

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局



(43) 国際公開日
2006年2月2日 (02.02.2006)

PCT

(10) 国際公開番号
WO 2006/011296 A1

- (51) 国際特許分類⁷: C12N 5/06, A61K 35/32, A61L 27/00
- (21) 国際出願番号: PCT/JP2005/010038
- (22) 国際出願日: 2005年6月1日 (01.06.2005)
- (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2004-223616 2004年7月30日 (30.07.2004) JP
- (71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 大塚製薬株式会社 (OTSUKA PHARMACEUTICAL CO., LTD.) [JP/JP]; 〒1018535 東京都千代田区神田司町2丁目9番地 Tokyo (JP).
- (72) 発明者; および
- (75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 大鹿 周佐 (OHSHIKA, Shusa) [JP/JP]; 〒0368562 青森県弘前市在府町5 弘前大学医学部 整形外科学講座内 Aomori (JP). 高垣 啓一 (TAKAGAKI, Keiichi) [JP/JP]; 〒0368063 青森県弘前市宮園1丁目1-13 Aomori (JP). 藤 哲 (TOH, Satoshi) [JP/JP]; 〒0368221 青森県弘前市紙漕町5-4 ミカミハイツ407 Aomori (JP). 石橋 恭之 (ISHIBASHI, Yasuyuki) [JP/JP]; 〒0368062 青森県弘前市青山4-4-9 Aomori (JP).
- (74) 代理人: 三枝 英二, 外 (SAEGUSA, Eiji et al.); 〒5410045 大阪府大阪市中央区道修町1-7-1 北浜 T N K ビル Osaka (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, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, 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, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, MC, NL, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).
- 規則4.17に規定する申立て:
— 全ての指定国のための不利にならない開示又は新規性喪失の例外に関する申立て (規則4.17(v))
- 添付公開書類:
— 国際調査報告書
— 不利にならない開示又は新規性喪失の例外に関する申立て
- 2文字コード及び他の略語については、定期発行される各PCTガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語のガイダンスノート」を参照。

(54) Title: METHOD OF THREE-DIMENSIONALLY CULTURING CHONDROCYTES

(54) 発明の名称: 軟骨細胞の三次元培養方法

(57) Abstract: It is intended to provide a method of three-dimensionally culturing normal joint chondrocytes; the production and supply of chondrocytes; and a transplantation material to be used in an injured site in a joint tissue.

(57) 要約: 関節正常軟骨細胞の三次元培養方法、軟骨細胞の生産供給および関節組織損傷部位への移植用材を供給する。

WO 2006/011296 A1

明 細 書

軟骨細胞の三次元培養方法

技術分野

[0001] 本発明は、主として軟骨細胞の産生方法および軟骨組織の損傷時への移植用材の提供に関する。また、本発明は、軟骨組織研究用キットに関する。

背景技術

[0002] 関節軟骨に何らかの原因で損傷や欠損が生じた場合、完全な修復がなされ関節軟骨が再生されることは希である。その原因の一つに軟骨細胞の性質が挙げられる。つまり、関節軟骨細胞は高度に分化した細胞であり、殆ど増殖・分化せず、その修復能力は極端に低いということである。もう一つの原因として軟骨細胞特有の周囲環境が考えられる。軟骨組織は、神経・血管を欠いた組織であるため、出血・炎症・肉芽形成による修復機転が働かないこと、また軟骨細胞周囲を細胞外基質が取り囲むことによって、軟骨細胞が健全部位から損傷部位に簡単に遊走できないことである。

[0003] また、関節軟骨損傷部位は、経時的に周囲や相対する軟骨をも変性に陥れ、最終的には変形性関節症へと進行し、疼痛・可動域制限など関節機能の低下を引き起こす。そのため、関節軟骨修復法として今日まで様々な治療方法が行われてきたが、欠損部を完全な硝子軟骨で修復する方法は現在のところ確立していないのが現状である。

[0004] 近年の細胞工学の進歩と共に、自家軟骨細胞を利用した軟骨組織再生の試みが盛んに行われてきた。損傷部位への移植材料としては、軟骨細胞が必要量保持されていること、保持されている軟骨細胞が十分な細胞外基質を産生できることが重要である。

[0005] しかしながら、自家軟骨片から軟骨細胞を分離後、単層培養で増殖させた場合では、培養中に軟骨細胞が線維芽細胞に脱分化してしまうという問題点があり、軟骨細胞の形質を維持した状態での培養は困難である。また、三次元的な構造を呈する足場として、コラーゲンゲル・スポンジ、アガロースゲル、ゼラチン、キトサン、ヒアルロン酸、およびPGA,PLA,PLGAなどの生体材料が報告されているが、現在のところ軟骨

基質に相当する強度、摩擦係数を有する素材は開発されておらず、関節軟骨組織に近い状態の移植用剤が望まれていた。

発明の開示

発明が解決しようとする課題

[0006] 本発明は、軟骨細胞の培養方法、およびこれに基礎を置いた軟骨組織損傷部位における軟骨組織再生のための移植用材、および軟骨組織の研究キットを提供することを目的としている。

課題を解決するための手段

[0007] 本発明者らは、斯かる実情に鑑み鋭意努力を重ねた結果、各種成長因子を用いなくとも正常軟骨細胞をコラーゲンおよびプロテオグリカンのみからなるゲル状構造物内にて、形質を保持したままの状態を増殖させ得ることを見出した。また、培養後の正常軟骨細胞を含むゲル状構造物ではこれら軟骨細胞の産生する軟骨組織成分が新たな軟骨組織類似の3次元構造物を再構築しており、理想的な軟骨組織再生用移植用材を提供できることを見出した。この事実は更に進めて、今後の軟骨組織の研究材料をも提供することができる。

