

(12) 特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局

(43) 国際公開日
2013年7月18日(18.07.2013)



(10) 国際公開番号
WO 2013/105665 A1

- (51) 国際特許分類:
A61L 27/00 (2006.01) *A61P 19/02* (2006.01)
A61K 8/64 (2006.01) *A61P 35/00* (2006.01)
A61K 38/17 (2006.01) *A61P 37/02* (2006.01)
A61P 7/04 (2006.01) *A61P 43/00* (2006.01)
A61P 17/02 (2006.01)

- (21) 国際出願番号: PCT/JP2013/050484
- (22) 国際出願日: 2013年1月11日(11.01.2013)
- (25) 国際出願の言語: 日本語
- (26) 国際公開の言語: 日本語
- (30) 優先権データ:
特願 2012-003883 2012年1月12日(12.01.2012) JP

(71) 出願人: 株式会社ニッピ(NIPPI, INCORPORATED)
[JP/JP]; 〒1208601 東京都足立区千住緑町1丁目1番地1 Tokyo (JP).

(72) 発明者: 小倉 孝之(OGURA Takayuki); 〒1208601 東京都足立区千住緑町1丁目1番地1 株式会社ニッピ内 Tokyo (JP). 田中 啓友(TANAKA Keisuke); 〒1208601 東京都足立区千住緑町1丁目1番地1 株式会社ニッピ内 Tokyo (JP). 大場 康弘(OHBA Yasuhiro); 〒1208601 東京都足立区千住緑町1丁目1番地1 株式会社ニッピ内

Tokyo (JP). 服部 俊治(HATTORI Shunji); 〒1208601 東京都足立区千住緑町1丁目1番地1 株式会社ニッピ内 Tokyo (JP).

(74) 代理人: 木村 満(KIMURA Mitsuru); 〒1010054 東京都千代田区神田錦町二丁目7番地 協販ビル2階 Tokyo (JP).

(81) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の国内保護が可能): 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, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, 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, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

(84) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の広域保護が可能): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーロシヤ (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), ヨーロッパ (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, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI

[続葉有]

(54) Title: COLLAGEN STRUCTURE, AND METHOD FOR PRODUCING COLLAGEN STRUCTURE

(54) 発明の名称: コラーゲン構造体、およびコラーゲン構造体の製造方法



(57) Abstract: A collagen structure characterized by comprising collagen fibers that have an average diameter of 1 to 5 μm, and having a water content of 0 to 15 (w/w)% and a collagen density of 50 to 800 mg/cm³. An acidic collagen solution is neutralized to produce collagen fibers, and then the solution is subjected to filtration or the like to produce crude collagen fibers having a collagen concentration of 12 to 50 (w/v)%. The crude collagen fibers are shaped into a predetermined shape, and the resultant product is dried, thereby producing the collagen structure. Since collagen fibers composed of associated collagen molecules is used as a material for the collagen structure, the collagen structure has excellent cell invasiveness. Further, since the collagen density in the collagen structure is equivalent to that in a collagen tissue in a living body, the collagen structure can exhibit excellent tissue regeneration performance when filled into a lost part in a living body, and therefore can be used suitably as an artificial material for regenerative medicine or the like.

(57) 要約: 平均直径が1~5 μmのコラーゲン線維からなり、水分含有量0~15 (w/w) %、コラーゲン密度50~800 mg/cm³

[続葉有]



WO 2013/105665 A1



(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG). 添付公開書類:

— 国際調査報告 (条約第 21 条(3))

3であることを特徴とするコラーゲン構造体である。コラーゲン酸性溶液を中性にしてコラーゲン線維を生成させた後、濾過などによりコラーゲン濃度 1.2 ~ 5.0 (w/v) % の粗コラーゲン線維を形成する。この粗コラーゲン線維を所定形状に成形した後に乾燥して製造することができる。コラーゲン分子が会合してなるコラーゲン線維を材料とするため細胞浸潤性に優れ、かつコラーゲン密度が生体内のコラーゲン組織と等価であるため、生体の欠損部に充填すると組織再生力に優れ、再生医療用人工材料などに好適に使用することができる。

明 細 書

発明の名称：

コラーゲン構造体、およびコラーゲン構造体の製造方法

技術分野

[0001] 本発明は、コラーゲン線維からなるコラーゲン構造体、および前記コラーゲン構造体の製造方法に関する。

背景技術

[0002] コラーゲンは、魚や豚、牛などの生皮、腱、骨などを形成する主要タンパク質である。コラーゲンは、動物間で相同性が高いため抗原性が低く、生体親和性や組織適合性に優れ、医用材料の素材として優れた特性を有する。生体組織に何らかの異常が生じた場合に移植組織を安定供給し、免疫拒絶反応を回避できる人工材料等として、コラーゲンを原料とする各種の部材が開発されている。

[0003] 例えば、合成樹脂などからなる担体に、ヘリックス含量が0～80%である変性コラーゲンを結合または被覆した細胞侵入性医用材料がある（特許文献1）。コラーゲンは組織親和性に優れるが、生体内でコラゲナーゼによって分解される。このような分解を回避するため架橋処理し、体内での残存性を高めたコラーゲンを使用する、というものである。特許文献1に記載の細胞侵入性医用材料は、生体内に埋入または創傷面に被覆した際に生体内の分解酵素に対して抵抗性を有し、一定期間必要な機械的強度を保持し、かつ細胞、組織に対する親和性が良好であり、増殖した細胞が容易にその内部に入り込みやすい、という。

[0004] また、酢酸でコラーゲン希釈溶液のpHを調整した後にグルタルアルデヒドを添加し、凍結乾燥してなる架橋コラーゲンスポンジを人工皮膚として使用する技術もある（特許文献2）。コラーゲンスポンジを熱傷等の患部に移植すると、その多孔質の構造により線維芽細胞の増殖に適した無数の孔を提供し、線維芽細胞の増殖を助けることで患部の治癒を促進することが知られ

ているが、従来のコラーゲンスポンジは、コラーゲン溶液を発泡させて調製するため工程が複雑であった。上記特許文献2では、コラーゲン溶液を発泡することなくコラーゲンスポンジを調製できる、という。

[0005] また、コラーゲンのミクロポーラスなハイドロゲルからなるコラーゲンスポンジもある（特許文献3）。特許文献3では、予め調製されたコラーゲンスポンジを、親水性有機溶剤の水溶液にて湿潤した後に凍結乾燥処理して乾燥することを特徴とする。コラーゲンスポンジは、人工皮膚や創傷被覆材等として使用できるが、従来のものは溶液中に湿潤させて保存するものであり、コラーゲンに変質をきたしやすい。一方、乾燥させて保存すると拘縮が発生する。特許文献3は、このような点に鑑みてなされたものである。実施例では、濃度0.3%の豚の腱由来のアテロコラーゲンを氷冷下でホモジナイズし、方形の型枠に入れて凍結させた後で真空凍結乾燥し、更に真空熱乾燥して架橋させた後、グルタルアルデヒド溶液に浸漬して架橋させている。このように調製されたコラーゲンスポンジを、親水性有機溶剤の水溶液で湿潤し、次いで概ね拘縮の生じ難い -80°C 以下の温度で凍結乾燥すると、顕著に乾燥体のひび割れを低減するという。

[0006] また、コラーゲン溶液を濃縮させつつ管状または面状に成形してコラーゲン構造体を製造する技術もある（特許文献4）。コラーゲン溶液を透過性部材を介してポリエチレングリコールなどの濃縮剤と接触させてコラーゲン濃度 $50\sim 100\text{mg/ml}$ に濃縮し、この濃縮溶液を環状に成形することで環状のコラーゲン構造体を形成するというものである。

[0007] また、線維化をしていないコラーゲン溶液に緩衝能を有する塩水溶液と架橋剤とを同時に接触させてコラーゲン線維同士を架橋してなるコラーゲングルもある（特許文献5）。コラーゲングルは、細胞担体、医療用材料などとして有効であるが、熱安定性に劣り、ゲル強度が不十分な場合がある。コラーゲングルにタンパク質架橋剤を接触させる従来の架橋方法では、コラーゲン線維表面で架橋するがゲルの中心部まで架橋剤が浸透しないため、ゲルの熱安定性が十分に向上しない。特許文献5によれば、コラーゲンの線維化途

上に線維間に架橋反応を起こすことで、架橋ならびに線維化によるコラーゲンの機械的強度と熱安定性を向上させることができる、という。

[0008] また、コラーゲン超微細線維性不織布状多層体を非線維化コラーゲン層で挟んだ積層体からなるコラーゲン材もある（特許文献6）。コラーゲンをナイロンなどの合成高分子材料と組み合わせた医用材料は、合成高分子材料に由来する肉芽形成や炎症などを引き起こす可能性があり、グルタルアルデヒドやエポキシなどによるコラーゲンの架橋では、架橋剤による毒性が問題となるなどの問題に鑑みてなされたものである。

[0009] また、密度約0.01から0.3 g/cm³のコラーゲン移植片もある（特許文献7）。アテロペプチドコラーゲンの酸性水溶液にアルカリを添加してコラーゲンを沈澱させ、沈殿物を溶解して分散液を形成し、所望の厚さにキャストした後にフラッシュ凍結してコラーゲンマトリックスを形成し、これを圧縮して厚さが約1から20 mmとしたものである。少なくとも孔の80%が直径35～282 μmであるという。

[0010] 更に、コラーゲンと動物細胞とを含む細胞培養液を循環培養し、コラーゲンと動物細胞を高密度に集積させる高密度培養組織の製造方法がある（特許文献8、特許文献9）。特許文献8、特許文献9に記載された方法によれば、簡単な操作でコラーゲンと動物細胞とが高密度に集積した人工組織を迅速に作成できる、という。

先行技術文献

特許文献

[0011] 特許文献1：特公平06-022579号公報

特許文献2：特許第4681214号公報

特許文献3：特公平07-000100号公報

特許文献4：特許第3221690号公報

特許文献5：特許第4064435号公報

特許文献6：特許第4251665号公報

特許文献7：特許第2820209号公報

特許文献8：特許第4671365号公報

特許文献9：特開2010-172247号公報

発明の概要

発明が解決しようとする課題

[0012] 生体中のコラーゲンは、細胞外で線維状で存在し、湿重量あたり、皮膚25%、腱32%、軟骨16%、骨23%、象牙質18%という高濃度で各種組織を構成している。生体内のコラーゲンは、3本のポリペプチド鎖が螺旋を巻いた構造を有しており、長さ約300nm、太さ1.5nmほどのトロポコラーゲンを形成し、このトロポコラーゲンが少しずつずれて会合してコラーゲン細線維と呼ばれるより太く長い線維を形成する。骨基質や軟骨基質は、このコラーゲン細線維で構成されている。また、前記コラーゲン細線維が更に複数会合し、コラーゲン線維と呼ばれる強大な線維を形成する。その太さは数 μm から数十 μm 程度で、皮膚の真皮や腱などを構成している。このように、コラーゲン分子の会合によって組織に適するコラーゲン線維構造を形成し、これによって多様な機能を発揮している。

[0013] しかしながら、上記特許文献1～3および特許文献6、特許文献7で製造されるものは、いずれも生体内のコラーゲン濃度より低濃度のコラーゲン溶液を用いて調製され、製品内のコラーゲン濃度が低く、または太くて長いコラーゲン線維を形成しておらず、組織等価物とはなり得ない。例えば、特許文献1の実施例1では、0.3w/v%のアテロコラーゲン溶液を攪拌しながら0.3w/v%の変性アテロコラーゲン溶液を添加し、この溶液を急速凍結および凍結乾燥を行うものである。コラーゲン溶液中では、コラーゲン分子がバラバラに溶解しているため、太くて長いコラーゲン線維は形成されておらず、これを凍結乾燥してなる乾燥物は、コラーゲン線維から構成されるものではない。

[0014] また、特許文献2の実施例3は、コラーゲン濃度3mg/mlに、最終のグルタルアルデヒド濃度が0.05mMになるようにグルタルアルデヒドを添加し、得られたグルタルアルデヒド含有コラーゲン希釈溶液50gを凍結

乾燥用のステンレス製枠（11 cm × 8.5 cm）内に流し込み、ステンレス製枠を−40℃に冷却してコラーゲン発泡液を凍結し、真空減圧下（0.01 mmHg）30℃で24時間凍結乾燥を行うものである。コラーゲン発泡溶液内では、コラーゲン分子がバラバラに溶解しているため、特許文献1と同様に、太くて長いコラーゲン線維は形成されていないと考えられる。

[0015] また、特許文献3の実施例1は、濃度0.3%、pH3.0の豚の腱由来のアテロコラーゲンを氷冷下でホモジナイズし、方形の型枠に入れて凍結させた後で真空凍結乾燥するものであり、特許文献1と同様に太くて長いコラーゲン線維は形成されていない。

[0016] また、特許文献6の実施例1は、1重量%コラーゲン溶液をシャーレに注いでコラーゲン溶液層を形成し、これを−20℃で24時間凍結し、次に−80℃で24時間凍結乾燥および圧縮加工し、非線維化コラーゲン層を形成するものである。この非線維化コラーゲン層もコラーゲン線維で構成されるものではない。なお、特許文献7も、コラーゲンマトリックスを製造するためにコラーゲン溶液を−20℃で24時間、真空吸引し、残存する水分を除去するため真空中で約8時間乾燥させている。コラーゲン溶液中では、コラーゲン分子がバラバラに溶解しているため、太くて長いコラーゲン線維は形成されておらず、得られたコラーゲンマトリックスもコラーゲン線維から構成されるものではない。

[0017] 一方、コラーゲンはわずかの水分によって膨潤するため、乾燥体の製造は容易でない。しかもコラーゲン溶液を凍結乾燥によって乾燥コラーゲンを得る場合、処理時間が長くおよび乾燥エネルギーが多量であり、所望の形状に成形することも容易でない。従って、コラーゲン濃度が高い人工材料であって、フィルムやシート以外の厚物にも成形でき、かつ容易に製造しうるコラーゲン構造体の製造方法の開発が望まれる。

