」という術語は、自然発生した膀胱の尿路上皮層及び筋層を概ね持たない膀胱粘膜下組織を言う。好適な実施例では、分離された膀胱粘膜下組織は、自然発生した筋細胞及び尿路上皮細胞を概ね付着させ

50

ていない（即ち、分離された膀胱粘膜下組織は、好ましくは、その分離された膀胱粘膜下組織が採取されたもとの自然発生した膀胱組織の一部であった筋細胞及び尿路上皮細胞であって顕微解剖等により粘膜下組織から取り除かれなかったものを概ね持たないとよい）。いくつかの実施例では、分離された膀胱粘膜下組織は概ね無細胞である。分離された膀胱粘膜下組織は、概ね非免疫原性で無細胞、かつ生体吸収可能な、コラーゲンを豊富に含んだ層である。

「細胞を接種された、分離された膀胱粘膜下組織」とは、（ここで説明するように）自然発生した付着細胞を概ねすべて取り除かれた、分離された膀胱粘膜下組織であって、外生の細胞を加えられたもの言う。ここで用いられる場合の「外生の」細胞という用語は、分離された膀胱粘膜下組織に試験管内で加えられる細胞を言う。このように、例えば、外生の細胞には細胞培養又は別の組織試料から得られた細胞が含まれる。外生の細胞は、分離された膀胱粘膜下組織を採取したもとなつた全膀胱組織試料から得てもよいが、このような場合は、この細胞を粘膜下組織から最初に分離しておき、その後でこの分離された粘膜下組織にこの細胞を接種しなければならない。例えば、以下の実施例で述べるように、全膀胱組織を顕微解剖することで、尿路上皮層及び筋層からこの粘膜下組織層を分離してもよい。筋肉又は尿路上皮組織から採取した細胞を次に試験管内で培養し、培養された細胞を、分離された粘膜下組織に接種してもよい。外生の細胞には、さらに、内皮細胞（例えば血管組織からの）、骨から採った骨芽細胞、等々といった膀胱以外の臓器又は組織から採取された細胞が含まれる。

分離された膀胱粘膜下組織は、例えばここで述べる本方法に基づいて得ることができる。例えば、（例えば下記の実施例で述べるように）被験者から取り出した膀胱切片を顕微解剖して粘膜下組織から筋層及び尿路上皮層を取り除くことで、分離された膀胱粘膜下組織を作成してもよく、いくつかの実施例では、この分離された膀胱粘膜下組織を、例えばリン酸緩衝液（PBS）などで洗浄して異物、血液、等々を除去してもよい。いくつかの実施例では、（例えば顕微解剖により調製された）分離された膀胱粘膜下組織を、その分離された膀胱粘膜下組織のプレパレートが確実に無細胞となるよう、さらに処理してもよい。例えば、顕微解剖された膀胱粘膜下組織の切片を蒸留水中に置くことで、膠質性の粘膜下組織層に付着したまま残っている細胞を溶解させてもよい。例えば、（選択に応じて外生の細胞による接種を行う前に）残存する核酸を除去すべくデオキシリボヌクレアーゼなどを用いた処理をさらに施せば、分離された膀胱粘膜下組織を確実に無細胞とすることができる。このような処理は、ここで提供する教示を参照すれば、当業者には通常の技術範囲であろう（さらにSutherland, R.S., et al. J. Urol. 156:571(1996)も参照されたい）。

分離された膀胱粘膜下組織に接種する細胞は標準的な方法により得ることができ、また一般的には修復又は増大しようとする目的の組織又は臓器に適合するもののように選択されることであろう。接種される細胞は好ましくは、目的の臓器又は組織に通常見ることのできる種類のものであるとよい。好適な実施例では、当該細胞は、移植後のホストでの免疫原性反応を避ける又は抑えるために、（例えば図1に示すように）被験者と同じ種のドナー動物から得られた細胞である。このような細胞をここでは「同種の」細胞と呼ぶ。いくつかの好適な実施例では、接種される細胞は、外科的手術前に被験者から（自己由来の細胞）採取してもよい。（自己由来の細胞などの）細胞を所望に応じて試験管内で培養すれば、分離された膀胱粘膜下組織の「足場」に接種するのに利用できる細胞数を増加させることができる。同種の細胞、そして好ましくは自己由来の細胞を利用することが、組織拒絶反応を防ぐには好ましい。しかしながら、（移植片拒絶に結びつく恐れのある）細胞を接種された分離された膀胱粘膜下組織の移植後に被験者に免疫反応が起きない場合は、この被験者を、例えばサイクロスポリン又はFK506などの免疫抑制剤で処置すれば、移植された材料に対して拒絶反応が起きる可能性を低くすることができる。いくつかの実施例では、キメラ細胞、又はトランスジェニック動物から得た細胞を、分離された膀胱粘膜下組織に接種することができる。