[0008] すなわち、以下に示す発明を提供することができる。

項1. 軟骨細胞をコラーゲン及びプロテオグリカンを含むゲル状構造物中に包埋した状態で培養することを特徴とする軟骨細胞の三次元培養方法。

項2. コラーゲンとプロテオグリカンの比率が1:0.3~1.1(重量比)である項1に記載の方法。

項3. コラーゲン及びプロテオグリカンからなるゲル状構造物中で軟骨細胞を増殖させることを特徴とする軟骨細胞の生産方法。

項4. コラーゲン及びプロテオグリカンからなるゲル状構造物中に軟骨細胞を包埋してなる軟骨組織を再生可能なゲル状構造物。

項5. 軟骨組織損傷部への移植用材である項4のゲル状構造物。

項6. 少なくとも軟骨細胞、コラーゲン及びプロテオグリカンを含む軟骨組織研究用キット。

発明の効果

[0009] 本発明軟骨細胞の三次元培養により軟骨細胞の形質を維持したまま細胞を培養することができ移植用材としての軟骨組織用材料を提供することができる。

図面の簡単な説明

[0010] [図1]図1は、軟骨細胞をI型アテロコラーゲンおよびプロテオグリカンからなるゲル状構造物中にて培養したときの細胞数の変化を示した図である。

[0011] なお、各群におけるI型アテロコラーゲン:プロテオグリカンの比率は、A群(1:0)、B群(1:0.05)、C群(1:0.51)、D群(1:2.56)である。

[図2]図2は、培養後ゲル構造物をヘマトキシリン・エオジン染色した図である。但し、aはA群を、bはB群を、cはC群を示す。

[図3]図3は、培養後ゲル構造物をアルシアンブルー染色した図である。但し、aはA群を、bはB群を、cはC群を示す。

[図4]図4は、培養後ゲル構造物のII型コラーゲンの免疫染色結果を示した図である。

[0012] 但し、aはA群を、bはB群を、cはC群を示す。

[図5]図5は、培養56日目のゲル構造物(A群)をデジタルカメラ撮影したものである。

[図6]図6は、培養56日目のゲル構造物(C群)をデジタルカメラ撮影したものである。

発明を実施するための最良の形態

[0013] 本発明の好ましい1つの実施形態において、本発明の対象となる軟骨細胞は、関節組織に存在する正常軟骨細胞を使用できるが、軟骨細胞に分化・誘導可能な骨髄細胞、間葉系幹細胞等から得られた軟骨細胞を使用してもよい。また、目的に応じてヒトおよびヒト以外の動物由来正常軟骨細胞を使用することができる。

[0014] コラーゲンはコラーゲン(例えばI、II、III、IV、V、VI、VIII、IX、X型など、或いはこれらの混合物)であれば特に制限はないが、好ましくはI型およびII型コラーゲンをを用いることができ、特に好ましくはII型コラーゲン、またはII型コラーゲンを含むコラーゲン混合物)を用いることができる。

[0015] コラーゲンは、水溶性を増すためにアテロコラーゲンであることが好ましく、三次元構造を有し足場の形成が可能であれば、更に低分子化されたコラーゲン酵素水解物

などであっても良い。また、移植対象がヒトである場合はヒト由来のコラーゲンであることが望ましいが、特に制限はなくヒト以外の動物コラーゲンであっても良く、例えばウサギ、ウシ、ウマ、マウスなどを好適に使用することができる。

[0016] 本明細書において、「ゲル状構造物」または「三次元構造物」とは、軟骨細胞がその中に包埋され得、軟骨細胞の足場となり、該構造物中で軟骨細胞が増殖可能であるものを意味する。

[0017] プロテオグリカンの由来は、ヒトおよびヒト以外の動物のいずれでも良く、さらに材料採取の面から魚類又は大動物由来プロテオグリカンを用いても良い、例えば哺乳動物にあつてはウサギ、ウシ、ウマ、マウスなどを好適に使用することができる。また、魚類としてサケ、サメなどから単離されたプロテオグリカンを用いることができる。

[0018] これらコラーゲンとプロテオグリカンの比率は、正常軟骨細胞の形質を維持した状態で増殖せしめるために特に重要であり、好ましくは重量比でコラーゲン1に対しプロテオグリカン0.3～1.1程度の範囲内であることが好ましく、より好適には、コラーゲン1に対しプロテオグリカン0.5～0.7程度であることが好ましい。

[0019] 軟骨細胞を培養する培養液としては通常軟骨細胞又は間葉系細胞の培養に用いられている培地または添加剤を制限なく使用することができ、培地としては例えばRPMI1647, RPMI1640, MEM, BME, 5A, DM120, RITC80-7, F12, L-15, MCDB104, MCDB107等の培地を好適に用いることができる。また、培養に際しては血清を添加することが望ましいが、該血清濃度は1～20%の間で状況により適宜選択することができ、好適には5～15%より好適には5～10%の範囲で使用することができる。血清の種類としては、各種動物由来の血清を制限なく使用することができ、例えば牛血清、牛胎児血清、ウマ血清等を使用することができる。

