

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第3643381号

(P3643381)

(45) 発行日 平成17年4月27日(2005.4.27)

(24) 登録日 平成17年2月4日(2005.2.4)

(51) Int. Cl.<sup>7</sup>

A 6 1 L 27/00

F I

A 6 1 L 27/00

G

請求項の数 9 (全 8 頁)

(21) 出願番号	特願平8-525497	(73) 特許権者	500039717
(86) (22) 出願日	平成8年2月22日(1996.2.22)		エド・ガイストリヒ・ゼーネ・アクチエン
(65) 公表番号	特表平11-503338		ゲゼルシャフト・フューア・ヒューミシェ
(43) 公表日	平成11年3月26日(1999.3.26)		・インドゥストリー
(86) 国際出願番号	PCT/GB1996/000399		スイス国ツェー・ハー—6110ヴォルフ
(87) 国際公開番号	W01996/025961		ーゼン, バーンホーフシュトラーセ40
(87) 国際公開日	平成8年8月29日(1996.8.29)	(74) 代理人	100091731
審査請求日	平成15年2月21日(2003.2.21)		弁理士 高木 千嘉
(31) 優先権主張番号	9503492.2	(74) 代理人	100080355
(32) 優先日	平成7年2月22日(1995.2.22)		弁理士 西村 公佑
(33) 優先権主張国	英国 (GB)	(72) 発明者	ガイストリヒ, ペーター
			スイス国ツェー・ハー—6362 シュタ
			ンスシュタト, ケールジテンシュトラーセ
			19

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 軟骨組織再構成のための再吸収可能な細胞外マトリックス

## (57) 【特許請求の範囲】

## 【請求項1】

コラーゲンIIの繊維から主としてなり、軟骨組織の再構成に適する再吸収可能な細胞外マトリックスであって、ここで、該マトリックスは、軟骨組織を脱脂し、次いで塩基による処理にかける方法によって製造される、前記のマトリックス。

## 【請求項2】

さらにコラーゲンの重量の、0.1~40%のグリコサミノグリカンを含む請求項1に記載のマトリックス。

## 【請求項3】

グリコサミノグリカンがコンドロイチン硫酸、ケラタン硫酸、デルマタン硫酸又はヒアルロン酸である請求項2に記載のマトリックス。

## 【請求項4】

さらにコンドロネクチン及び/又はアンコリンIIを含む請求項1~3のいずれか1項に記載のマトリックス。

## 【請求項5】

コラーゲンが再吸収不可能になることなく架橋されている請求項1~4のいずれか1項に記載のマトリックス。

## 【請求項6】

天然軟骨組織から得られる請求項1~5のいずれか1項に記載のマトリックス。

## 【請求項7】

前記天然軟骨組織がウシ、ヒツジ又はブタから得られる請求項6に記載のマトリックス。

【請求項8】

前記天然軟骨組織がブタのヒアリン軟骨である請求項7に記載のマトリックス。

【請求項9】

誘導される組織再生用移植組織の製造のための請求項1～8のいずれか1項に記載のマトリックス。

【発明の詳細な説明】

本発明は軟骨組織再構成のための細胞外マトリックスに関する。

生体組織工学において、軟骨を再構成するのは長い間困難とされてきた。一般に組織の再構成はマトリックスの繊維に沿って、また繊維間で増殖する細胞のガイドの働きをするマトリックスを用意することからなる。これまでポリ乳酸、ポリグリコール酸およびコラーゲンIまたはIIをベースとするマトリックスを用いる軟骨再構成の試みでは、イン・ビトロで軟骨細胞が装荷されたマトリックスをこの装荷されたマトリックスを適切なイン・ビボ部位に移植する前に必要としていた。このタイプのマトリックスを単純にイン・ビボ部位で移植し、マトリックス表面での天然のままの軟骨細胞の増殖を期待することは不可能であることがわかっている。移植前にイン・ビトロで軟骨細胞をマトリックスに装荷することの必要性は、軟骨細胞の無菌培養に関連して厄介な問題および難しい問題を提起するものであった。

10

それで、イン・ビボ移植後天然のままの軟骨細胞の内殖を可能とする軟骨組織再構成のためのマトリックス・インプラントが要望されている。本発明者等は、これらの要件がコラーゲン繊維のマトリックス(但し、該コラーゲンが主としてコラーゲンIIである)によって満たされうることを見出した。