[0018] また、前記した特許文献4および特許文献5に記載される製品は、いずれも水和物である。三重螺旋構造を維持する未変性のコラーゲンは保湿性に優れ、かつ各種細胞への接着性に優れるが、溶液に溶解したコラーゲンは熱変

性温度が低く常温でも変性し、冷蔵保存が要求される。特許文献4および特許文献5の製品はいずれも水和物であるため熱安定性に劣り、かつ細菌感染等により変性する可能性がある。しかも、含水量が90 (w/w) %以上であるため、保存時や輸送時のコストも高価となる。従って、生体親和性、熱安定性に優れる水分含有量の低い、コラーゲン構造体の開発が望まれる。

[0019] 人工組織や人工骨などの医用の人工材料が再生医療に使用される際には、真皮、骨、関節軟骨、腱などの欠損部位にこれら再生医療材料を適応して空間の保持を行い、ここに細胞が導入されて再生が促される。このような再生が円滑になされるには、医療材料が生体親和性に優れ、細胞の流出を防止でき、かつ細胞が適度に増殖できる必要がある。前記特許文献1記載の細胞侵入性医用材料は、ポリエステル、ポリウレタン、塩化ビニルのような合成樹脂を担体とするが、生体材料のみで構成できれば合成樹脂による炎症その他の発生を回避することができる。また、前記特許文献8や特許文献9記載の方法は、動物細胞を三次元で培養しうる点で優れるが、保存や輸送の簡便性を考慮して乾燥したコラーゲン構造体の開発が望まれる。

[0020] 上記現状に鑑み、本発明は、水分含有量が低く、医療用途など広範囲に使用しうるコラーゲン構造体を提供する事を目的とするものである。

[0021] また、本発明は、簡便に調製できるコラーゲン構造体の製造方法を提供する事を目的とするものである。

課題を解決するための手段

[0022] 本発明者らは、コラーゲン酸性溶液に中性緩衝液を加えてコラーゲン線維を生成し、穏やかに攪拌すると会合が促進されて太くて長いコラーゲン線維が析出すること、この溶液を濾過するとコラーゲン線維の濃度が12~50 (w/v) %の粗コラーゲン線維を得ることができること、前記粗コラーゲン線維を分取し、所定形状に成形すると凍結乾燥その他によって乾燥でき、また、前記粗コラーゲン線維を親水性有機溶媒に分散させると効率的にコラーゲン線維を脱水でき、コラーゲン線維を分取後に所定の形状に成形し、風乾してコラーゲン構造体を製造しうることを見だし、本発明を完成させた

- 。
- [0023] すなわち本発明は、平均直径が1～5 μm のコラーゲン線維からなり、水分含有量0～15 (w/w) %、コラーゲン密度50～800 mg/cm^3 であることを特徴とする、コラーゲン構造体を提供するものである。
- [0024] また本発明は、更に、細胞走化因子、成長因子、細胞増殖因子、血液凝固因子および抗凝固因子からなる群から選択される1種以上の因子を含む、前記コラーゲン構造体を提供するものである。
- [0025] また本発明は、医療用人工材料、疾患治療用部材、化粧用材料、または細胞培養材料として使用される、前記コラーゲン構造体を提供するものである。
- 。
- [0026] また本発明は、コラーゲン酸性溶液を中性にしてコラーゲン線維を生成するコラーゲン線維生成工程、
前記コラーゲン線維を含有する溶液から前記コラーゲン線維を分取してコラーゲン濃度12～50 (w/v) %の粗コラーゲン線維を形成する粗コラーゲン線維形成工程、
前記粗コラーゲン線維を所定形状に成形する成形工程、および
前記成形工程で得た成形物を乾燥する乾燥工程とを行うことを特徴とする、コラーゲン構造体の製造方法を提供するものである。
- [0027] また本発明は、前記粗コラーゲン線維形成工程に次いで、
前記粗コラーゲン線維を親水性有機溶媒に分散させた後に前記親水性有機溶媒から前記コラーゲン線維を分取して脱水するコラーゲン線維脱水工程を行い、ついで、
前記脱水したコラーゲン線維を成形する成形工程を行うことを特徴とする前記コラーゲン構造体の製造方法を提供するものである。
- [0028] また本発明は、前記コラーゲン線維脱水工程に次いで、
前記脱水したコラーゲン線維を架橋処理および／または薬剤処理を行う処理工程を行い、ついで、
前記処理したコラーゲン線維を乾燥する乾燥工程を行うことを特徴とする

を提供するものである。

発明の効果

[0029] 本発明によれば、コラーゲン濃度が12～50 (w/v) %の粗コラーゲン線維を所定形状で乾燥して調製されるため、生体内のコラーゲン組織と等価であり、コラーゲンが複数会合してなるコラーゲン線維を原料とするため機械的強度にも優れる。

[0030] 本発明のコラーゲン構造体は水分含有量が0～15 (w/w) %であるため熱安定性に優れ、かつ細菌などによる変質を効率的に回避することができる。

[0031] 本発明のコラーゲン構造体の製造方法によれば、風乾によって乾燥できるため、シート状物以外の立体物も容易に製造することができる。

図面の簡単な説明

[0032] [図1]実施例1で製造したシート状のコラーゲン構造体を示す図である。

[図2]実施例1で形成した粗コラーゲン線維の実体顕微鏡像を示す図である。

[図3]実施例1で調製したコラーゲン構造体の表面の走査型電子顕微鏡像 (SEM) を示す図である。

[図4]実施例1で調製したコラーゲン構造体の断面の走査型電子顕微鏡像 (SEM) を示す図である。

[図5]実施例1で調製したコラーゲン構造体および、前記コラーゲン構造体を調製する際に使用したコラーゲン溶液の変性温度を示差走査熱量計 (DSC) にて毎分2℃の昇温速度で測定した結果を示す図である。

[図6]実施例1で得たコラーゲン構造体をDMEM/10%FBSで膨潤させ、 1.0×10^4 細胞/cm²の細胞数でHFFを播種し、20時間後にカルセインAMにて細胞を染色した際の蛍光顕微鏡を示す図である。

[図7]実施例2で調製したブロック状のコラーゲン構造体を示す図である。

[図8]比較例1で製造した、コラーゲン濃度0.2 (w/v) %のコラーゲン溶液から調製したゲル状物を乾燥した物の走査型電子顕微鏡 (SEM) を示す図である。

[図9]比較例1で得たコラーゲンをDMEM/10%FBSで馴化させ、 1.0×10^4 細胞/cm²の細胞数でHFFを播種し、20時間後にカルセインAMにて細胞を染色した際の蛍光顕微鏡を示す図である。

[図10]比較例3で製造した、1(w/v)%のコラーゲン溶液を凍結乾燥してなるコラーゲンスポンジの走査型電子顕微鏡(SEM)を示す図である。

発明を実施するための形態

[0033] 本発明の第一は、平均直径が1~5 μ mのコラーゲン線維からなり、水分含有量0~15(w/w)%、コラーゲン密度50~800mg/cm³であることを特徴とする、コラーゲン構造体である。また、本発明の第二は、医療用人工材料、疾患治療用部材、化粧用材料、または細胞培養材料として使用される、前記コラーゲン構造体である。以下、本発明を詳細に説明する。

[0034] (1) コラーゲン構造体

本願明細書において、「コラーゲン」とは、真皮、靭帯、腱、骨、軟骨などを構成するタンパク質のひとつである。コラーゲンタンパク質のペプチド鎖3本が螺旋を巻いたものを「コラーゲン分子」と称する。本発明において、「コラーゲン線維」とは、コラーゲン細線維が会合したものであり、前記コラーゲン細線維とは、複数のコラーゲン分子が会合したものをいう。

[0035] コラーゲンには、従来からI~XXIX型が知られているが、本発明で使用するコラーゲンとしてはいずれであってもよく、新たに見出されるコラーゲンであってもよい。生体内に含まれるコラーゲンの大部分は水に不溶性であり、本発明では、コラーゲン線維を形成できるものを広く対象とすることができ、例えば、動物の皮や骨等の原料に含まれるコラーゲンをプロテアーゼなどの酵素を添加して可溶化した「可溶化コラーゲン」を使用することができる。なお、生体内には、動物の皮や骨等の原料には、わずかに中性塩溶液や酸性溶液に溶ける「可溶性コラーゲン」であってもよい。前記「可溶化コラーゲン」や「可溶性コラーゲン」は、化学的処理の際に構成アミノ酸が修飾されていてもよい。

[0036] 更に、コラーゲン線維を構成するコラーゲン分子は、コラーゲン誘導体で

あってもよい。本発明において、「コラーゲン誘導体」とは、前記コラーゲン分子を構成するアミノ酸に他の官能基を修飾したものを意味する。例えば、アシル化コラーゲンやエステル化コラーゲンなどがある。アシル化コラーゲンとしては、サクシニル化コラーゲン、フタル化コラーゲン、マレイル化コラーゲンなどがある。例えば、酵素処理によって抽出したアテロコラーゲン溶液をpH9～12に調整し、その後、コハク酸、無水フタル酸、無水マレイン酸などの酸無水物を添加してなるサクシニル化コラーゲン、フタル化コラーゲン、マレイル化コラーゲンなどのアシル化コラーゲンなどがある。また、エステル化コラーゲンとしては、可溶化コラーゲンをエステル化したもののほか、不溶性コラーゲンをエステル化した後に酵素反応などで可溶化されたエステル化コラーゲンなどがある。

[0037] 本発明において、「コラーゲン構造体」とは、所定の形状を有する固形物をいう。従って、粉状物、顆粒状物などの流動体は含まない。所定の形状とは、フィルム状やシート状、円柱、円錐、多角柱、多角錐、球などのブロック状などを含む。所定の形状を維持できればよく、不定形であってもよい。なお、「フィルム状」とは200 μ m未満の薄膜状を、「シート状」とは200 μ m以上の膜状をいう。また、「ブロック状」とは、平面状物が高さ方向に厚みを形成した塊状をいう。

[0038] 本発明のコラーゲン構造体は、乾燥状態での平均直径が1～5 μ mのコラーゲン線維からなる。前記したように、コラーゲン溶液には三重螺旋構造を有するコラーゲン分子がバラバラに溶解しており、このようなコラーゲン溶液を風乾などによってフィルム状に成形すると、コラーゲン分子やその会合体によってフィルムが形成される。コラーゲン分子やその会合体は、細くかつ短いためコラーゲン分子間や前記会合体間の間隙が狭く、細胞はこの間隙を通過することができない。このようなフィルム上で細胞を培養しても細胞はフィルム表面に局在するが内部に浸潤することができない。しかも、上記フィルムは細くて短いコラーゲン分子等で構成されるため機械的強度が低い。しかしながら、本発明では、三重螺旋構造を有するコラーゲン分子が会合

したコラーゲン細線維が更に会合してなる平均直径が1～5 μm の太いコラーゲン線維から構成されるため、コラーゲン線維間の間隙が大きく、細胞が自由に通過できる。このため本発明のコラーゲン構造体を生体に充填すると、コラーゲン構造体の内部にまで細胞が浸潤する。しかも、このようなコラーゲンの線維構造は、生体内の腱や靭帯などの結合組織におけるコラーゲンの線維構造と類似するものである。したがって、コラーゲン自体の機械的強度を高く維持することができる。

[0039] 本発明のコラーゲン構造体を構成するコラーゲン線維は、乾燥状態での平均直径が1～5 μm 、より好ましくは2～3 μm である。この範囲で、細胞浸潤性に優れるコラーゲン構造体を得ることができる。なお、コラーゲン分子を会合してなるコラーゲン線維において、平均直径が1～5 μm のコラーゲン線維の場合、その後の物理的な切断その他の処理がなければ平均線維長は一般には1～10 mmである。なお、本発明において、上記したコラーゲン線維の平均直径および平均線維長は、乾燥状態、すなわち水分含有量0～15 (w/w) %のコラーゲン構造体について、後記する実施例に記載する方法で測定した値とする。

[0040] 本発明のコラーゲン構造体は、水分含有量が0～15 (w/w) %、より好ましくは0～10 (w/w) %である。水分含有量が低い乾燥物であるため熱安定性に優れ、かつ細菌感染などにより変質を回避することができる。しかも、粉末などと相違してフィルム状、シート状、その他、ブロック状などの成形物であるため、生体の欠損部の形状に成形することで生体内への添付や充填も容易となる。なお、本発明における水分含有量は、後記する実施例に記載する方法で測定した値とする。

[0041] 本発明のコラーゲン構造体は、水分含有量が0～15 (w/w) %の場合にコラーゲン密度が50～800 mg/cm^3 、より好ましくは110～600 mg/cm^3 、特に好ましくは120～400 mg/cm^3 である。コラーゲンは、生体内では不溶性コラーゲンとして存在し、皮膚組織では25 (w/v) %、腱組織では32 (w/v) %と高濃度で結合組織を形成している

。動物組織からコラーゲンを抽出するためにはコラーゲンを可溶化する必要があり、この可溶化コラーゲンは粘性が高い。このため高濃度コラーゲン溶液を調製することが困難で、密度の高いコラーゲン構造体は存在しなかった。しかしながら、本発明によれば、コラーゲン密度が50～800 mg/cm³であり生体内のコラーゲン密度と均等のコラーゲン構造体を提供することができ、このコラーゲン構造体は組織等価物として使用することができる。なお、本発明において、コラーゲン密度は、後記する実施例に示す方法で測定した値とする。

[0042] 本発明のコラーゲン構造体は、空隙率が20～90%、より好ましくは30～80%、特に好ましくは40～70%である。多孔であるため、溶媒中に浸漬すると迅速に溶媒中で膨潤する。なお、本発明において空隙率は、後記する実施例に示す方法で測定した値とする。

[0043] 本発明のコラーゲン構造体は、コラーゲン線維からなる多孔であり、平均孔径は1～50 μm、より好ましくは5～30 μmである。本発明のコラーゲン構造体は、上記したコラーゲン線維が不織布のように折り重なって構成される。従って、上記孔は他の孔と連通できる連通孔となる。このため孔に細胞が侵入すると、連通孔を介してコラーゲン構造体の内部に細胞が侵入できる。本発明において「平均孔径」は、後記する実施例に記載した方法で測定した値とする。