[0020] また、使用するコラーゲンおよびプロテオグリカンは前述所定の比率で培地に対して混合するが、ゲル化し三次元構造物を形成できる濃度範囲内で使用することが望ましく、コラーゲンの濃度は、0.8～2.4重量%、好ましくは1.2～2.0重量%；プロテオグリカン濃度は0.4～1.2重量%、好ましくは0.6～1.0重量%；コラーゲンとプロテオグリカンの合計の濃度は1.2～3.6重量%程度、好ましくは1.8～3.0重量%程度である。これらの濃度が低すぎるとゲルの強度が不十分になり、濃度が高すぎるとゲルが硬くなり

すぎ、十分な立体構造が維持できなくなる。

- [0021] このようにして、混合したゲルに対し軟骨細胞を添加し充分均一になるように攪拌した後、培養器上に滴下又は置くことによりゲル状構造物を完成させることができる。
- [0022] 該構造物を安定化させるためには、培養器上に滴下又は置いた後10～30分程度、インキュベーター内で静置することが望ましい。次いで、該ゲル状構造物が水没する程度に培地を添加し培養を開始する。これは、常用されているコラーゲンドロップ法(Journal of Hepato-Biliary-Pancreatic Surgery 5(3) 261-268 (1998))に準じて行なうことができるが、必ずしもこれに制限されるものではない。また、使用軟骨細胞は、例えば損傷関節部位から採取したものを、常法に従い分離したものを使用することができる。また、使用細胞数としては、ml単位当たり例えば $1 \times 10^3 \sim 1 \times 10^6$ 個程度の範囲内で好適に用いることができ、より好適には $1 \times 10^4 \sim 5 \times 10^5$ 個程度であることが好ましい。
- [0023] また、培養期間は、2～8週間程度が適当であるが、8週間以上培養しても細胞の形態は維持されている。従って、培養時添加する軟骨細胞数によって、適宜培養期間を調製すればよい。かくして本培養条件において軟骨細胞は、ゲル状構造物内において形質を維持した状態で増殖する。培養期間中は2～4日に一度の割合で培地交換をすることが好ましいが、通常行なわれる細胞培養の条件の範囲内である。
- [0024] 関節軟骨組織においては、正常軟骨細胞の占める割合は2%程度に過ぎずコラーゲン、プロテオグリカンを始めとする細胞外マトリックスの占める割合が非常に高くなっている。この意味で、関節組織における細胞外マトリックスの存在は重要であるが、本培養においても軟骨細胞はその形質を維持したまま増殖を開始するのみならず、細胞外マトリックスを産生する。すなわち、軟骨細胞のマーカーであるII型コラーゲンおよびプロテオグリカンなどの通常関節組織において存在する細胞外マトリックスがゲル状構造物中に蓄積され、この意味で、擬似関節組織を構築しているものと思われる。したがって、培養後軟骨細胞のみを採取できることはもちろんであるが、擬似軟骨組織を形成しているゲル状構造物自体を軟骨損傷時の該損傷部位の再生目的とした良好な移植用材として提供することもできる。
- [0025] この際、培養後ゲル状構造物を損傷形態に応じカットし、該損傷部位に埋め込むこ

とにより達成できる。

- [0026] また、このような擬似軟骨組織ゲル状構造物は、正常軟骨細胞の産生したII型コラーゲン、プロテオグリカンまたはフィブロネクチンなどの細胞外マトリックスにより再構築されたものであるため、さらに軟骨組織の研究をする上でも優れた材料を提供することができる。したがって、軟骨細胞、コラーゲンおよびプロテオグリカンから構成される軟骨組織研究用キットを提供することができる。

実施例

- [0027] 以上の本発明を更に詳しく説明するため実施例を挙げる。なお、これらの実施例は、単なる例示目的として記載されており、本発明を限定するものではない。

実施例1

軟骨細胞の培養

ウサギ膝関節軟骨から分離された軟骨細胞(株式会社ホクドーより購入)を用いた。軟骨細胞は、1世代継代されたものを実験に用いた。また、培養用メデイウムは、10% FBSおよび100 μ Mアスコルビン酸を含むRPMI1670培地(株式会社ホクドー)を用いた。3%I型アテロコラーゲン:(プロテオグリカン+培養用メデイウム) = 65 μ l:60 μ lとなるように混合し、これに軟骨細胞 約 1×10^5 個を加えた。(アテロコラーゲン:プロテオグリカンの重量での比率 A群(1:0)、B群(1:0.05)、C群(1:0.51)、D群(1:2.56)) 次いで十分に攪拌後、35 mmディッシュに滴下し、37°Cで10分間インキュベーションしゲル化させた。ゲル化が良好であることを確認後、培養用メデイウムを2.5 ml加えた。5%CO₂で37°Cの下培養を行なった。また、2回/週で培地交換を行ない、21日間培養を行なった。

- [0028] この間、培養開始から7および14日目に以下に述べる手順に従い細胞数を計測した。即ち、ディッシュからゲルを剥離し別の35 mmディッシュに移し変えた後、培養用メデイウムとコラゲナーゼ(コラゲナーゼ S-1, 新田ゼラチン)を加え、37°Cで60分間インキュベーションし遊離させた(図1)。なお、細胞生存率はヘモサイトメーターにて計測した。また、細胞の生存数はトリパンブルー染色にて確認した。その結果、A~C群では、共に細胞数の増加を認めた。D群では、14日目に細胞数が低下していた。各群を比較すると、明らかにC群の細胞数が他群より多かった。