20

コラーゲンは動物体内で多くの形態で存在し、異なった組織はそれぞれのタイプのコラーゲンを様々な比率で含有している。すなわち、骨コラーゲンは主としてコラーゲンIおよびIIIからなるものであるが、軟骨は少量のコラーゲンVI、IX、X、XIおよびXIIIと共に、主としてコラーゲンIIから構成されている。このような材料は皮膚および腱から得られ、コラーゲンIおよび/またはIIIからなる医薬および化粧品で使用されるコラーゲン・スポンジ材料とは著しく異なるものである。

本発明の一つの態様によれば、主としてコラーゲンIIの繊維からなる軟骨組織の再構成のための再吸収可能な細胞外マトリックスが提供される。

30

上述の如く、かかるマトリックスは少量のコラーゲンVI、IX、X、XIおよびXIIIを含有していてもよい。本発明によるマトリックスは望ましくは例えばコンドロイチン硫酸、ケラタン硫酸、デルマトン硫酸およびヒアルロン酸のようなグリコサミノグリカンからなるヒドロゲル様材料も含有し、この材料は軟骨細胞が包埋されたものとなって成長する天然の培地となるものである。一般に本発明によるマトリックスは好ましくはグリコサミノグリカンを、コラーゲンの重量の0.1～40%、例えば5～15%、例えば約10%を含有している。

本発明によるマトリックスは、脱脂およびその他の処理を施してグリコサミノグリカンと共にコラーゲンII材料が残っている天然の軟骨材料を包含していてもよいし、あるいはまた、精製コラーゲンIIの繊維がグリコサミノグリカンおよび任意の他の所要の添加物と混合されたものであってもよい。このような追加の添加物には、例えば軟骨細胞をコラーゲンII繊維に結合させる助けをするコンドロネクチンまたはアンコリンIIおよび成長因子例えば軟骨誘導因子(CIF)、インシュリン様の成長因子(IGF)およびトランスフォーミング成長因子(TGF)が包含される。

40

異なった、また場合によっては望ましくない性質を有する広汎なグリコサミノグリカンおよびプロテオグリカンが存在している。それどコラーゲンマトリックスに軟骨由来のグリコサミノグリカンと同一の組成、分子量および生理学内性質を有していない別異のソースからのグリコサミノグリカンを混入することもできるが、軟骨それ自体から得られるグリコサミノグリカンを使用するのが特に好ましい。

マトリックスが水性液体と接触したときに膨潤する範囲を制約し、一方ではマトリックス

50

の再吸収能を保持しておくたに、コラーゲンマトリックスをある程度架橋させておくのが望ましい。この膨潤によって強度および形状が失われることになる。しかし、化学的架橋はコラーゲンの諸性質に否定的な影響を及ぼすことがある細孔サイズに関連して生理学的に不利益をもたらすことがある。細孔サイズは細胞の化学走性およびその他の機能を促進させるために任意選択的に約 $0.4\mu$ でなければならない。本発明によるコラーゲンマトリックスは軟骨組織を脱脂次いで塩基による処理を施し、これによってプロテオグリカンおよびグリコサミノグリカン除去することによって有利に製造することができる。

軟骨材料は普通には入手容易な動物源例えば牛、羊または豚からの材料である。好ましい材料は豚からのヒアリン軟骨である。このものは望ましい比率で適切なタイプのコラーゲンおよびグリコサミノグリカン含有し、適当に大量で入手し得る。

10

軟骨は屠殺後冷凍し、例えば約8mmの粒子径にサイズを小さくしておくのが好ましい。サイズを小さくする前に軟骨を水に浸漬し、そして肉、骨およびその他の所望しない材料を機械的に取り除いておく。

次にこの小粒子化軟骨を水混和性有機溶剤例えばアセトンで処理することにより脱水するのが好ましく、これは若干の脂肪を取り除くのに有用である。脱水によってコラーゲン繊維が収縮し、相互に分離し、その結果その次の脱脂工程ができるだけ能率的に利用されるものとなる。次に材料を脂肪溶剤例えば炭化水素例えばヘキサンまたはハロゲン化炭化水素で脱脂する。

脱脂後、材料を完全に洗浄し、そして本来存在していた水ができるだけ取り込まれるまで洗浄を続ける。この操作により、この材料は以下の塩基処理のために最適化されるのである。