[0044] 本発明のコラーゲン構造体には、更に、細胞走化因子、成長因子、細胞増殖因子、血液凝固因子および抗凝固因子からなる群から選択される1種以上の因子を含むものであってもよい。このような成分の添加により、コラーゲン構造体に創傷治癒、腫瘍細胞増殖阻止、免疫調節、骨形成、造血の調節、止血、抗凝血などの効能を付与することができる。

[0045] 例えば、走化因子としては、エリスロポエチン、インターロイキン1 (IL-1) などのサイトカイン、インターロイキン8 (IL-8)、NAP-2、MIP-2などのケモカインがある。

[0046] また、成長因子としては、上皮成長因子 (Epidermal grow

th factor: EGF)、インスリン様成長因子 (Insulin-like growth factor: IGF)、トランスフォーミング成長因子 (Transforming growth factor: TGF)、神経成長因子 (Nerve growth factor: NGF)、血小板由来成長因子 (Platelet-derived growth factor: PDGF) などがある。

[0047] 増殖因子としては、脳由来神経栄養因子 (Brain-derived neurotrophic factor: BDNF)、血管内皮細胞増殖因子 (Vesicular endothelial growth factor: VEGF)、顆粒球コロニー刺激因子 (Granulocyte-colony stimulating factor: G-CSF)、顆粒球マクロファージコロニー刺激因子 (Granulocyte-macrophage-colony stimulating factor: GM-CSF)、エリスロポエチン (Erythropoietin: EPO)、トロンボポエチン (Thrombopoietin: TPO)、塩基性線維芽細胞増殖因子 (basic fibroblast growth factor: bFGF または FGF2)、肝細胞増殖因子 (Hepatocyte growth factor: HGF) などがある。

[0048] また、凝固因子としては、フィブリノーゲン・フィブリン (第Ⅰ因子)、プロトロンビン・トロンビン (第Ⅱ因子)、組織因子 (第Ⅲ因子、トロンボプラスチン) などがあり、抗凝固因子としては、ヘパリン、アンチトロンビンⅢなどがある。

[0049] このような添加物は、コラーゲン構造体に含浸その他によって結合するものであってもよく、結合手を介してコラーゲン構造体に結合するものであってもよく、用途に応じて適宜選択することができる。例えば、コラーゲン構造体を上記成分溶解液に含浸し、上記成分を吸着させた後に乾燥してなるコラーゲン構造体は、これを創傷部に充填すると、上記成分を徐放するため、ドラッグデリバリーシステムなどの一部材として使用することができる。

[0050] 結合手としては、コラーゲン結合ドメインのポリペプチド鎖を例示することができる。例えば、フォンビルブランド因子のコラーゲン結合ドメインや、コラゲナーゼのコラーゲン結合ドメインを例示することができる。予め上記成分にコラーゲン結合ドメインのポリペプチド鎖を結合すると、前記結合手を介して成分がコラーゲン線維と安定して結合することができる。

[0051] 本発明のコラーゲン構造体は、コラーゲン線維内を架橋するものや、コラーゲン線維間を架橋して形成したものであってもよい。コラーゲンは、生体構成物であるため、生体内でコラゲナーゼなどによって分解される。従って、生分解性を回避したい部位や用途、例えば骨材などとして使用する場合には、架橋体構造を導入する。架橋構造の導入によって、生分解性を抑制し、機械的強度を向上させることができる。このような架橋構造は、コラーゲン構造体の表面にのみ導入してもよく、コラーゲン構造体の内部まで導入してもよい。

[0052] 本発明のコラーゲン構造体は、フィルム状、シート状、ブロック状に成形される。前記ブロック状には、柱状、球状、推状のほか、任意の形状に成形されたものであってもよい。特に、生体組織の特定形状に成形することもできる。例えば、膝関節を構成する半月体、鼓膜、指、鼻、耳等の生体の形状、所定の軟骨の形状などを例示することができる。本発明のコラーゲン構造体を皮下に埋設し、または人工骨として骨折部に充填することで、近傍の細胞を増殖させ、または人工皮膚として塗布することで外界と生体との境界を構成して細菌などの侵入を防止し、再生機能を促成することができる。なお、本発明のコラーゲン構造体に更に他の層が積層されるものであってもよい。

なお、従来のコラーゲンスポンジを圧縮加工すれば、コラーゲン密度の高いシート状物となる。しかしながら、このようなコラーゲンスポンジは、コラーゲン線維で構成されるものではなく、従って、コラーゲン線維によってもたらされる強度を確保することができない。本発明のコラーゲン構造体は、圧縮加工することなく所定形状に形成されたものであり、細胞浸潤性に優

れかつこれを含水して使用する場合にもコラーゲン線維による強度を確保することができる。

[0053] (2) 用途

本発明のコラーゲン構造体は、医療用人工材料、疾患治療用部材、化粧品材料、細胞培養材料、その他に使用することができる。

[0054] 医療用人工材料としては、真皮、骨、関節軟骨、腱、靭帯、血管などの欠損部位に対して適応し、空間の保持や、細胞の導入などを促進することができる。このような医療用人工材料としては、再生医療を対象とすることができる。また、止血剤を含浸させたフィルム状のコラーゲン構造体は、出血部に被覆して止血用部材として使用することができる。

[0055] 疾患治療部材としては、例えば、眼の創傷、重度の熱傷、皮膚移植片の供与部位、褥瘡性潰瘍、糖尿病性潰瘍、外科手術の切開創またはケロイド形成性創傷などに使用することができる。

[0056] 化粧品材料としては、フィルム状、またはシート状のコラーゲン構造体を顔面形状にカットし、これに化粧水などを含浸させることでパック材として使用することができる。

[0057] 細胞培養材料としては、細胞の三次元培養基材として使用すれば、細胞を継代培養することができる。また、細胞侵入性や定着性に優れるため、薬物透過性試験用の基材等としても使用することができる。対象とする細胞としては、ES細胞やiPS細胞などの細胞にも適用しうる。

[0058] また、医療用人工材料の応用として、ドラッグデリバリーシステムの担体として使用することができる。各種成分をコラーゲン構造体に結合して生体に塗布、充填すると、薬剤が経時的に放出され、DDSとして機能する。

[0059] (3) コラーゲン構造体の製造方法

上記コラーゲン構造体の製造方法に限定はない。しかしながら、コラーゲン酸性溶液を中性にしてコラーゲン線維を生成するコラーゲン線維生成工程、前記コラーゲン線維を含有する溶液から前記コラーゲン線維を分取してコラーゲン濃度12～50(w/v)%の粗コラーゲン線維を形成する粗コラ

ーゲン線維形成工程、前記粗コラーゲン線維を所定形状に成形する成形工程、および前記成形工程で得た成形物を乾燥する乾燥工程とにより製造することができる。前記粗コラーゲン線維形成工程に次いで、前記粗コラーゲン線維を親水性有機溶媒に分散させた後に前記親水性有機溶媒から前記コラーゲン線維を分取して脱水するコラーゲン線維脱水工程を行い、その後に成形および乾燥してコラーゲン構造体を製造することもできる。また、前記コラーゲン線維脱水工程に次いで、前記脱水したコラーゲン線維を架橋処理および／または薬剤処理を行う処理工程を行い、ついで、前記処理したコラーゲン線維を乾燥する乾燥工程を行うことで、架橋コラーゲン構造体を製造することもできる。

[0060] 本発明で使用するコラーゲンは、ウシ、ブタ、鳥、魚などの動物の皮膚やその他のコラーゲンを含む組織から採取することができる。一般に、コラーゲンは、動物の結合組織に多く含まれるが、熱処理によって抽出するとコラーゲンが熱変性して特有の三重螺旋構造が壊され、ゼラチンとなる。本発明では、三重螺旋構造を有するコラーゲンを使用する。このようなコラーゲンの抽出法として、動物の骨、皮などを材料として、酸処理、酵素処理による可溶化法等がある。好ましくは、コラーゲンの抽出原料として、ウシ、ブタ、ニワトリ、ダチョウ、ウマ、魚類等の真皮や腱がある。胎児由来などの若い動物の組織を使用すると収率が向上するため好ましい。

[0061] また、酵素処理してなるコラーゲン溶液としては、例えば、牛皮の真皮層を細碎し、脱脂したものを使用することができる。この組織をコラーゲン終濃度0.5～5 (w/v) %となるよう蒸留水に懸濁後、塩酸を加えてpH 3.0に調整する。コラーゲン重量に対し百分の一量の酸性プロテアーゼを加え25℃、72時間可溶化処理を行う。酵素反応停止後、上記酵素可溶化コラーゲン液を塩析し、回収した塩析沈澱をコラーゲン濃度1～5 (w/v) %となるように蒸留水に分散させ、塩酸を加えて均一に溶解してコラーゲン溶液とすることができる。

[0062] 上記したコラーゲン酸性溶液のpHは、1.0～6.0であることが好ま

しく、より好ましくは3.0～4.0である。pHが上記範囲を超えるとコラーゲンの線維化が困難となる場合がある。

[0063] 本発明では、上記コラーゲン酸性溶液を中性にする。コラーゲン溶液は、酵素処理によって調製した場合も、酸処理によって調製した場合も、溶液中にコラーゲン分子を溶解するため液性が酸性である。このようなコラーゲン酸性溶液にアルカリ性や中性緩衝液を添加する。アルカリ性溶液としては、水酸化ナトリウム溶液や水酸化カリウム溶液などを使用することができる。また、中性緩衝液としては、リン酸とリン酸ナトリウムとからなるpH7.0～9.5のリン酸緩衝液、HEPES [2-[4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl]ethanesulfonic acid] 緩衝液 (pH6.8-8.2)、クエン酸-リン酸緩衝液 (pH2.6～7.0)、50mM Tris緩衝液 (pH7.4)、50mMリン酸 (pH7.4) など、pH7.0近傍で緩衝作用を有するものを広く使用することができる。なお、中性とはpH6.0～9.0であればよい。

[0064] 上記したアルカリ性溶液や中性緩衝液には、pHを変化させない範囲で他の塩などを含んでいてもよい。このような塩としては、塩化ナトリウム、塩化カリウムなどを例示することができる。このような塩の添加によってコラーゲン溶液がヒトの体液と等張になると、生体内のコラーゲンと同様に約67nmのずれをもったコラーゲン線維を形成することができる。従って、添加する塩の量は、中性処理後のコラーゲン溶液の浸透圧が、ヒトの体液と等張にしうる量とすることが好ましい。

[0065] 本発明では、中性後のコラーゲン溶液のコラーゲン濃度は、0.01～5 (w/v) %、より好ましくは0.1～5 (w/v) %、特に好ましくは0.3～5 (w/v) %である。0.01 (w/v) %より低濃度であるとその後の濃縮も容易でない。一方、コラーゲンは粘性が高いため、5 (w/v) %より高濃度のコラーゲン溶液の調製は困難である。

[0066] 本発明では、上記中性処理後のコラーゲン溶液を、温度4～45℃、より

好ましくは30～37℃の範囲で静置する。この範囲で、前記コラーゲン溶液に溶解したコラーゲン分子は、上記中性処理により溶液中で会合し、ゲル状物を形成する。

[0067] 本発明では、次いで上記したゲル状物を含む溶液を緩やかに攪拌する。穏やかな攪拌によりゲル状物を構成するコラーゲン分子相互の会合が促進され、コラーゲン線維の構造を保ちつつ線維間の水分が放出され、太く、かつ線維長の長いコラーゲン線維が前記溶液中に析出する。従って、攪拌の程度は、コラーゲン分子の会合が促進できる程度であればよい。強度の攪拌を行うと生成したコラーゲン線維が物理的に破断され、細く短いコラーゲン線維となる。穏やかな攪拌により析出するコラーゲン線維の溶液中の平均直径は1～100 μ mであり、線維長さは1～10mmである。なお、本発明においてコラーゲン溶液から析出したコラーゲン線維の平均直径や平均線維長は、実体顕微鏡像において観察される線維の内、無作為に選んだ20本の線維の直径や長さを平均した値とする。

[0068] このコラーゲン線維が析出した溶液をろ過し、または遠心分離すると前記コラーゲン線維を分取することができる。本発明では、コラーゲン溶液から分取されたコラーゲン線維を「粗コラーゲン線維」と称する。したがって、粗コラーゲン線維はコラーゲン線維と水分とを主成分とする。粗コラーゲン線維に含まれるコラーゲン線維の濃度が12 (w/v) %に満たない場合には、再度、遠心分離やろ過などを行い、コラーゲン濃度12～50 (w/v) %、より好ましくは15～40 (w/v) %、特に好ましくは18～30 (w/v) %に濃縮する。

[0069] ろ過により上記コラーゲン濃度の粗コラーゲン線維を分取するには、ポアサイズが1 μ m～1mm、より好ましくは10 μ m～100 μ mのろ紙を使用することが好ましい。ポアサイズが上記範囲であれば、大量のコラーゲン線維を効率的に処理することができる。

[0070] 一方、前記コラーゲン溶液を遠心分離して、粗コラーゲン線維を分取することもできる。例えば、10000～20000rpmで10分から1時間

遠心する。なお、上記範囲のコラーゲン濃度に調整するため、遠心分離は複数回行ってよい。

[0071] 本発明では、分取した粗コラーゲン線維を所定形状に成形する。成形された粗コラーゲン線維の形状は、フィルム状、シート状のほか、各種の立体構造に成形できる。コラーゲン構造体を組織充填用を使用する場合には、生体内の充填部と嵌合しうる形状に成形してもよい。

例えば、コラーゲン線維が析出したコラーゲン溶液をろ過して粗コラーゲン線維を分取する場合には、例えば、ロートの間中部に形成した多孔のろ紙載置部にろ紙を配設してコラーゲン溶液をろ過すれば、ろ紙上にシート状またはブロック状に粗コラーゲン線維を堆積することができる。予め、前記ろ紙載置部を所定形状に変形して鑄型として使用し、ろ紙載置部に粗コラーゲン線維を堆積させ、所定形状に成形することもできる。上記は、粗コラーゲン線維形成工程と成形工程とを連続して行う態様の一例である。また、ろ紙上に積層した粗コラーゲン線維を所定形状の鑄型に充填して成形してもよい。