[0029] また、B群では線維芽細胞への形態変化もわずかに認められ、D群では形態変化は認められないが増殖が遅く、またゲルの維持も困難であった。

組織学的及び免疫組織学的評価

培養21日目に、標本を10%ホルマリンで固定し、ヘマトキシリン・エオジン染色とアルシアンブルー染色を行なった。また、硝子軟骨の重要基質であるII型コラーゲンの存在を確認するために、抗ヒトコラーゲンII型抗体(第一ファインケミカル株式会社)で免疫染色を行なった。なお、図2a, 3a, 4aは、A群を図2b, 3b, 4bは、B群を図2c, 3c, 4cは、C群を示す。

[0030] ヘマトキシリン・エオジン染色(図2a,b,c)とアルシアンブルー染色(図3a,b,c)より、C群において明らかな細胞数の増大を認めた。いずれの染色においても軟骨細胞と軟骨小窩を認め、軟骨組織が再生されていることが確認された。一方、A群は線維芽細胞様の紡錘体形細胞が多く認められた。

[0031] また、II型コラーゲンの免疫染色結果(図4a, b, c)では、軟骨細胞の周囲に茶色く染まるII型コラーゲンの存在が確認された。さらに、細胞質部分が茶色く染まっている細胞も確認され、II型コラーゲンの合成が示唆された。

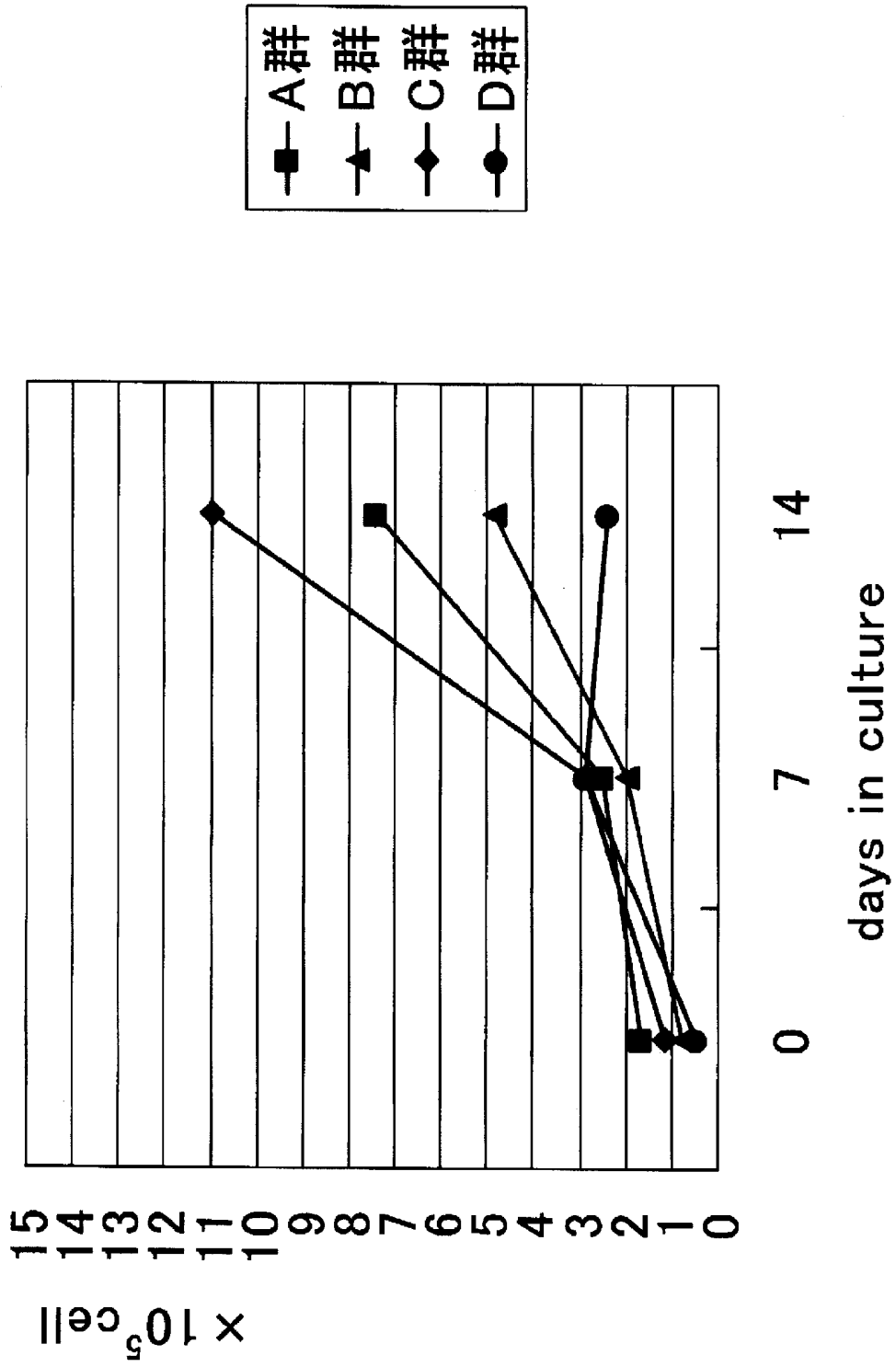
[0032] 組織学的評価において全群に共通する点として、細胞がゲル中心ではなくゲル辺縁で増殖を認めた。A, B群では、ゲル中心においてほとんど生細胞が確認されなかった。C群では、A, B群よりはゲル中心において染まる生細胞を認めた。D群では、ゲル化が不良であり、コラーゲンとプロテオグリカンの混合比に問題があるものと思われる。染色評価は行なわなかった。