分離された膀胱粘膜下組織への細胞の接種は、実施例に述べたように、又は標準的方法に

10

20

30

40

50

基づいて行うことができる。例えば、組織修復に用いられるポリマ基質への細胞の接種が報告されている（例えば、Atala, A. et al., J. Urol. 148(2 Pt 2):658-62(1992); Atala, A., et al. J. Urol 150(2 Pt 2): 608-12(1993)を参照されたい）。いくつかの好適な実施例では、二種以上の細胞種を移植前の分離された膀胱粘膜下組織に接種することができる。実例を挙げると、下記の実施例で述べるように、分離された膀胱粘膜下組織には、その一方の側又は表面に尿路上皮細胞を、そして第二の側又は表面に筋細胞を、この移植片の移植前に接種してもよい。いくつかの実施例では、二種以上の細胞種を、分離された膀胱粘膜下組織の単一の表面上に接種してもよい。培養で成長させた細胞をトリプシン処理して細胞を分離し、この分離された細胞を分離された膀胱粘膜下組織上に接種してもよい。その代わりに、細胞培養から得られた細胞を培養プレートから細胞層として引きはがし、この細胞層を、細胞を前もって分離することなく、分離された膀胱粘膜下組織に直接接種してもよい。ある好適な実施例では、少なくとも5000万個の細胞/cm²が、分離された膀胱粘膜下組織の一表面上に接種される。しかしながら、膀胱粘膜下組織に接種する細胞の密度は様々であってよいことは理解されよう。例えば、細胞密度が高ければ高いほど、接種されたその細胞による組織形成率も高いが、密度が低ければ、ホストから移植片に浸潤した細胞による組織形成を相対的に高くすることができる。細胞種の選択、及び、分離された膀胱粘膜下組織への細胞の接種は、ここで提供する教示をもとに、当業者には通常の技術範囲となるであろう。

分離された膀胱粘膜下組織を移植前（選択に応じて接種細胞を利用する場合には、分離された膀胱粘膜下組織に細胞接種する前又は後に）に添加剤又は薬品で処理することで、例えば移植後に新しい組織が形成されるのを促進しようとしてもよい。このように、例えば成長因子、サイトカイン、細胞外基質成分、及びその他の生活性の物質を、分離された膀胱粘膜下組織に加えて、移植片の癒合及び新しい組織の形成を促進してもよい。このような添加剤は、一般的には、移植を受けた臓器又は組織で適切な新組織が確実に形成されるよう、再建又は増大させようとする組織又は臓器に応じて選択されることであろう（骨の癒合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、（選択に応じて内皮細胞を接種された）分離された膀胱粘膜下組織を血管組織を増大させるために用いる場合は、血管内皮成長因子（VGEF、例えば米国特許第5,654,273号を参照されたい）を利用すれば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（例えば上皮成長因子（EGF）、ヘパリン結合上皮様成長因子（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）は、細胞添加を採用した場合に分離された膀胱粘膜下組織に接種されたその細胞が生み出すであろうこのような成長因子（もしあれば）の量を越える量、添加することができる。このような添加剤は、修復又は増大させようとする組織又は臓器にとって適切な種類の新組織が形成されるのを、（例えば移植片へホストの細胞が浸潤するのを起こさせる又は加速することにより）促進するのに十分な量、提供されることが好ましい。

ここでは本発明に基づいた膀胱の増大術に言及しているが、本発明の方法及び材料は被験者の様々な組織及び臓器の組織再建又は増大に有用であることは理解されよう。このように、例えば膀胱、尿管、尿道、腎盂、等々といった臓器又は組織を、細胞接種された分離された膀胱粘膜下組織で増大又は修復することができる。本発明の材料及び方法はさらに、血管組織（例えばZdrachala, R. J., J. Biomater. Appl. 10(4): 309-29(1996)を参照されたい）、腸管組織、胃、軟骨、骨（例えばLaurencin, C.T. et al., J. Biomed. Mater. Res. 30(2): 133-8 1996を参照されたい）、等々の再建又は増大に適用することができる。ここで用いられる場合の「被験者」という用語は、組織の再建、修復、又は増大を必要とするイヌ、ネコ、ブタ、ウマ、ウシ、又はヒトなどのほ乳類を言う。