[0072] 上記した成形方法は、遠心分離によって粗コラーゲン線維を形成した場合も同様に応用することができる。例えば、遠心分離の際に、遠心管を鑄型として使用し、遠心分離と同時に粗コラーゲン線維を所定の形状に成形することができる。これは、粗コラーゲン線維形成工程と成形工程とを連続して行う態様の一例である。なお、遠心分離後に粗コラーゲン線維を所定形状の型に充填して成形してもよい。

[0073] ついで、成形した粗コラーゲン線維を乾燥する。本発明の製造方法では、コラーゲン濃度が12～50 (w/v) %の粗コラーゲン線維を成形したため、成形した粗コラーゲン線維を凍結乾燥や風乾、温熱乾燥、真空吸引その他により脱水および乾燥し、コラーゲン構造体を製造することができる。なお、予め、円柱や角柱などの形状のコラーゲン構造体を得て、これを削るなどの方法で更に造型を行ってもよい。乾燥の程度は、水分含有量0～15 (w/w) %である。コラーゲン溶液に比較して、保存安定性に優れるからで

ある。

[0074] 本発明のコラーゲン構造体は、上記乾燥した後に、これを圧縮成形してもよい。本発明のコラーゲン構造体を構成するコラーゲン線維は、平均直径が1～5 μm であり、その長さは一般に1～10 mmである。このように太くて長いコラーゲン線維が不織布のように堆積し、細胞浸潤性と強度とが確保されるため、圧縮成形を行っても細胞浸潤性や強度を低下させることなく、コラーゲン濃度を上昇させることができる。このような圧縮成形は、乾燥後に行う以外の工程、例えば、粗コラーゲン線維を所定形状に成形する際などにおこなってもよい。

[0075] 本発明では、粗コラーゲン線維を分取する前に、粗コラーゲン線維にその3～2000質量部、好ましくは5～1000質量部、より好ましくは10～100質量部、特に好ましくは10～30質量部の親水性有機溶媒を添加し、粗コラーゲン線維が分散する親水性有機溶媒を調製し、ついでろ過して粗コラーゲン線維を分取して粗コラーゲン線維を脱水してもよい。本発明で使用する粗コラーゲン線維は、コラーゲン濃度が12～50 (w/v) %と従来のコラーゲン溶液と比較してコラーゲン濃度が高い。このため、例えば100%エタノールなどの高濃度の親水性有機溶媒に分散させることができ、これによって親水性が高い粗コラーゲン線維を効率的に脱水することができる。粗コラーゲン線維が分散する親水性有機溶媒はコラーゲン溶液よりも流動性が高く、溶液のろ過効率および粗コラーゲン線維成形後の乾燥効率を向上させることができる。ろ過操作時の目詰まりが抑制されるため、厚みのあるブロック状のコラーゲン構造体を製造することができる。

[0076] 従来からエタノールなどによるコラーゲンの脱水は知られて、アルコール濃度を漸次高めつつ脱水することが一般であった。しかしながら、本発明では粗コラーゲン線維のコラーゲン濃度が12～50 (w/v) %と高濃度であるため、例えばエタノールを使用する場合でも、100%エタノールを使用することができる。このため親水性有機溶媒による脱水を簡便かつ効率的に行うことができる。

[0077] 粗コラーゲン線維を分散させる親水性有機溶媒としては、水と混和しうる炭素含有溶媒であればよく、例えばアルコール、ケトン、エーテル、エステル、極性非プロトン性溶媒などが挙げられる。アルコールとしては、メタノール、エタノール、イソプロパノール、*t*-ブタノール等の炭素数1~6の一価アルコールやエチレングリコール、プロピレングリコール等の多価アルコールなどがある。ケトンとしてはアセトン、メチルエチルケトンなどがある。また、エーテルとしてはジエチルエーテル、メチルエチルエーテル、エチレングリコールモノメチルエーテル、ジエチレングリコールモノブチルエーテル等のグリコールエーテルや、テトラヒドロフラン、ジオキサン等の環状エーテルなどがある。更に、エステルとしては酢酸エチル、乳酸エチルなどがあり、極性非プロトン性溶媒としてはジメチルスルホキシド（DMSO）、ジメチルホルムアミド（DMF）、ピリジンなどがある。中でも好ましくは水と任意の割合で混和しうるもの、例えばアセトン、メタノール、エタノール、イソプロパノール、アセトニトリル、テトラヒドロフラン、ジメチルスルホキシド、ジメチルホルムアミドなどが挙げられる。中でも、エタノール、アセトン、ジエチルエーテルまたはこれらの混合液を好適に使用することができる。

なお、使用する親水性有機溶媒の温度は、15℃以下であることが好ましい。コラーゲン線維を変性させず、コラーゲン分子の三重螺旋構造を維持しうるからである。

[0078] 粗コラーゲン線維を分散した親水性有機溶媒は、ろ過などにより粗コラーゲン線維を親水性有機溶媒と分離し、結果的に粗コラーゲン線維を脱水することができる。粗コラーゲン線維を含む親水性有機溶媒をろ過する際に、ロートの中間部に形成した多孔のろ紙載置部にろ紙を配設し、前記した粗コラーゲン線維が分散する親水性有機溶媒をろ過すれば、ろ紙上に粗コラーゲン線維がシート状に堆積する。これにより、粗コラーゲン線維の脱水と粗コラーゲン線維の成形とを連続して行うことができる。堆積量を多くしてブロック状に成形することもできる。なお、脱水後の粗コラーゲン線維を所定の鑄

型によって形成することもできる。

[0079] コラーゲンは、親水性が高いため乾燥は容易でなく、特に立体物の乾燥は容易でない。しかしながら、本発明では、上記コラーゲン濃度の粗コラーゲン線維を使用し、親水性有機溶媒を使用して粗コラーゲン線維を脱水するためコラーゲン密度が高く立体形状を維持しうるコラーゲン構造体を製造することができる。

[0080] 成形後の粗コラーゲン線維は、形状やサイズにもよるが、凍結乾燥のほか、風乾によっても乾燥することができる。風乾によれば、安価でありコラーゲン線維の熱変性も防止することができる。

[0081] 本発明のコラーゲン構造体は、更に架橋構造を有するものであってもよい。架橋構造の導入によって生体に埋設された後の分解を抑制することができる。架橋する方法は、用途に応じて適宜選択することができる。例えば、ホルムアルデヒドやグルタルアルデヒドなどのアルデヒド類、キシロース、グルコース、マンノース、ガラクトース等をコラーゲン線維やコラーゲン構造体に接触させることで導入することができる。また、カルボジイミド系、エポキシド系およびイミダゾール系架橋剤を添加して架橋することもできる。また、紫外線や γ 線、電子線などの照射によっても架橋することができる。なお、コラーゲンは、自然乾燥を行うと一部に架橋構造が形成される場合がある。

[0082] 本発明のコラーゲン構造体は、架橋の有無に関わらず、細胞走化因子、成長因子、細胞増殖因子、血液凝固因子および抗凝固因子からなる群から選択される1種以上の因子を結合することができる。因子の結合は、化学的結合のほか、吸着、担持などの物理的結合であってもよい。

因子を結合する工程は、コラーゲン構造体を製造するいずれの工程で行ってもよい。例えば、粗コラーゲン線維の乾燥工程に先立ついずれかの工程で、コラーゲン線維に細胞走化因子、成長因子、細胞増殖因子、血液凝固因子および抗凝固因子からなる群から選択される1種以上の因子を結合することができる。どの段階で因子を結合するかは、添加する成分の化学的特性その

他によって適宜選択することができる。例えば、粗コラーゲン線維に上記因子を添加して均一に攪拌し、物理的に結合した後に、粗コラーゲン線維を所定形状に成形し、および乾燥して、コラーゲン構造体を製造することができる。また、粗コラーゲン線維を親水性有機溶媒中に分散し、当該溶媒をろ過して脱水した粗コラーゲン線維に上記成分を混合した後、乾燥してコラーゲン構造体を製造することができる。

更に、水分含有量が0～15（w/w）%のコラーゲン構造体を製造した後に上記因子の水溶液をコラーゲン構造体に含浸させ、その後に再度水分含有量が0～15（w/w）%となるように乾燥させてもよい。

[0083] 上記因子をコラーゲン構造体に化学的に結合するには、予めコラーゲンとの結合手を形成した因子を使用してもよい。このような結合手として、フォンビルブランド因子のコラーゲン結合ドメインや、コラゲナーゼのコラーゲン結合ドメインのポリペプチド鎖がある。例えば、上記因子にコラーゲン結合ドメインのポリペプチド鎖を結合させておき、コラーゲン構造体にこのような結合手を有する因子の溶液を含浸すると、前記結合手を介して前記因子が結合する。コラーゲン結合ドメインのアミノ酸配列は、コラーゲンを基質とする酵素コラゲナーゼと同様にコラーゲンに特異的に結合することができる。

[0084] 本発明のコラーゲン構造体は、コラーゲン密度が高くかつ所望の形状に成形されている点に特徴がある。形状としては、フィルム状、シート状のほか、ブロック状、その他、用途に応じて選択できる。従前から、フィルム状やシート状などの薄層状の成形品は存在し、コラーゲンスポンジや管状コラーゲン構造体は存在したが、コラーゲン濃度が高く、かつブロック状物のコラーゲン構造体は存在しなかった。乾燥前のコラーゲン濃度を向上させることが困難なためである。本発明では、特に粗コラーゲン線維を親水性有機溶媒に分散して粗コラーゲン線維を脱水することで、簡便に粗コラーゲン線維による大きな堆積物を形成することができ、かつ風乾などによって容易に乾燥することができる。なお、大きな堆積物を所定形状の鋳型に充填して成形し

、複雑な形状のコラーゲン構造体を製造することもできる。

実施例

[0085] 次に実施例を挙げて本発明を具体的に説明するが、これらの実施例は何ら本発明を制限するものではない。

[0086] (実施例 1)

(1) コラーゲン構造体の調製

豚皮の真皮層を肉挽き等で細碎し、脱脂後十分に洗浄した組織を原料とした。終濃度 5 mg/ml のペプシン、50 mM 酢酸となるよう混合した可溶性水溶液に、コラーゲン終濃度 4.5 (w/v) % となるように前記原料を懸濁し、4℃、一晩可溶化処理を行った。上記のようにして得た酵素可溶性コラーゲン液に、終濃度 5 (w/v) % となるよう塩化ナトリウムを加えて塩析し、遠心分離により塩析物を回収した。回収した塩析物を、コラーゲン濃度 3 (w/v) % となるように蒸留水に分散し、塩酸を加えて pH 3.0 に調整して均一に溶解し、コラーゲン溶液とした。

このコラーゲン溶液 2.5 ml (温度 4℃) に、温度 4℃ の中性緩衝液としてリン酸緩衝生理食塩水 (pH 7.5) を 47.5 ml 添加し、温度 37℃ で 24 時間静置した。

静置によりコラーゲン分子が会合してゲル状物が形成され、これを緩やかに攪拌すると会合が促進してコラーゲン線維が形成され溶液中に分散した。分散した線維を孔径 80 μm のナイロンメッシュ上に注いでろ過し、メッシュ上に粗コラーゲン線維を回収した。この粗コラーゲン線維のコラーゲン濃度は、20 (w/v) % であった。

次いで、メッシュ上のコラーゲン線維を凍結乾燥し、厚さ 0.2 mm のシート状のコラーゲン構造体を得た。コラーゲン構造体の外観を図 1 に示す。

(2) 水分含有量

下記方法により測定した上記コラーゲン構造体の水分含有量は、9.4 (w/w) % であった。

(i) 水分含有量の測定方法

コラーゲン構造体の質量 (w_1) を測定する。ついで、 120°C で2時間加熱して水分を蒸発させた後、コラーゲン構造体の質量 (w_2) を測定する。加熱前後の質量変化 ($w_1 - w_2$) を水分量とし、コラーゲン構造体の質量 (w_1) に対する前記水分量の百分率 (%) を水分含有量とする。

(3) 粗コラーゲン線維の平均直径および平均線維長

ナイロンメッシュ上の粗コラーゲン線維を実体顕微鏡により観察した。実体顕微鏡像を図2に示す。実体顕微鏡により無作為に粗コラーゲン線維20本選出して直径および線維長を測定し、20本の平均を算出した。平均直径は $1.15\ \mu\text{m}$ であり平均線維長さは $4.09\ \text{mm}$ であった。なお、線維長は、最短が $1.9\ \text{mm}$ であり、最長が $8.75\ \text{mm}$ であった。

[0087] (4) 走査型電子顕微鏡像(表面)

得られたコラーゲン構造体の表面の線維構造を走査型電子顕微鏡 (SEM) により観察した。結果を図3に示す。

[0088] (5) コラーゲン構造体を構成するコラーゲン線維の平均直径、孔径

上記コラーゲン構造体について、乾燥状態における線維の平均直径、平均孔径を下記方法で測定した。結果を表1に示す。コラーゲン構造体の平均孔径は $18.47\ \mu\text{m}$ であり、直径が $5\sim 7\ \mu\text{m}$ の細胞を浸潤させる十分な間隙を有していた。

(i) コラーゲン線維の平均直径

走査型電子顕微鏡 (SEM) で観察されるコラーゲン線維の内、無作為に20本の線維を選出してそれらの直径を測定する。20本の線維の直径の平均を算出し、平均直径とする。

(ii) コラーゲン線維の平均孔径

走査型電子顕微鏡像 (SEM) で観察される線維の内、無作為に選んだ20カ所の線維孔の直径を測定する。20ヶ所の孔径の平均を算出し、平均孔径とする。

[0089] (6) 走査型電子顕微鏡像(断面)