[0033] また、培養56日目の培養ゲルの状態を示したのが、図5(A群)および図6(C群)である。A群では、ゲルが縮小傾向を認め形が崩れ始めているのが観察される。位相差顕微鏡下では、紡錘形の細胞が重層しているのが確認され軟骨細胞が線維芽細胞様に変化しているものと推定された。一方、C群はゲル表面は滑らかでありゲルの形が保持された状態であった。また、位相差顕微鏡下での観察では円形の細胞が重層されているのが確認され軟骨細胞の形質を維持したまま増殖しているものと考えられた。

請求の範囲

- [1] 軟骨細胞をコラーゲン及びプロテオグリカンを含むゲル状構造物中に包埋した状態で培養することを特徴とする軟骨細胞の三次元培養方法。
- [2] コラーゲンとプロテオグリカンの比率が1:0.3~1.1(重量比)である請求項1に記載の方法。
- [3] コラーゲン及びプロテオグリカンからなるゲル状構造物中で軟骨細胞を増殖させることを特徴とする軟骨細胞の生産方法。
- [4] コラーゲン及びプロテオグリカンからなるゲル状構造物中に軟骨細胞を包埋してなる軟骨組織を再生可能なゲル状構造物。
- [5] 軟骨組織損傷部への移植用材である請求項4のゲル状構造物。
- [6] 少なくとも軟骨細胞、コラーゲン及びプロテオグリカンを含む軟骨組織研究用キット。

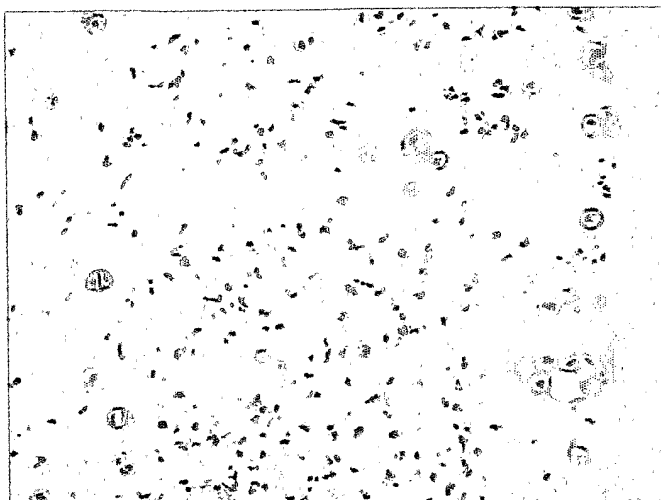
[図1]



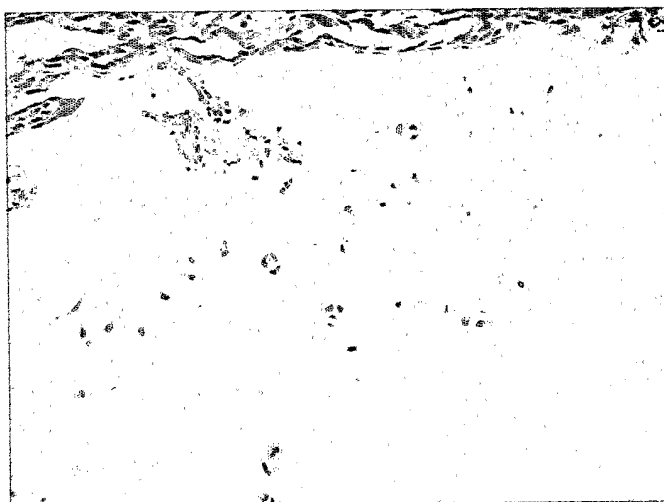
A群
B群
C群
D群

[図2]