20

塩基処理は強アルカリ例えばアルカリ金属水酸化物例えば水酸化ナトリウムで例えば1~8重量%の濃度で実施することができる。処理時間は原材料およびアルカリ濃度によって変わるが、一般には10~48時間である。処理温度は一般に20以下である。pH値は普通は12~14の範囲にある。上述した条件はNaOHによる処理に対して最適なものである。他の塩基による処理では若干変更した条件を必要とすることがある。

塩基処理は次のような効果を奏する：

少量の残留脂肪がけん化される。

非コラーゲンのアルカリ可溶タンパク質が変性され破壊され溶解されそして除去される。

コラーゲン中のアミド基がけん化され、それによってコラーゲンの電荷および等電点が変わる。

30

細菌、プリオンおよびウイルスが不活性化され、これによりコラーゲンが滅菌される。

この処理によりプロテオグリカンが、以下のとおりの特徴を有する有用な修飾を受けるみとが見い出された：

プロテオグリカン中のグリコサミノグリカンとコアタンパク質との共有結合が開裂される。これによってグリコサミノグリカンがプロテオグリカンのタンパク質から脱離される。これを脱離と称する。

塩基処理により、コアタンパク質が小さいペプチドに分断され、これらのペプチドは透析または限外濾過によって反応混合物から除去することができる。

強い負の電荷のために、グリコサミノグリカンは水溶性の塩を形成し、これらの塩はコラーゲンから部分的に洗い出すことができる。しかしこれらの塩は塩基処理では開裂されないかまたはごく僅か開裂されるだけであり、透析によりペプチドから分離することができる。グリコサミノグリカンの一部分(コラーゲンの約3重量%)はコラーゲンに結合している。

40

精製グリコサミノグリカンは塩基処理工程から生じた抽出物を透析または限外濾過することによって得られる。

本発明の操作によれば、酵素的処理は多種の異なる物質が存在しているので一般には使用されない。しかしながら、この次の工程には材料を有機酸または無機酸、例えば塩酸で処理することが含まれる。これは以下のような効果を奏する：

必要としない酸感受性材料が除去される。

50

繊維構造が緩められる。

次に、材料を一般には材料のpH値が2.5~4.0となるまで洗浄される。材料のpH値は正確に調節するのが好ましい。材料のpH値は軟骨の横断面にわたって均一でなければならない。酸処理後、軟骨は水膨潤状態である。次に材料は例えばコロイドミルを用いて機械的にサイズを小さくされる。水性媒質中のコラーゲンの濃度は約2.5~3.5重量%である。この混合物のpH値は若干酸性例えば3.5~4.5でなければならない。

このところでグリコサミノグリカンを経製コラーゲン塊に例えばコラーゲンの重量の0.1~40%、好ましくは5~10%の範囲で加えることができる。

コラーゲンに加えるグリコサミノグリカンは好ましくは上述の如く天然軟骨から取り出したものである。マトリックスはコラーゲンIIに加えて、グリコサミノグリカン、ヒアルロン酸、コンドロイチン硫酸およびケラタン硫酸を含有している。コンドロイチン硫酸およびケラタン硫酸はコアタンパク質に共有結合されているが、ヒアルロン酸は実際プロテオグリカンに結合されてはいるが、共有結合的ではない。塩基的作用によってコアタンパク質との結合が開裂し、グリコサミノグリカンがタンパク質から遊離される。さらに加えて、コアタンパク質が小さいペプチドに開裂し、これらペプチドは透析または限外濾過によって容易に除去される。コアタンパク質が除去されることが重要である。その理由はこのタンパク質が免疫学上活性であり得るからである。それ故、コアタンパク質の除去が本発明の方法の重要な部分となるものである。

塩基抽出物からのグリコサミノグリカンの回収は次の如くして実施することができる：  
媒質を6~8の範囲のpH値に中和する。

非コラーゲンタンパク質を例えばカオリンのような吸着剤による処理によって除去する。液の限外濾過は10000ダルトン未満の重量の分子の通過を可能とする膜を用いて実施される。

液の濃縮は約2~5重量%の固形分含量まで実施される。

グリコサミノグリカンをコラーゲンIIと混和した後、材料をコロイドミル中でさらにホモジナイズし、そして固形分含量を1.5~2.5重量%に調整する。次にこの塊を2種のタイプの製品、すなわちスポンジまたはコラーゲンシートの製造に用いる。