コラーゲン構造体の断面の線維構造を走査型電子顕微鏡 (SEM) により

観察した。結果を図4に示す。

[0090] (7) 変性温度

得られたコラーゲン構造体および対照としてコラーゲン溶液の変性温度を示差走査熱量計(DSC)にて毎分2℃の昇温速度で測定した。結果を図5および表2に示す。コラーゲン構造体では115.03℃に変性温度のピークが観察されたが、コラーゲン溶液の変性温度は42.75℃であり、コラーゲン構造体はコラーゲン溶液よりも熱安定性に優れることが判明した。

[0091] (8) コラーゲン密度および空隙率

コラーゲン密度および空隙率を下記方法により測定しところ、コラーゲン密度は200mg/cm³であり、空隙率は40.9%であった。

(i) コラーゲン密度の測定方法

コラーゲン構造体を1cm四方に正確に裁断して試験片を調製する。前記試験片をシックネスゲージにより正確な厚みを測定し、体積を算出する。ついで、試験片を5mlの5mM酢酸溶液に溶解し、マイクロビュレット法にてコラーゲン濃度を測定する。試験片の体積とコラーゲン濃度とから、単位体積当たりのコラーゲン量を算出し、コラーゲン密度とする。

(ii) 空隙率

Pascal 140及び440(CARLO ERBA INSTRUMENTS社製)を用いた水銀圧入法により測定を行う。

[0092] (8) 細胞浸潤性

得られたコラーゲン構造体をDMEM/10%FBSで膨潤させ、 1.0×10^4 細胞/cm²の細胞数でHFFを播種し、20時間後にカルセインAMにて細胞を染色し、蛍光顕微鏡で観察した。結果を図6に示す。

[0093] (実施例2)

(1) コラーゲン構造体の調製

豚皮の真皮層を肉挽き等で細碎し、脱脂後十分に洗浄した組織を原料とした。終濃度5mg/mlのペプシン、50mM酢酸となるよう混合した可溶化水溶液に、コラーゲン終濃度4.5(w/v)%となるように前記原料を

懸濁し、4℃、一晚可溶化処理を行った。上記のようにして得た酵素可溶化コラーゲン液に、終濃度5 (w/v) %となるよう塩化ナトリウムを加えて塩析し、遠心分離により塩析物を回収した。回収した塩析物を、コラーゲン濃度3 (w/v) %となるように蒸留水に分散させ、塩酸を加えてpH 3.0に調整して均一に溶解し、コラーゲン溶液を調製した。このコラーゲン溶液5 ml (温度4℃) に、温度4℃の中性緩衝液としてリン酸緩衝生理食塩水 (pH 7.5) を95 ml 添加し、温度37℃で24時間静置した。静置によりコラーゲン分子が会合してゲル状物が形成された。

これを緩やかに攪拌すると会合が促進してコラーゲン線維が形成され溶液中に分散し、沈殿した。17,500 rpm、20分の遠心分離により沈澱を回収し粗コラーゲン線維を得た。この粗コラーゲン線維のコラーゲン濃度は、20 (w/v) %であった。

次いで、得られた粗コラーゲン線維0.75 gを温度20℃のエタノール10 gに投入し、緩やかに10分間攪拌して分散させた。得られた分散液を濾過して粗コラーゲン線維を分取した。分取した粗コラーゲン線維を直径10 mm、高さ10 mmの柱状の型に充填して室温で風乾し、コラーゲン構造体を得た。これを図7に示す。

[0094] (2) 水分含有量、コラーゲン密度、空隙率、コラーゲン線維の平均直径
得られたコラーゲン構造体について、実施例1と同様に水分含有量、コラーゲン密度、空隙率、コラーゲン線維の平均直径を測定したところ、このコラーゲン構造体の水分含有量は6.7 (w/w) %であり、コラーゲン密度は127 mg/cm³、空隙率は76.6%であった。また、コラーゲン線維の平均直径は、1.59 μmであった。

[0095] (比較例1)

(1) ゲル凍結乾燥物の調製

実施例1で得られたコラーゲン溶液に蒸留水を添加して濃度0.4 (w/v) %に希釈し、ついで等量の2倍濃縮リン酸緩衝生理食塩水 (pH 7.5) を4℃条件下で混和し、細胞培養用のプレートに静かに注ぎ、温度37℃

で24時間静置してゲル状物を作製した。

上記ゲル状物からコラーゲン線維を分離することなくそのままゲル状物を凍結乾燥した。

[0096] (2) 水分含有量およびコラーゲン密度

実施例1と同様にして水分含有量とコラーゲン密度を測定したところ、この凍結乾燥物の水分含有量は10~15 (w/w) %であり、コラーゲン密度は2.0 mg/cm³であった。

[0097] (3) コラーゲン線維の平均直径、孔径

実施例1と同様にして、凍結乾燥物を構成するコラーゲン線維の平均直径、孔径を測定した。このフィルムを構成するコラーゲン線維の平均直径は0.17 μmであった。なお、コラーゲン線維同士が相互に接触しているため、線維長を測定することはできなかった。結果を表1に示す。

[0098] (4) ゲル状物の走査型電子顕微鏡

凍結乾燥前のゲル状物を走査型電子顕微鏡 (SEM) により観察した。結果を図8に示す。

[0099] (5) 細胞浸潤性

凍結乾燥前のゲル状物をDMEM/10% FBSで馴化させた後、実施例1と同様にして、 1.0×10^4 細胞/cm²の細胞数でHFFを播種し、20時間後にカルセインAMにて細胞を染色し、蛍光顕微鏡で観察した。結果を図9に示す。実施例1の図6では、焦点の合う細胞と合わない細胞が同時に存在し、細胞が三次元的に配置している様子が観察されたが、図9では、細胞の焦点が合っているため単一面に平面的に存在することが観察された。

[0100] (比較例2)

実施例1で得られたコラーゲン溶液に、5倍濃縮リン酸緩衝生理食塩水 (pH 7.5) を加えて、コラーゲン濃度が0.075 (w/v) %になるように調整し、37℃で一晩強め (600 rpm) に攪拌しながらコラーゲン線維を形成させた。このコラーゲン線維を含有する溶液をホモジナイザーで攪拌して物理的に切断し、またはコラーゲン分子の長さ方向の連結を抑制し

た。この溶液に含まれるコラーゲン会合体の平均直径は1.13 μm であり、長さは213 μm であった。

次いで、17,500 rpm、20分の遠心分離によりコラーゲン会合体を回収し、コラーゲンの濃度が30 (w/v) %になるまで遠心分離を繰り返した。得られた沈殿物に対し、20倍量のエタノールを投入し、分散させた後、孔径80 μm のナイロンメッシュ上に注いでろ過し、メッシュ上に粗コラーゲン会合体を回収した。得られた沈殿物はシートを形成せず、粉末状を呈した。

[0101] (比較例3)

実施例1で得られたコラーゲン溶液に蒸留水を添加して濃度0.8 (w/v) %に希釈し、中和せずにそのまま凍結乾燥し、コラーゲンスポンジを製作した。このコラーゲンスポンジは、多孔フィルムで形成されたものでありコラーゲン線維で構成されるものではなかった。図10に、コラーゲンスポンジの電子顕微鏡像を示す。なお、コラーゲン密度は8 mg/cm³であった。

[0102] [表1]

	実施例1	比較例1
線維の平均直径	2.53 μm	0.17 μm
平均孔径	18.47 μm	1.15 μm

[0103] [表2]

	実施例1	
	コラーゲン溶液	コラーゲン構造体
変性温度	42.75 $^{\circ}\text{C}$	115.03 $^{\circ}\text{C}$
変性熱量	48.13 mJ/mg	35.55 mJ/mg

[0104] 本発明は2012年1月12日に出願された日本国特許出願2012-003883号に基づく。本明細書中に日本国特許出願2012-003883号の明細書、特許請求の範囲、図面全体を参照として取り込むものとする