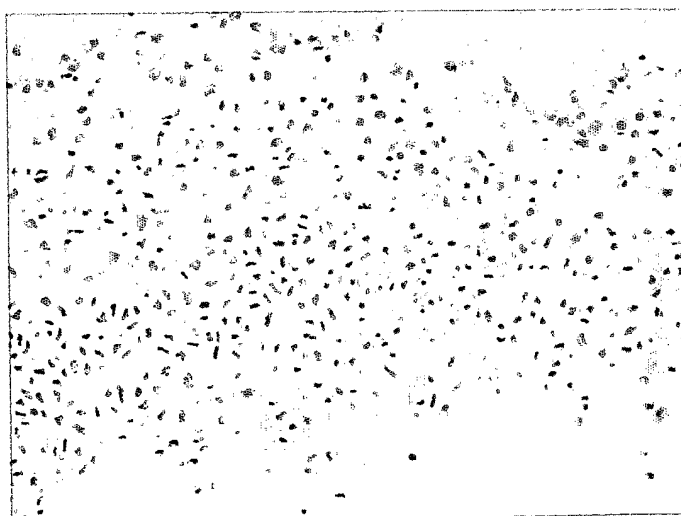
- a



- b

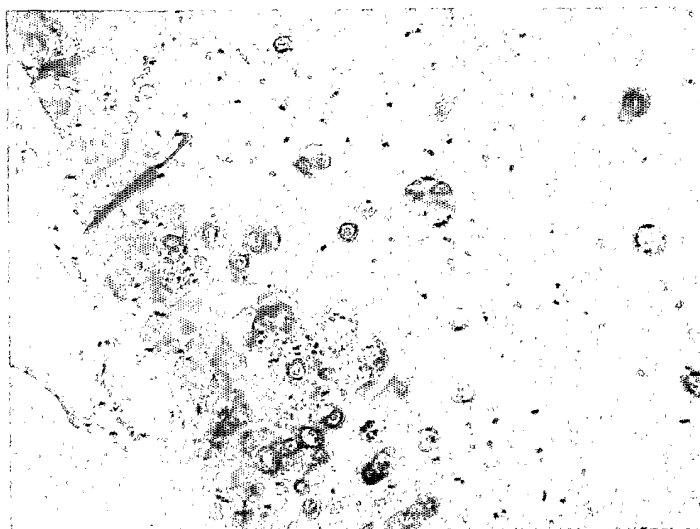


- c

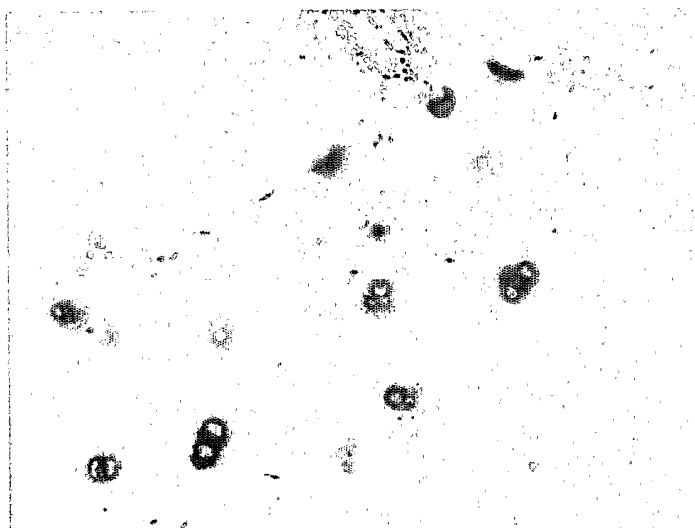


[図3]

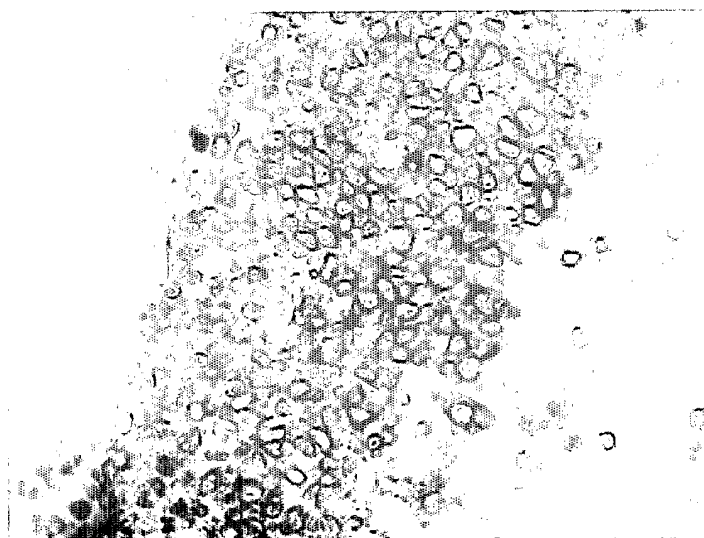
- a



- b

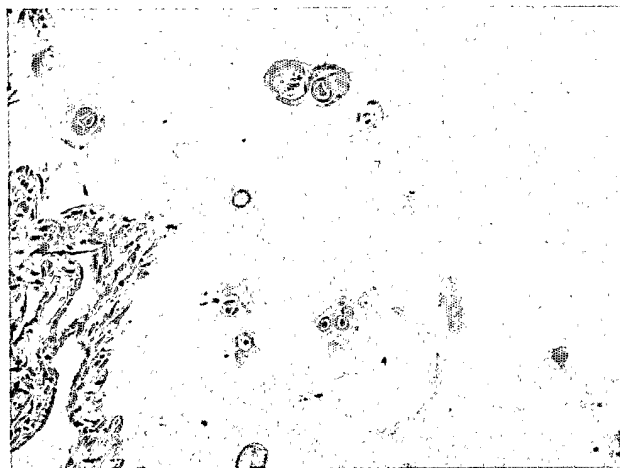


- c

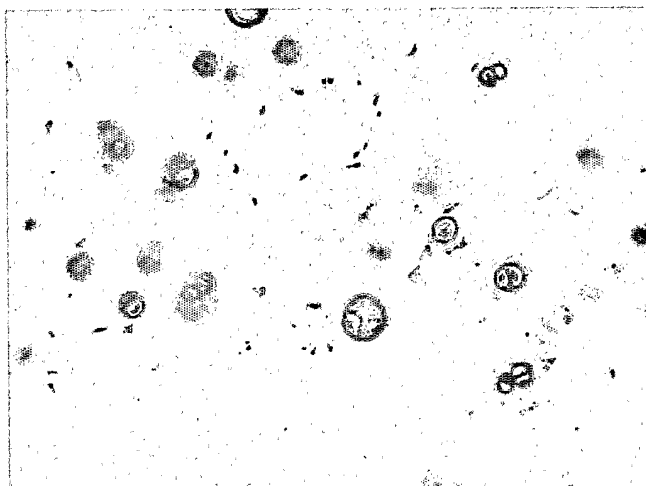


[図4]