分離された膀胱粘膜下組織は、ここで述べたように全膀胱組織から得ることができる。無細胞の分離された膀胱粘膜下組織は概ね非免疫原性であると考えられる。いくつかの好適な実施例では、組織修復又は増大用の分離された膀胱粘膜下組織は、被験者と同じ種の動物から得られるが、このような組織はここでは「同種の」膀胱粘膜下組織と呼ばれる。し

10

20

30

40

50

かしながら、分離された膀胱粘膜下組織が概ね非免疫原性の性質を有していれば、被験者とは異なる種から得られた、分離された膀胱粘膜下組織（ここでは「異種の」分離された膀胱粘膜下組織と呼ばれる）の利用も可能である。異種の実験された膀胱粘膜下組織の利用は、例えば被験者がヒトである場合など、同種の実験された膀胱粘膜下組織を得ることが難しい場合に特に有利である。このように、分離された膀胱粘膜下組織は、ある一つの種の被験者の組織又は臓器の修復又は増大に利用するのに十分な量を容易に得ることができる、例えばブタなどの別の種の動物から得てもよい。しかしながら、前に述べたように、本発明に基づき細胞を利用する場合には、分離された膀胱粘膜下組織に接種するには同種細胞が好ましい。加えて、分離された膀胱粘膜下組織は死体から得てもよい。

ある好適な実施例では、本発明の材料及び方法を、膀胱組織の再建又は増大に利用することができる。このように本発明は、膀胱外反症、膀胱容量不足などの症状の治療、膀胱部分又は全切除術後の膀胱の再建、外傷を受けた膀胱の修復、等々に資するものである。細胞を加える加えないに関係なく、分離された膀胱粘膜下組織により、肉眼で見た上で正常な細胞構成を有する新しい組織の形成が可能であることが今や判明した。例えば下記の実施例で説明するように、選択に応じて尿路上皮細胞及び筋細胞を接種されて膀胱に移植された分離された膀胱粘膜下組織は、約二カ月以内に新しい膀胱組織が形成される際の「足場」として働いた。この新しい組織は、粘膜下組織及び平滑筋に取り囲まれた尿路上皮が裏地となったルーメンから成っていた。さらに、新しく形成された組織は血管形成及び神経成長の証拠を呈していた。何らかの理論に縛られることを望むわけではないが、ホストの動物を由来とする細胞が、分離された膀胱粘膜下組織移植片に浸潤してそこで成長ができるために、本来の組織、例えば膀胱組織と構造的及び機能的に同様な新しい組織ができるのではないかと考えられる。利用された場合の接種細胞もまた、新しい組織を形成すべく成長するかも知れない。いくつかの場合では、細胞を加えなかった分離された膀胱粘膜下組織は移植後にホストの動物に吸収されるかもしれない。細胞を接種された、分離された膀胱粘膜下組織は、多くの場合、移植後に吸収されることはないと考えられる。しかしながら、いくつかの場合では、分離された膀胱粘膜下組織は新しい組織が形成されるときに吸収されることがあるかも知れない。

選択に応じて細胞を接種された、分離された膀胱粘膜下組織の、増大しようとする臓器又は組織への移植は、ここで説明した方法に基づき、あるいは当業において公知の方法に基づき、行うことができる。このように、例えば下記の実施例 1 に説明するように、例えば移植材料を目的の臓器に縫い付けることにより、被験者の臓器又は組織に対し、分離された膀胱粘膜下組織を移植することができる。（例えば外科用ステープルを用いるなど、）移植片を被験者の臓器又は組織に付着させるその他の方法を利用してもよい。このような外科的手法を、公知の手法に基づき当業者が行うことができる。