。

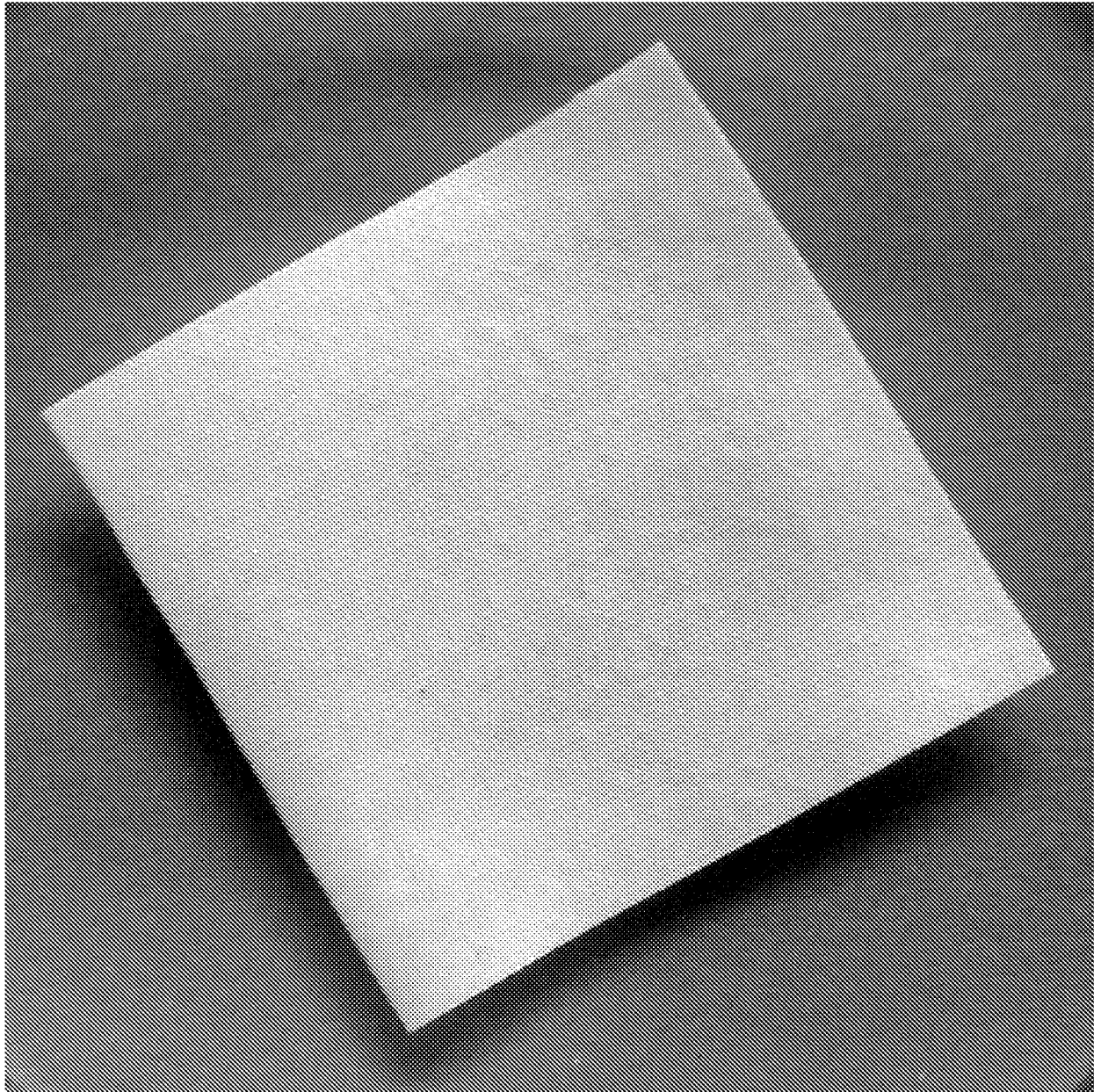
産業上の利用可能性

[0105] 本発明のコラーゲン構造体はコラーゲン密度の高い乾燥体であり、熱安定性が高くかつ組織等価物として再生医療その他に使用でき、有用である。

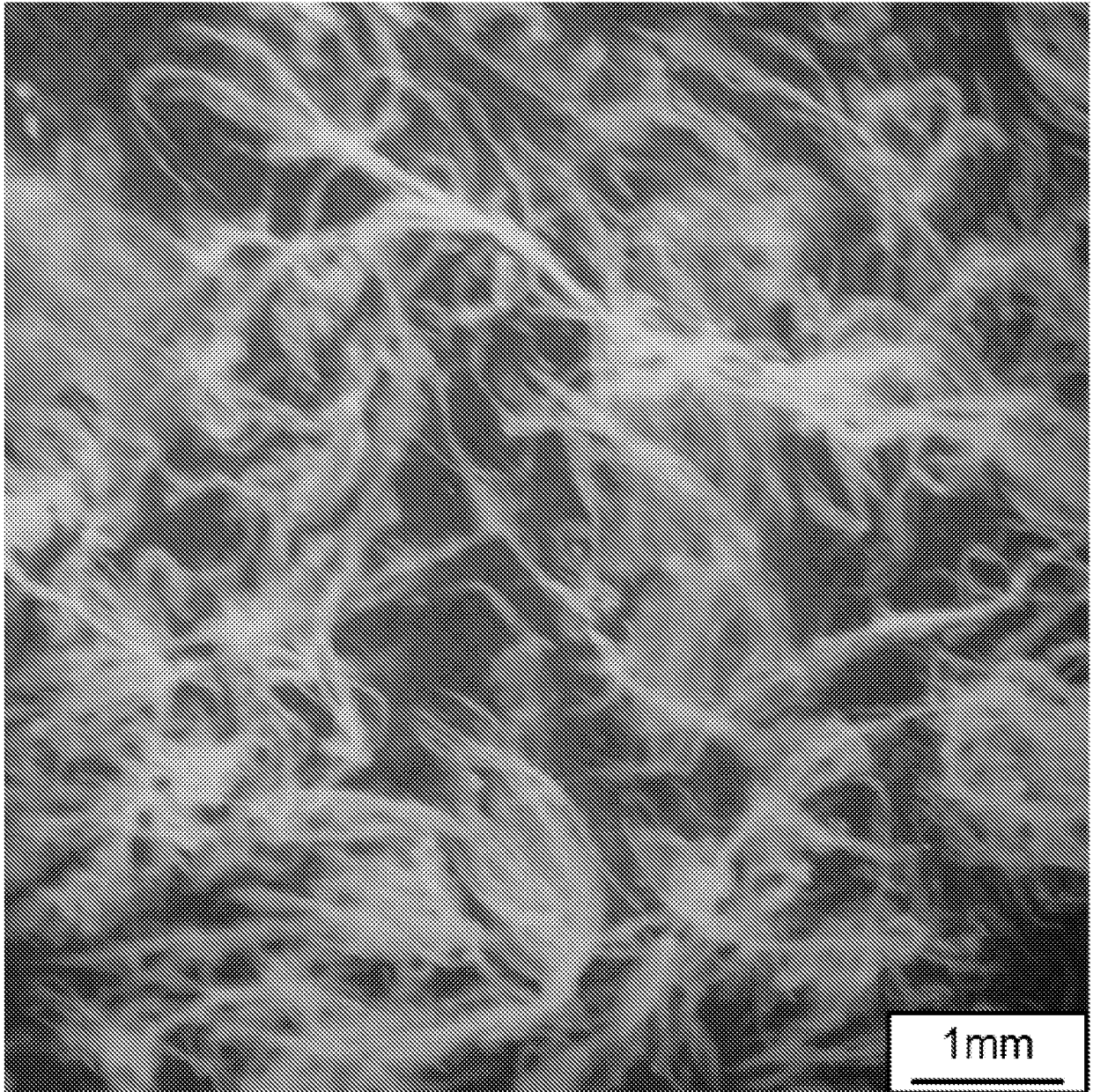
請求の範囲

- [請求項1] 平均直径が1～5 μm のコラーゲン線維からなり、水分含有量0～15 (w/w) %、コラーゲン密度50～800 mg/cm^3 であることを特徴とする、コラーゲン構造体。
- [請求項2] 更に、細胞走化因子、成長因子、細胞増殖因子、血液凝固因子および抗凝固因子からなる群から選択される1種以上の因子を含む、請求項1に記載のコラーゲン構造体。
- [請求項3] 医療用人工材料、疾患治療用部材、化粧用材料、または細胞培養材料として使用される、請求項1または2記載のコラーゲン構造体。
- [請求項4] コラーゲン酸性溶液を中性にしてコラーゲン線維を生成するコラーゲン線維生成工程、
前記コラーゲン線維を含有する溶液から前記コラーゲン線維を分取してコラーゲン濃度12～50 (w/v) %の粗コラーゲン線維を形成する粗コラーゲン線維形成工程、
前記粗コラーゲン線維を所定形状に成形する成形工程、および
前記成形工程で得た成形物を乾燥する乾燥工程とを行うことを特徴とする、コラーゲン構造体の製造方法。
- [請求項5] 前記粗コラーゲン線維形成工程に次いで、
前記粗コラーゲン線維を親水性有機溶媒に分散させた後に前記親水性有機溶媒から前記コラーゲン線維を分取して脱水するコラーゲン線維脱水工程を行い、ついで、
前記脱水したコラーゲン線維を成形する成形工程を行うことを特徴とする、請求項4記載のコラーゲン構造体の製造方法。
- [請求項6] 前記コラーゲン線維脱水工程に次いで、
前記脱水したコラーゲン線維を架橋処理および／または薬剤処理を行う処理工程を行い、ついで、
前記処理したコラーゲン線維を乾燥する乾燥工程を行うことを特徴とする、請求項5記載のコラーゲン構造体の製造方法。

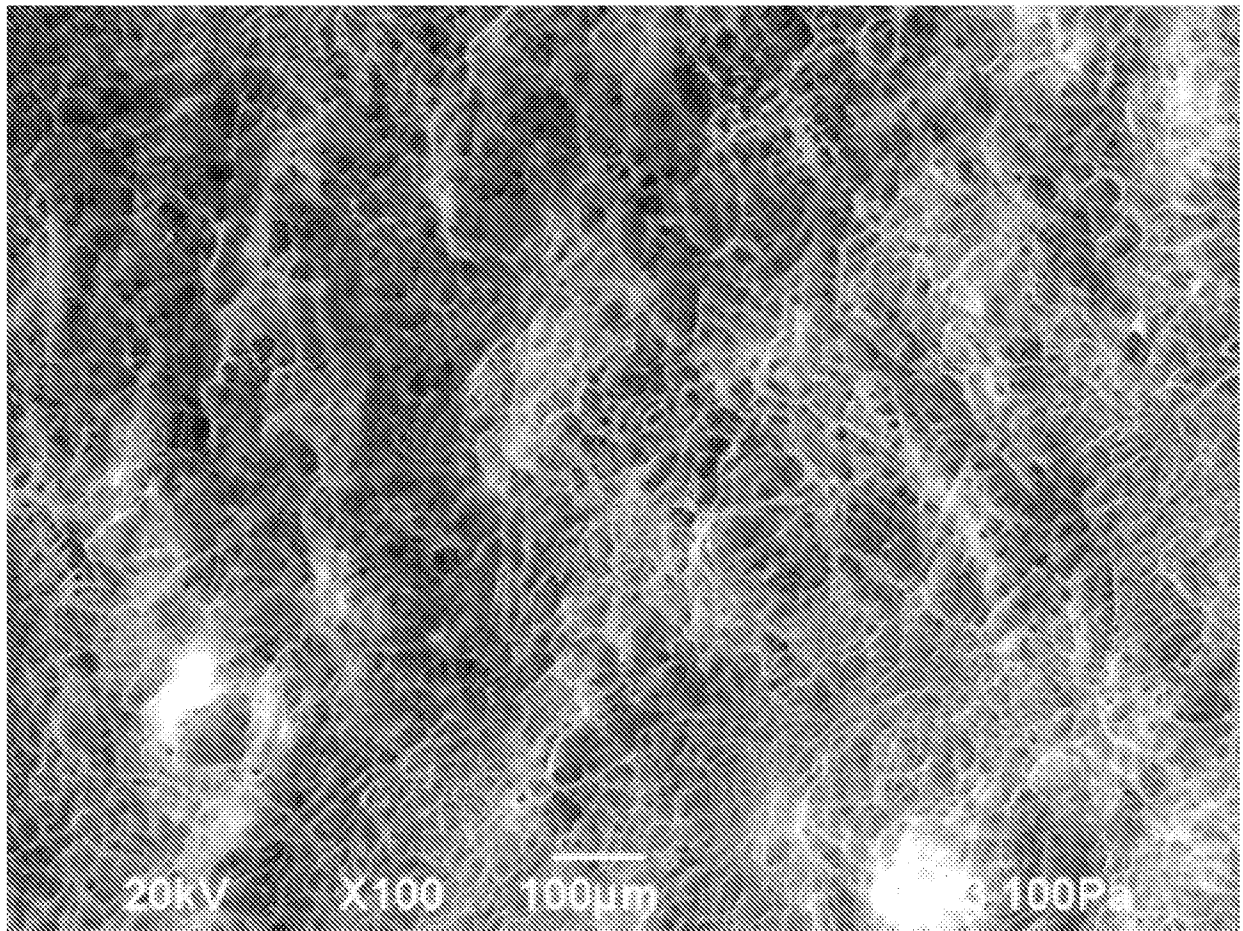
[図1]



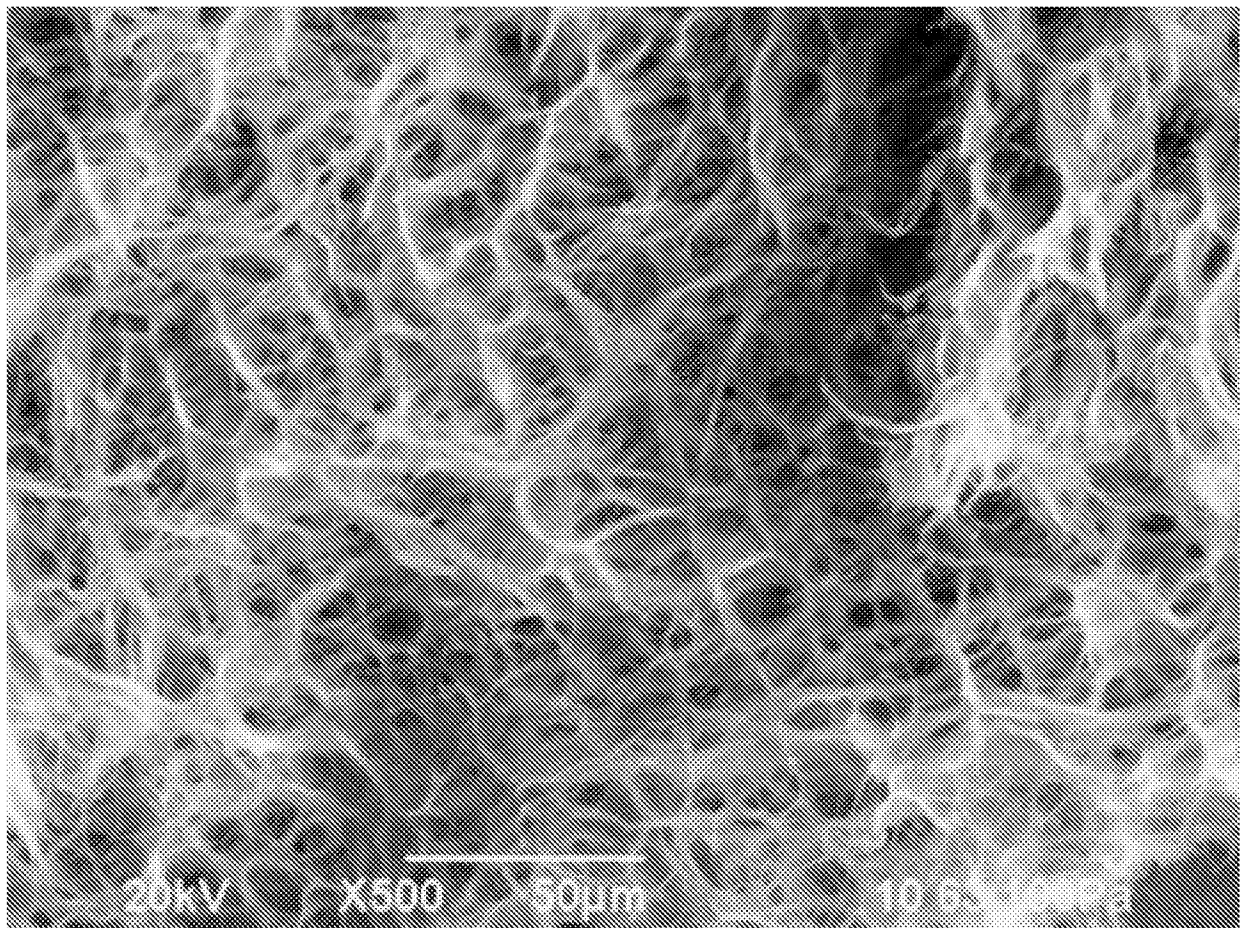
[図2]



[図3]

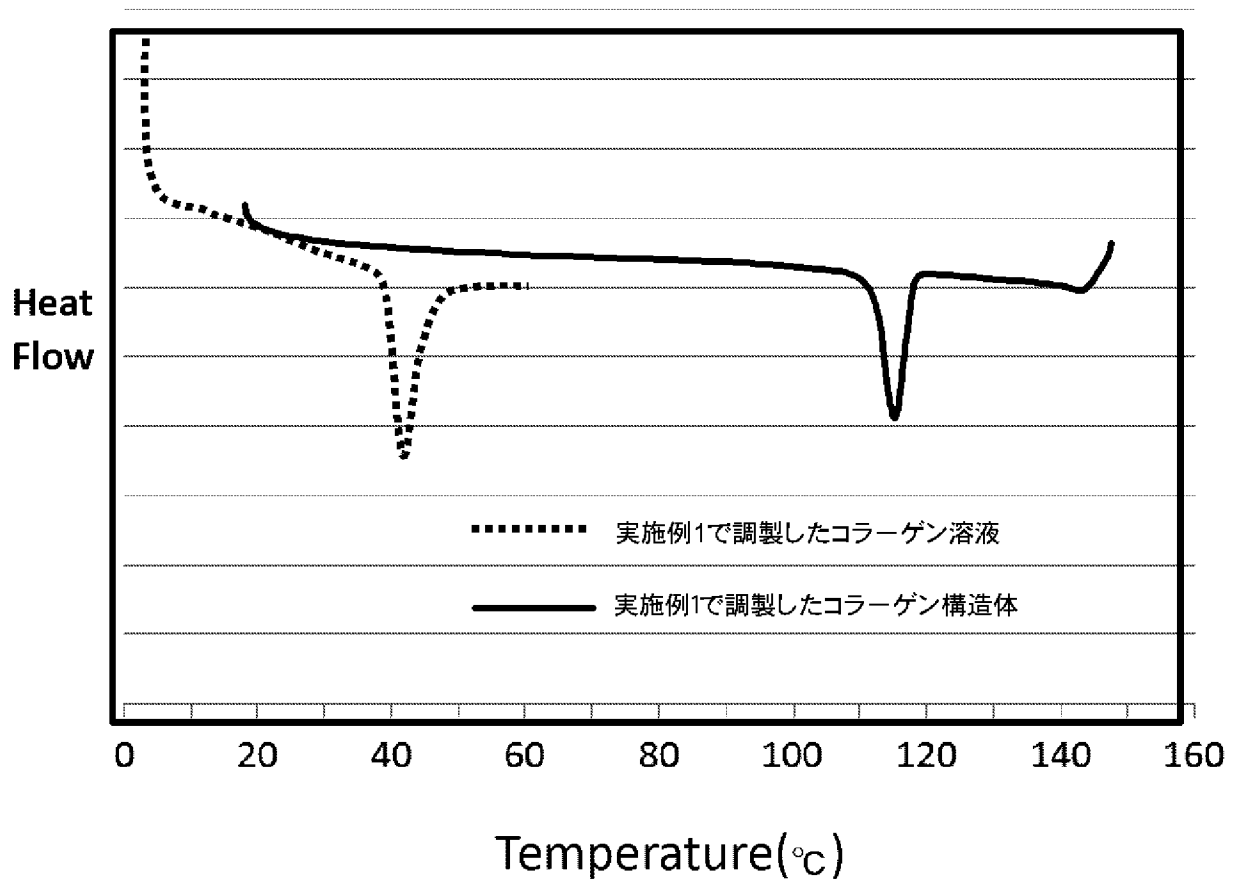


[図4]