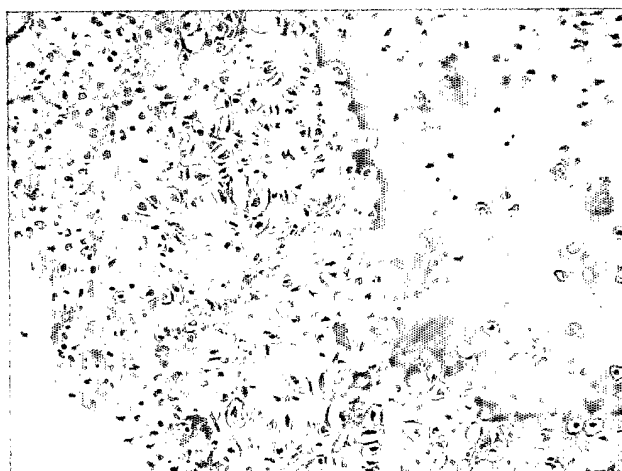
- a



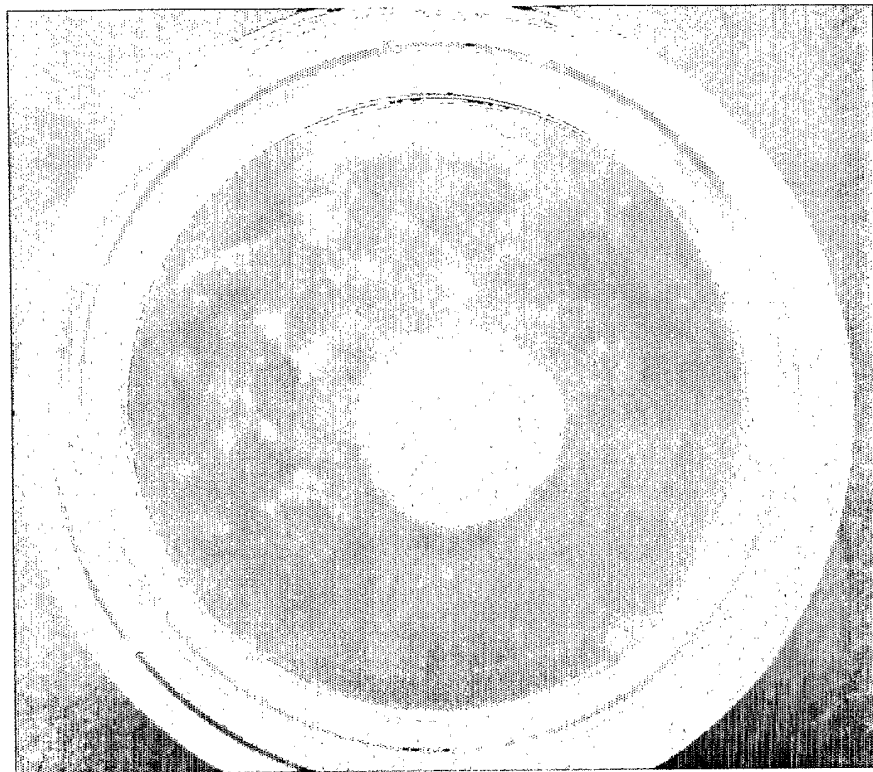
- b



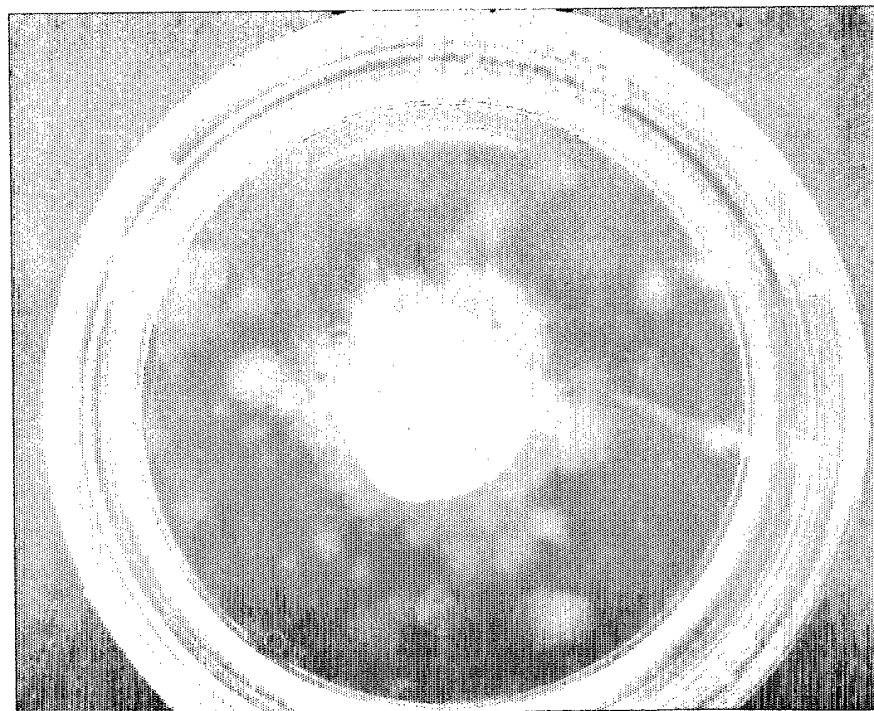
- c



[図5]



[図6]



PCT

紙面による写し(注意 提出用では有りません)

VIII-5-1	不利にならない開示又は新規性喪失の例外に関する申立て 不利にならない開示又は新規性喪失の例外に関する申立て(規則4.17(v)及び51の2.1(a)(v)) 氏名(姓名)	本国際出願 に関し、 大塚製薬株式会社 は、本国際出願の請求項に記載された対象が以下のよ うに開示されたことを申し立てる。
VIII-5-1(i)	開示の種類:	その他 発表
VIII-5-1(ii)	開示の日付:	2004年 06月 03日 (03.06.2004)
VIII-5-1(iii)	開示の名称:	コラーゲンゲル三次元培養における軟骨由来プロテオ グリカンが軟骨細胞に与える影響
VIII-5-1(iv)	開示の場所:	第36回 日本結合組織学会学術大会
VIII-5-1(v)	本申立ては、次の指定国のためになされたものである。:	すべての指定国