本発明の方法及び材料はここで説明するように膀胱の増大術において有用であることが判明している。ある好適な実施例では、細胞を接種された分離された膀胱粘膜下組織が、増大前の容量より少なくとも約 20 パーセント大きな容積（容量）を有する増大させた膀胱、より好ましくは少なくとも約 40 パーセント、60 パーセント、80 パーセント、100 パーセント、200 パーセント又は 300 パーセント大きな膀胱容量を提供すべく、膀胱の増大術に用いられる。別の実施例では、細胞のない、分離された膀胱粘膜下組織が、増大前の容量より少なくとも約 20 パーセント大きな容積（容量）を有する増大させた膀胱、より好ましくは少なくとも約 30 パーセント、40 パーセント、50 パーセント、70 パーセント、100 パーセント、又は 200 パーセント大きな膀胱容量を提供すべく、膀胱の増大術に用いられる。細胞のない、分離された膀胱粘膜下組織を膀胱に移植した後に、何らかの膀胱収縮が起きることがあることが判明している。理論に縛られるのを望むわけではないが、このような収縮は移植された材料の自己癒着が原因だろうと考えられる。一般的には、細胞を接種された分離された膀胱粘膜下組織を移植すると、おそらくは移植材料のうちの接種された細胞により自己癒着及び収縮が阻害されるために、移植後時間が経過しても大きな収縮が起きないと考えられる。必要に応じて、移植部位（又は細胞を接種された分離された膀胱粘膜下組織）を、移植材料の自己癒着を防ぐ物質で処理して、移

10

20

30

40

50

植された膀胱の収縮を防ぎ、容量の増加した膀胱を被験者に提供することもできる。外科的癒着を防ぐのに適した物質は公知であり、市販されている。

実施例

選択に応じて細胞を接種された、分離された膀胱粘膜下組織を概ね図1に示したように調製した。十匹のビーグル犬をナトリウムペントバルビタール(25 mg/kg IV)で麻酔した後、アセプトマジン(0.2 mg/kg IM)で前処理した。ビーグル犬に膀胱部分切除術を行ってそれらの膀胱のおよそ50%を取り除いた。五匹の膀胱組織を顕微解剖して粘膜層及び筋層を分離した。この膀胱尿路上皮細胞及び筋細胞を我々が前に説いた技術(例えばCilento, B. G. et al., J.Urol. 152:665(1994); Tobin, M.S. et al., Surgical Forum 45:786(1994); Freeman, M.R. et al. J. Urol. 153:4(suppl.)(1995)を参照されたい)を用いて培養した。簡単に説明すると、路上上皮細胞を解剖して、5 ng/mLの上皮成長因子及び50 µg/mLのウシ脳下垂体抽出物を含んだ血清及び遊離ケラチノサイト成長因子に置いた(ケラチノサイトSFM、ニューヨーク州グランドアイランド、ギブコ社製)。筋細胞は10%のウシ胎児血清を補ったダルベッコの改良イーグル培地(DMEM)(ユタ州ローガン、ハイクローン・ラボラトリーズ社製)を用いた組織抽出技術で処理した。この細胞を5%のCO₂を含んだ、37°Cに保たれた加湿大気圧チャンバ内でインキュベートした。

イヌの膀胱組織は犠牲動物から無菌状態で得た。この膀胱組織をリン酸緩衝液(PBS)で繰返しすすいだ。粘膜下組織を顕微解剖し、筋層及び漿膜層から分離した。分離された粘膜下組織を十分に洗浄して10%のセファゾリンを含んだPBS中に置いた。次にこの粘膜下組織を4°Cに6から12カ月維持した。大きさ4×5センチメートルのこの同種の膀胱粘膜下組織のセグメントすべてを紫外線に24時間暴露してこのセグメントを滅菌した。五つのセグメントには、その片側に増殖させた筋細胞を、そして反対側には尿路上皮細胞を、試験管内で接種した。これらの細胞-粘膜下組織の足場を移植前七日間、培養した。残りの五つの膀胱粘膜下組織のセグメントには細胞を接種しなかった。

手術前蛍光透視膀胱撮影法及び尿力学研究をすべての動物について行った。全身麻酔下の十匹のビーグル犬に対し、膀胱穹窿部上で十字型膀胱切開を行った。五匹の動物については、尿路上皮細胞及び筋細胞をこの同種の膀胱粘膜下組織に接種した状態で、そして残りの五匹の動物については細胞を加えない状態の同種の分離された膀胱粘膜下組織に、増大膀胱形成術を行った。吻合には4-0ピクリル(原語:vicryl)による一層の連続的な懸鉤縫合系を用いた。5-0のナイロン製非吸収性縫合系を四力所の外科的コーナ部に目印として配した。増大させた膀胱は網で覆った。尿路変向には膀胱切開カテーテルを10から14日間用いた。手術後二カ月及び三カ月の時点で尿力学的研究及び蛍光透視膀胱撮影法をすべての動物についていっせいにいった。増大させた膀胱を増大後2及び3カ月後に回収してヘマトキシリン-エオジン染色法により肉眼及び組織学的に調べた。