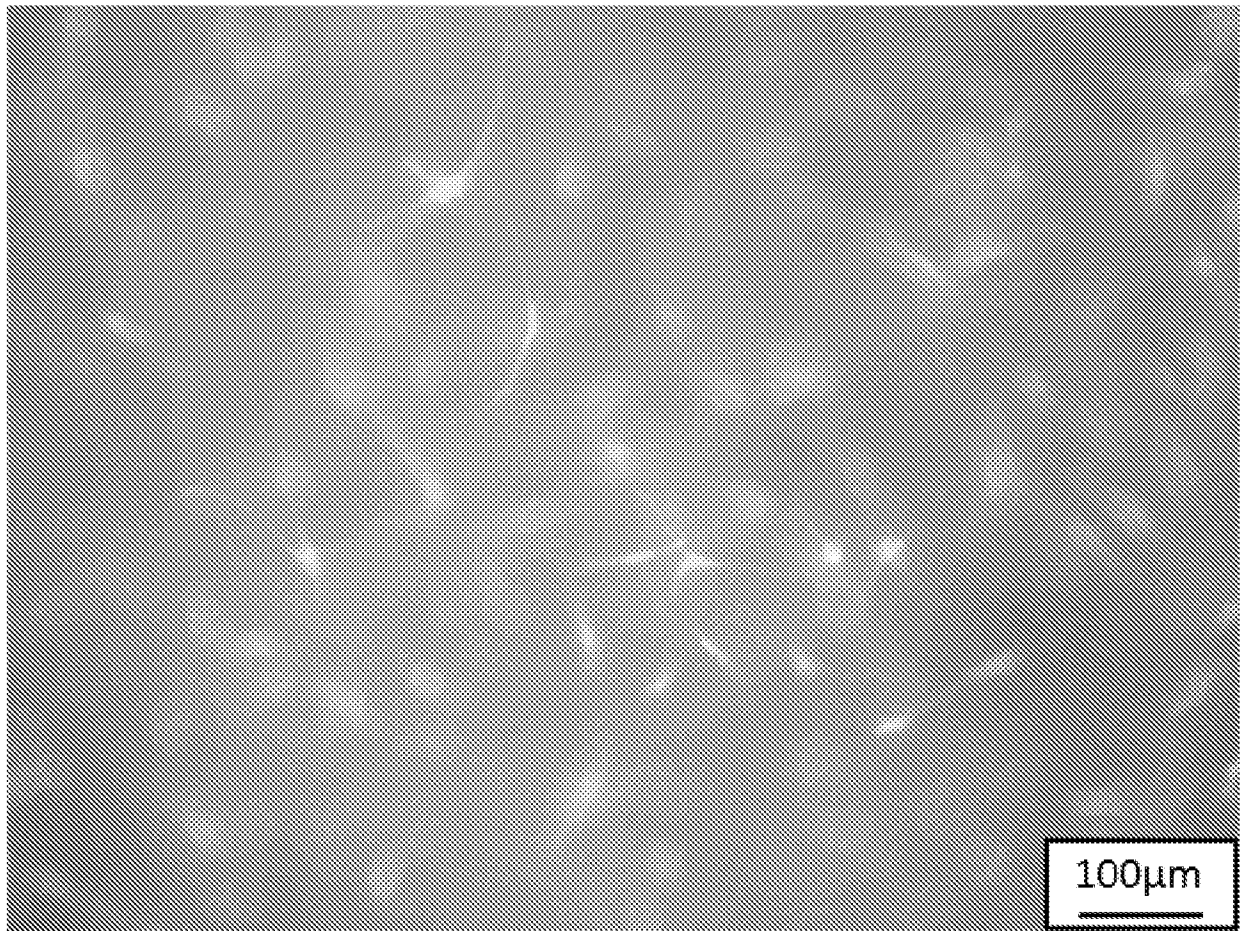


[図5]

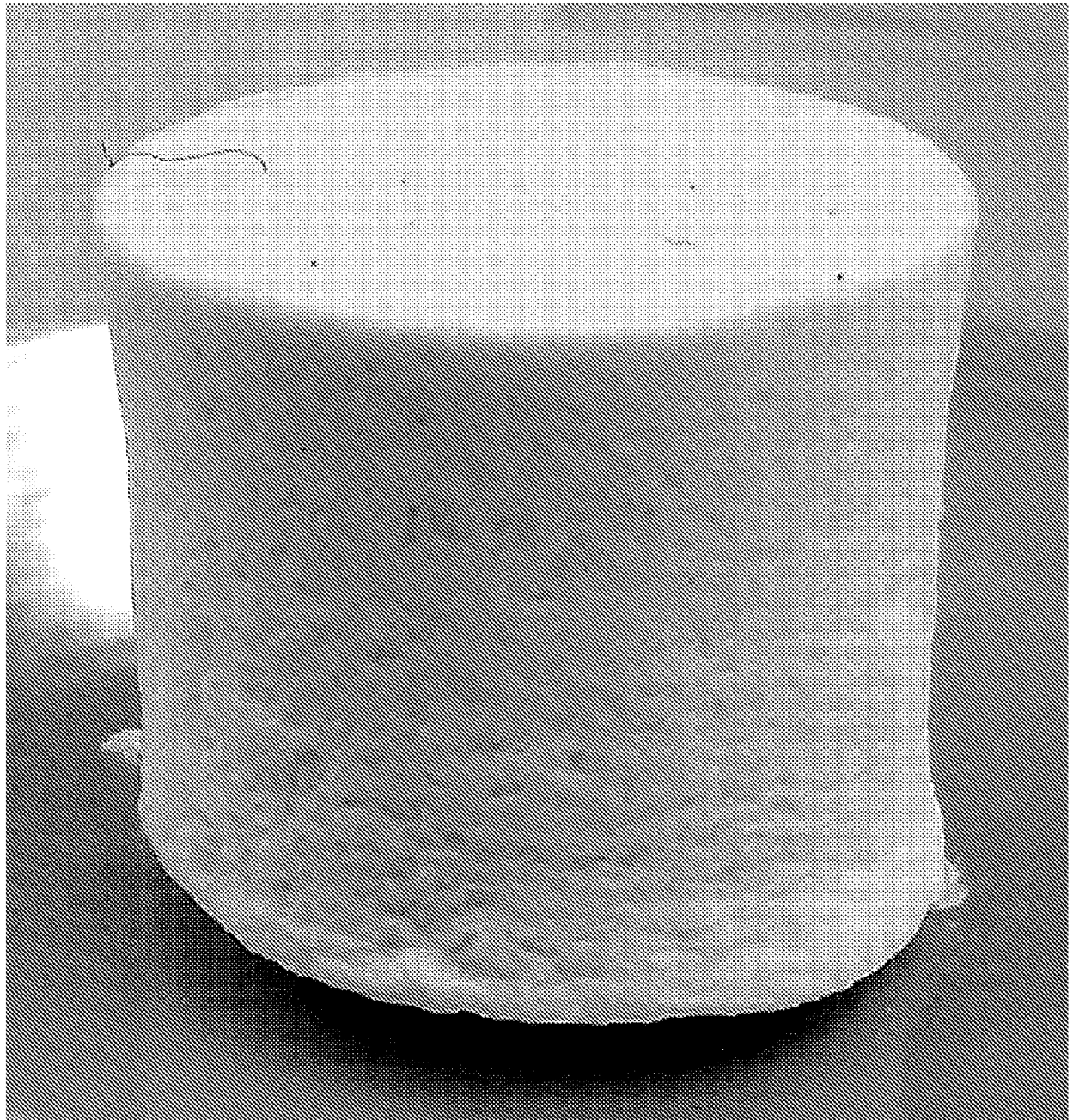
Differential scanning calorimetry (DSC)



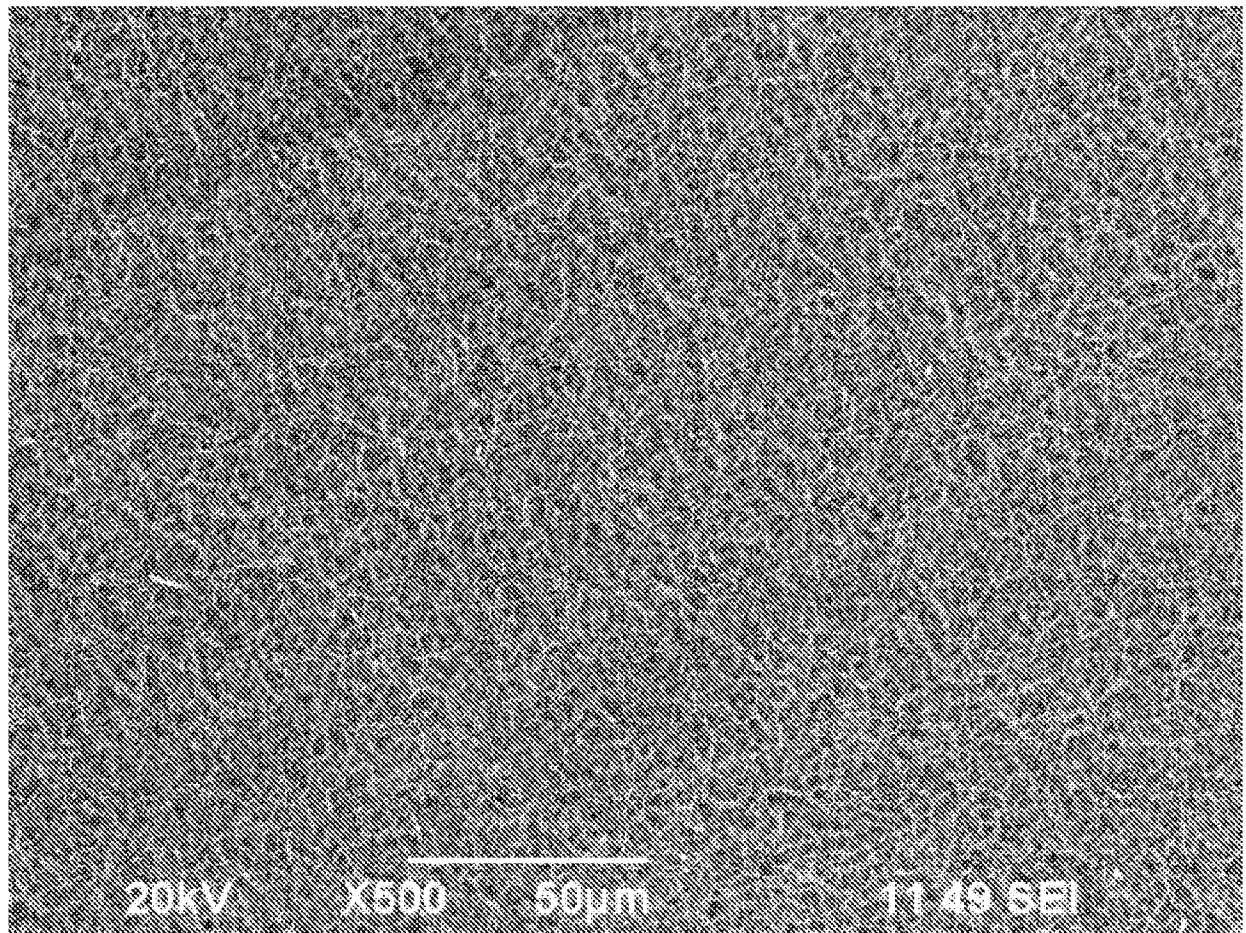
[図6]



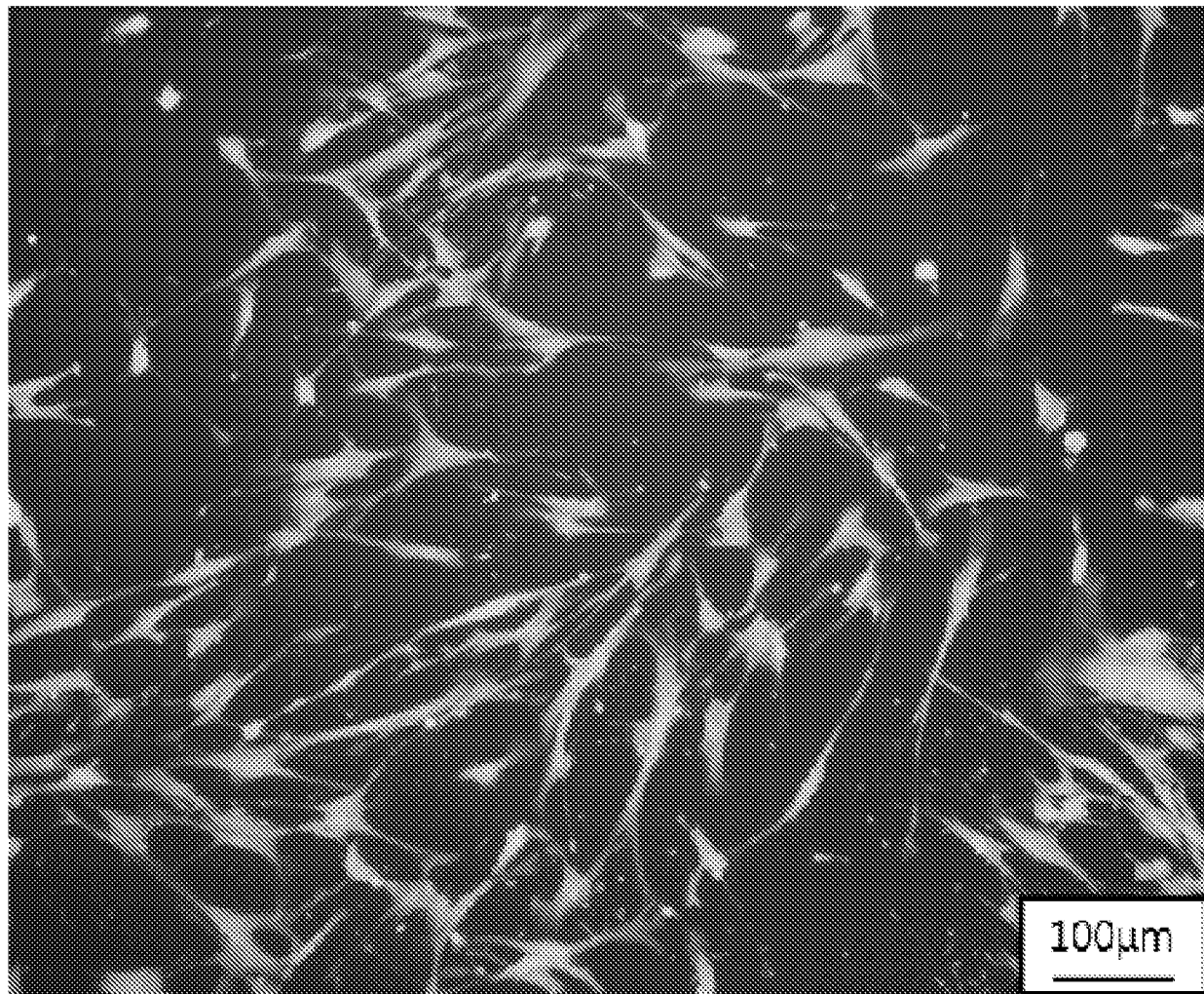
[図7]