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2005/010038

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER Int.Cl ⁷ C12N5/06, A61K35/32, A61L27/00		
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) Int.Cl ⁷ C12N5/06, A61K35/32, A61L27/00		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) MEDLINE (STN), BIOSIS/WPI (DIALOG), JSTPlus (JOIS)		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
<u>X</u> <u>Y</u>	Shusa OOSHIKA et al., "Collagen Gel Sanjigen Baiyo ni Okeru Nankotsu Yurai Proteoglycan ga Nankotsu Saibo ni Ataeru Eikyo", Connect Tissue, Vol.36, No.2, 2004.06, page 88	<u>1, 3-6</u> 5
<u>X</u> <u>Y</u>	Schuman L et al., "Chondrocyte behaviour within different types of collagen gel in vitro.", Biomaterials, Vol.16, No.10, 1995, pp.809-14	<u>1, 6</u> 2-5
<u>X</u> <u>A</u>	Chaipinyo K et al., "Effects of growth factors on cell proliferation and matrix synthesis of low-density, primary bovine chondrocytes cultured in collagen I gels.", J.Orthop.Res., Vol.20, No.5, 2002.09, pages 1070 to 1078	<u>1, 6</u> 2-5
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 27 July, 2005 (27.07.05)		Date of mailing of the international search report 16 August, 2005 (16.08.05)
Name and mailing address of the ISA/ Japanese Patent Office		Authorized officer
Facsimile No.		Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2005/010038

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
<u>Y</u> A	French MM et al., "Expression of the heparan sulfate proteoglycan, perlecan, during mouse embryogenesis and perlecan chondrogenic activity in vitro.", J.Cell Biol., Vol.145, No.5, 31 May, 1999 (31.05.99), pp.1103-15	<u>2-5</u> 1,6
<u>P,X</u> <u>P,Y</u>	OHSHIKA S et al., "Effect of Exogenous Proteoglycan on Cultured Chondrocyte", Seikagaku, Vol.76, No.8, 25 August, 2004 (25.08.04), page 1009	<u>1,3-6</u> 5
A	WO 2003-084385 A2 (WILLIAM MARCH RICE UNIVERSITY), 16 October, 2003 (16.10.03), & US 2003-0215426 A1 & EP 001490477 A & CA 002479840 A	1-6
A	Knudson CB et al., "Cartilage proteoglycans.", Semin Cell Dev.Biol., Vol.12, No.2, 2001.04, pages 69 to 78	1-6
A	Arikawa-Hirasawa E et al., "Perlecan is essential for cartilage and cephalic development." Nat.Genet., Vol.23, No.3, 1999. 11, pages 354 to 358	1-6

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC)) Int.Cl. ⁷ C12N5/06, A61K35/32, A61L27/00		
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. ⁷ C12N5/06, A61K35/32, A61L27/00		
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		
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) MEDLINE (STN), BIOSIS/WPI (DIALOG), JSTPlus (JOIS)		
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 請求の範囲の番号
X	大鹿周左 他, コラーゲンゲル三次元培養における軟骨由来プロテオグリカンが軟骨細胞に与える影響, Connect Tissue, Vol. 36, No. 2, 2004.06, p. 88	1, 3-6
Y		5
X	Schuman L et al., "Chondrocyte behaviour within different types of collagen gel in vitro.", Biomaterials, Vol. 16, No. 10, 1995, pp. 809-14	1, 6
Y		2-5
<input checked="" type="checkbox"/> C欄の続きにも文献が列挙されている。 <input type="checkbox"/> 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 27. 07. 2005	国際調査報告の発送日 16. 8. 2005	
国際調査機関の名称及びあて先 日本国特許庁 (ISA/JJP) 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) 飯室 里美 電話番号 03-3581-1101 内線 3448	4B 3435

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 請求の範囲の番号
X	Chaipinyo K et al., "Effects of growth factors on cell proliferation and matrix synthesis of low-density, primary bovine chondrocytes cultured in collagen I gels.", J Orthop Res., Vol. 20, No. 5, 2002. 09, pp. 1070-1078	1, 6
A		2-5
Y	French MM et al., "Expression of the heparan sulfate proteoglycan, perlecan, during mouse embryogenesis and perlecan chondrogenic activity in vitro.", J Cell Biol., Vol. 145, No. 5, 1999. 05. 31, pp. 1103-15	2-5
A		1, 6
PX	OHSHIKA S et al., "Effect of Exogenous Proteoglycan on Cultured Chondrocyte", 生化学, Vol. 76, No. 8, 2004. 08. 25, p. 1009	1, 3-6
PY		5
A	WO 2003-084385 A2 (WILLIAM MARCH RICE UNIVERSITY) 2003. 10. 16, US 2003-0215426 A1 & EP 001490477 A & CA 002479840 A	1-6
A	Knudson CB et al., "Cartilage proteoglycans.", Semin Cell Dev Biol., Vol. 12, No. 2, 2001. 04, pp. 69-78	1-6
A	Arikawa-Hirasawa E et al., "Perlecan is essential for cartilage and cephalic development.", Nat Genet., Vol. 23, No. 3, 1999. 11, pp. 354-358	1-6