結果

研究期間の間、これらのイヌのいずれも何ら有害反応を示さなかった。動物はすべて、尿路感染症又は結石の形成など、目立った合併症を起こすことなく犠牲にする時点まで生存した。増大させた膀胱すべてを蛍光透視膀胱撮影法で調べたところ、この手法の1、2及び3カ月後の時点で何ら漏れのない正常な膀胱形状であることを示していた。

この結果を図2に示すグラフで示す(ABS:同種の膀胱粘膜下組織、ABS+細胞:尿路上皮細胞及び筋細胞を接種された同種の膀胱粘膜下組織)。細胞を接種された同種の膀胱粘膜下組織で増大させた膀胱の容量増加は平均で99%であることが分かった。無細胞の分離された膀胱粘膜下組織で増大させた膀胱の容量増加は平均で30%であったことが分かった。動物はすべて、尿力学的研究が証左となるように、正常な膀胱のコンプライアンスを呈していた。

回収時には、増大させた膀胱は、肉眼では移植片の領域に憩室が形成された証拠もなく、正常に見えた。移植されたセグメントの厚さは生来の膀胱組織のものと同様であった。癒着又は線維形成の証拠はなかった。組織学的には、回収された膀胱はすべて、粘膜下組織及び平滑筋に取り囲まれた尿路上皮が裏地となったルーメンから成る正常な細胞構造を含

10

20

30

40

50

んでいた。血管由来の反応がすべての標本において明らかであった。
 この結果は、尿路上皮細胞及び筋細胞を接種された膀胱粘膜下組織は、生来の膀胱と組織学的及び機能的に区別がつかない新しい膀胱組織を形成できることを示すものである。この結果は、接種された細胞により再生された細胞外マトリックスが膀胱の構造的枠組みを維持したことによるのかも知れない。同種の粘膜下組織上に接種された尿路上皮細胞及び筋細胞は移植片の吸収を妨げるように思われる。この技術により、正常な膀胱と解剖学的及び機能的に同様な新しい膀胱組織を形成することができる。
 当業者であれば、ごく通常の実験を用いるのみでここで説明した特定の手法の同等物を数多く認識され、また確認できることであろう。このような同等物は本発明の範囲内であるとみなされ、また以下の請求の範囲の包含するところである。ここで引用した公開文献の内容をすべて、参考文献としてここに編入する。その他の実施例は以下の請求の範囲内である。

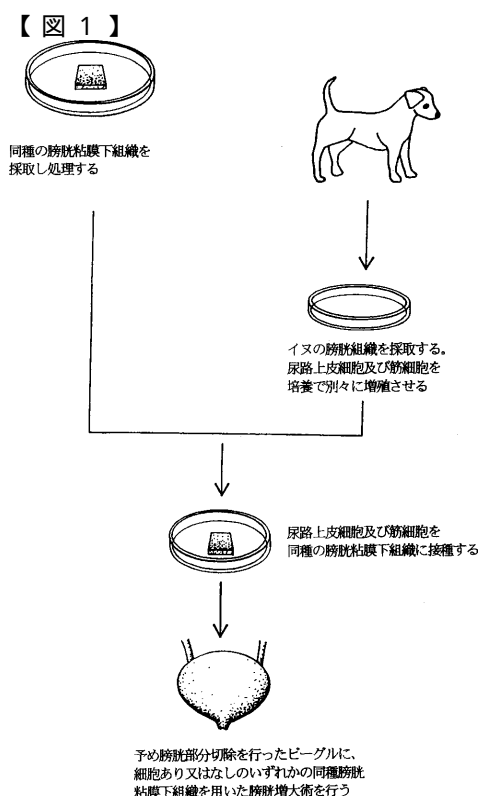


FIG. 1

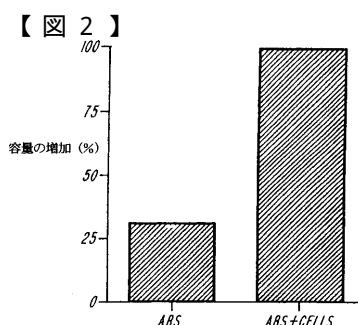


FIG. 2

フロントページの続き

審査官 八原 由美子

(56)参考文献 特表平11-503151(JP,A)
特表平11-508151(JP,A)

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

A61L 27/00

C12N 5/06

BIOSIS(STN)

MEDLINE(STN)