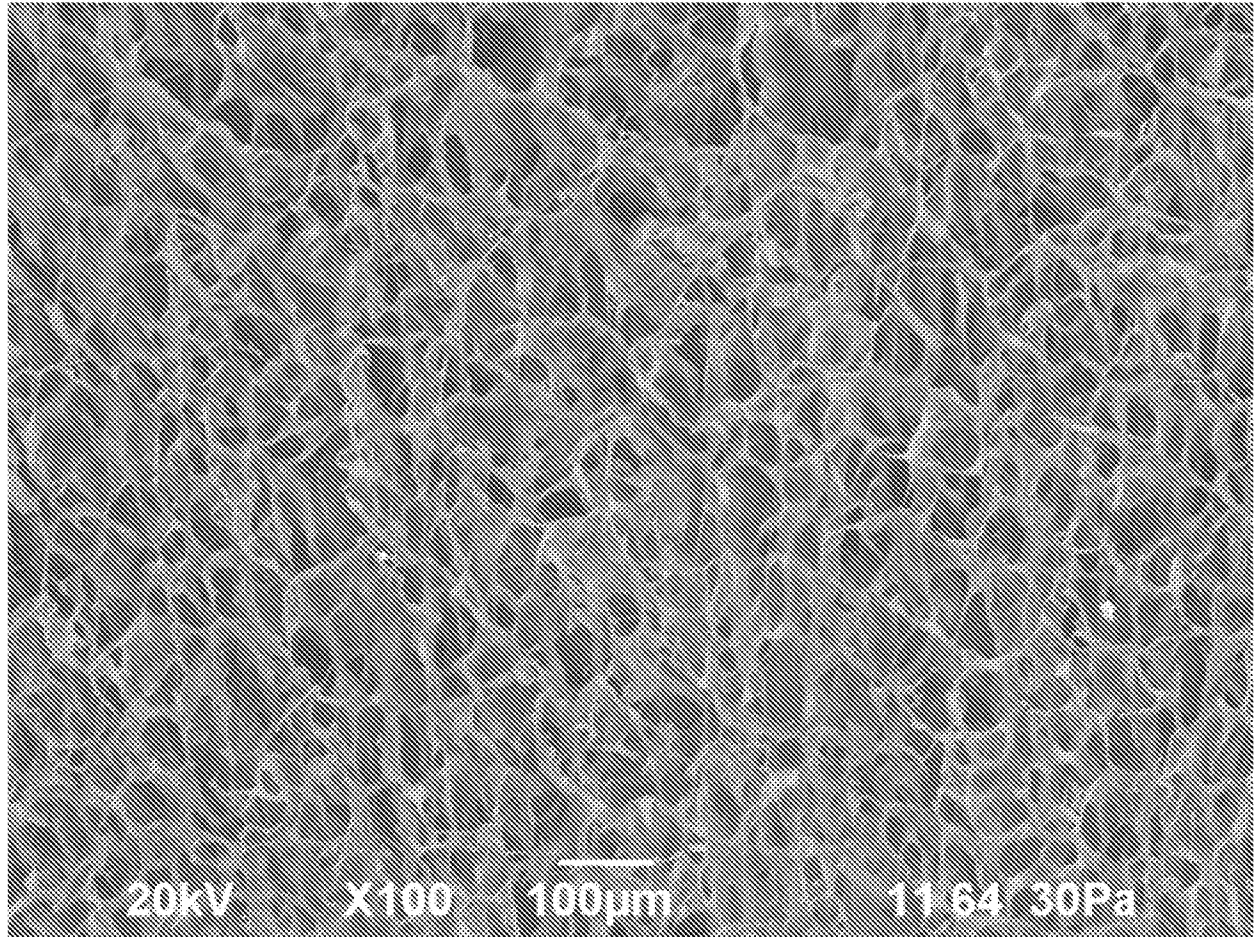
[図8]



[図9]



[図10]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2013/050484

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

A61L27/00(2006.01)i, A61K8/64(2006.01)i, A61K38/17(2006.01)i, A61P7/04(2006.01)i, A61P17/02(2006.01)i, A61P19/02(2006.01)i, A61P35/00(2006.01)i, A61P37/02(2006.01)i, A61P43/00(2006.01)i

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)

A61L27/00, A61K8/64, A61K38/17, A61P7/04, A61P17/02, A61P19/02, A61P35/00, A61P37/02, A61P43/00

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Jitsuyo Shinan Koho	1922-1996	Jitsuyo Shinan Toroku Koho	1996-2013
Kokai Jitsuyo Shinan Koho	1971-2013	Toroku Jitsuyo Shinan Koho	1994-2013

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

CAPLUS/REGISTRY/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS (STN),
JSTPLUS/JMEDPLUS/JST7580 (JDREAMII)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	JP 2010-273847 A (Tokyo Institute of Technology), 09 December 2010 (09.12.2010), entire text (Family: none)	1-6
A	JP 6-22579 B2 (Terumo Corp.), 30 March 1994 (30.03.1994), cited in the specification of the present application as "patent document 1"; entire text & US 5263983 A & EP 403650 A1 & WO 1989/008465 A1 & DE 68915540 C & DE 68915540 D & AU 3212689 A & AU 632273 B & JP 1-230366 A	1-6

Further documents are listed in the continuation of Box C.

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
06 March, 2013 (06.03.13)

Date of mailing of the international search report
19 March, 2013 (19.03.13)

Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2013/050484

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	JP 4681214 B2 (Gunze Ltd.), 11 May 2011 (11.05.2011), cited in the specification of the present application as "patent document 2"; entire text & JP 2005-314 A	1-6
A	JP 7-100 B2 (Gunze Ltd.), 11 January 1995 (11.01.1995), cited in the specification of the present application as "patent document 3"; entire text & US 5116552 A & EP 440198 A2 & DE 69114150 C & DE 69114150 D & JP 3-224573 A	1-6
A	JP 3221690 B2 (Organogenesis, Inc.), 22 October 2001 (22.10.2001), cited in the specification of the present application as "patent document 4"; entire text & US 5256418 A & US 5378469 A & EP 457430 A2 & EP 607346 A & WO 1993/006791 A1 & DE 69121301 C & DE 69121301 D & DE 69229232 C & DE 69229232 T & ES 2093077 T & DK 457430 T & AT 141171 T & CA 2039910 A & GR 3021312 T & ES 2132132 T & AT 180158 T & CA 2120736 A & DK 607346 T & GR 3030797 T & CA 2039910 A1 & JP 4-227264 A & JP 7-500037 A	1-6
A	JP 4064435 B2 (Ihara & Co., Ltd.), 19 March 2008 (19.03.2008), cited in the specification of the present application as "patent document 5"; entire text & US 2006/0177492 A1 & EP 1723974 A1 & WO 2005/079879 A	1-6
A	JP 4251665 B2 (Yasuhiko SHIMIZU), 08 April 2009 (08.04.2009), cited in the specification of the present application as "patent document 6"; entire text & US 6277397 B1 & US 2001/0016205 A1 & EP 943346 A1 & EP 1442756 A2 & DE 69729314 D & DE 69729314 T & CA 2272905 A & TW 501934 B & AT 267619 T & DK 943346 T & ES 2221044 T & KR 10-2000-0057131 A & CN 1237913 A & CN 1550581 A & WO 1998/022157 A1	1-6

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2013/050484

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	JP 2820209 B2 (Collagen Corp.), 05 November 1998 (05.11.1998), cited in the specification of the present application as "patent document 7"; entire text & US 5024841 A & US 4950483 A & US 5110604 A & US 5219576 A & EP 428541 A & WO 1990/000060 A1 & DE 68924069 C & DE 68924069 D & AT 127022 E & AU 3964689 A & CA 1339007 A & AT 127022 T & AU 623163 B & JP 4-500954 A	1-6
A	JP 4671365 B2 (The Kitasato Institute), 13 April 2011 (13.04.2011), cited in the specification of the present application as "patent document 8"; entire text & US 2010/0203638 A1 & EP 1857543 A1 & AT 552332 T & WO 2006/088029 A1	1-6
A	JP 2010-172247 A (The Kitasato Institute), 12 August 2010 (12.08.2010), cited in the specification of the present application as "patent document 9"; entire text & WO 2010/087397 A1	1-6

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int.Cl. A61L27/00(2006.01)i, A61K8/64(2006.01)i, A61K38/17(2006.01)i, A61P7/04(2006.01)i,
A61P17/02(2006.01)i, A61P19/02(2006.01)i, A61P35/00(2006.01)i, A61P37/02(2006.01)i,
A61P43/00(2006.01)i

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int.Cl. A61L27/00, A61K8/64, A61K38/17, A61P7/04, A61P17/02, A61P19/02, A61P35/00, A61P37/02, A61P43/00

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

日本国実用新案公報	1922-1996年
日本国公開実用新案公報	1971-2013年
日本国実用新案登録公報	1996-2013年
日本国登録実用新案公報	1994-2013年

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

CAplus/REGISTRY/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS(STN)
JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamII)

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号
A	JP 2010-273847 A (国立大学法人東京工業大学) 2010. 12. 09, 文献全体, (ファミリーなし)	1~6
A	JP 6-22579 B2 (テルモ株式会社) 1994. 03. 30, 本願で「特許文献1」として引用, 文献全体, & US 5263983 A & EP 403650 A1 & WO 1989/008465 A1 & DE 68915540 C & DE 68915540 D & AU 3212689 A & AU 632273 B & JP 1-230366 A	1~6

C欄の続きにも文献が列挙されている。

パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの
「E」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの
「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)
「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献
「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献
「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの
「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの
「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの
「&」同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

06. 03. 2013

国際調査報告の発送日

19. 03. 2013

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/J P)
郵便番号100-8915
東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

井上 典之

4C

9360

電話番号 03-3581-1101 内線 3452

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号
A	JP 4681214 B2 (グンゼ株式会社) 2011. 05. 11, 本願で「特許文献 2」として引用, 文献全体, & JP 2005-314 A	1~6
A	JP 7-100 B2 (グンゼ株式会社) 1995. 01. 11, 本願で「特許文献 3」として引用, 文献全体, & US 5116552 A & EP 440198 A2 & DE 69114150 C & DE 69114150 D & JP 3-224573 A	1~6
A	JP 3221690 B2 (オーガノジェネシス・インコーポレイテッド) 2001. 10. 22, 本願で「特許文献 4」として引用, 文献全体, & US 5256418 A & US 5378469 A & EP 457430 A2 & EP 607346 A & WO 1993/006791 A1 & DE 69121301 C & DE 69121301 D & DE 69229232 C & DE 69229232 T & ES 2093077 T & DK 457430 T & AT 141171 T & CA 2039910 A & GR 3021312 T & ES 2132132 T & AT 180158 T & CA 2120736 A & DK 607346 T & GR 3030797 T & CA 2039910 A1 & JP 4-227264 A & JP 7-500037 A	1~6
A	JP 4064435 B2 (井原水産株式会社) 2008. 03. 19, 本願で「特許文献 5」として引用, 文献全体, & US 2006/0177492 A1 & EP 1723974 A1 & WO 2005/079879 A	1~6
A	JP 4251665 B2 (清水慶彦) 2009. 04. 08, 本願で「特許文献 6」として引用, 文献全体, & US 6277397 B1 & US 2001/0016205 A1 & EP 943346 A1 & EP 1442756 A2 & DE 69729314 D & DE 69729314 T & CA 2272905 A & TW 501934 B & AT 267619 T & DK 943346 T & ES 2221044 T & KR 10-2000-0057131 A & CN 1237913 A & CN 1550581 A & WO 1998/022157 A1	1~6
A	JP 2820209 B2 (コラーゲン・コーポレイション) 1998. 11. 05, 本願で「特許文献 7」として引用, 文献全体, & US 5024841 A & US 4950483 A & US 5110604 A & US 5219576 A & EP 428541 A & WO 1990/000060 A1 & DE 68924069 C & DE 68924069 D & AT 127022 E & AU 3964689 A & CA 1339007 A & AT 127022 T & AU 623163 B & JP 4-500954 A	1~6

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号
A	JP 4671365 B2 (学校法人北里研究所) 2011. 04. 13, 本願で「特許文献 8」として引用, 文献全体, & US 2010/0203638 A1 & EP 1857543 A1 & AT 552332 T & WO 2006/088029 A1	1~6
A	JP 2010-172247 A (学校法人北里研究所) 2010. 08. 12, 本願で「特許文献 9」として引用, 文献全体, & WO 2010/087397 A1	1~6