スポンジの製造にはホモジナイゼーションで得られる塊を冷凍する。冷凍は正確にコントロールしなければならず、これにより冷凍時間、pH値および粒子サイズは再現可能な細孔サイズとするために正確に維持する。次に、冷凍生成物を凍結乾燥する。凍結乾燥後、スポンジを少なくとも2時間120~140℃に加熱する。このようにして材料は軽度の架橋によって安定化される。凍結乾燥後、材料を所望の厚さに切断し、必要な形状に打ち抜きし、滅菌し、それから包装する。

強度が不十分なためにスポンジの使用は若干の分野で使用が制限されているので、本発明によるマトリックスは広範囲な医療適応例で使用するのに適したコラーゲンシートの製造に有利に使用することができる。

コラーゲンシートの製造には、液状懸濁液中の精製コラーゲン繊維の濃度は0.2~3重量%、有利には0.5~2重量%の範囲になければならない。空気は除いておくのが好ましい。

次に、中間工程としてゲルを形成させる。コラーゲンゲルの製造はゲル形成について既知の様々な技術によって行うことができる。

次にゲルを普通はプレートの上で乾燥する。このようにして水が除去されるだけでなく、細胞の増殖に非常に有益である不溶性コラーゲン-グリコサミノグリカン生成物が形成される。

上述の生成物のいずれかについて、本発明によるマトリックスに有効物質を補足することができる。それで水溶性または水分散性のいずれの生理学的に活性な物質を使用することができる。それ故マトリックスは、有利には医薬物質、例えば抗菌剤例えばタウロリジン(taurolidine)、または抗生物質例えばテトラサイクリンおよびゲンタマイシンを含有することができる。

本発明によれば、本発明によるマトリックスを軟骨組織の誘導再生に使用することも提供

10

20

30

40

50

される。

以下の実施例は説明のためにのみ掲記するものである。

#### 実施例 1

新たに屠殺したブタの凍結した軟骨を徹底的に洗浄し、そして機械的に肉残渣、骨及び硬質断片をきれいに取り除いた。その後、材料を流水で30分間洗浄した。

続いて、材料をホモジェナイザーで3回細砕した。砕きの終了時の視覚による粒子の大きさは約8mmであった。

軟骨細片をアセトンで4回の洗浄をそれぞれ8時間実施して脱水した。次いで軟骨をn-ヘキサンで4回抽出して脱脂した。それぞれの処理は少なくとも8時間続けた。ヘキサンの軟骨に対する比は1:10であった。

脱脂後、軟骨を飲料水中で膨潤させた。水：材料の比は10:1、処理時間は24時間であった。

次いで材料をNaOH(5重量%)を使用して、軟骨の液体に対する比1:4、処理時間32時間で処理した。処理の間、軟骨片を十分に攪拌した。続いて、アルカリを軟骨から洗浄して除いた。これにより元のpH14から9~11に下がった。溶解した不純物は軟骨から完全に洗浄され、除かれた。アルカリ処理で生じる液体はグリコサミノグリカンの回収のため集められた。

コラーゲン材料は次いで強HCl(約3重量%)を使用して、当初のpHを1.0として処理を行った。処理時間は4~6時間であった。

その後、材料を冷水でpHが3~3.5に上昇する十分な時間洗浄した。すべての不純物が除かれ、そしてスポンジ又は他のコラーゲン物質の製造に適する塩のないコラーゲン塊が製造物として得られた。前記目的のため、軟骨は意図する結果により脱気し、凍結しそして凍結乾燥してよい。

#### 実施例 2

実施例1におけるアルカリ処理により生じる抽出液はグリコサミノグリカン、アルカリ、変性タンパク質及び塩類を含有する。抽出液は最初にHClで中和し、中和後のpHを6とした。次いで抽出液は濾過助剤すなわち珪藻土で処理したが、この物は変性タンパク質を除く作用をする。0.5重量%の珪藻土を抽出液に加え、そして変性タンパク質と一緒に濾過して除いた。

ついで上澄液につき約100ダルトンにおいて分子量をカットオフする膜を使用して限外濾過を行った。これにより塩は除去され、精製されたグリコサミノグリカンが残った。かくして得られたグリコサミノグリカンを上のコラーゲン材料と混合して、グリコサミノグリカンを含むコラーゲンIIマトリックスを得た。

#### 実施例 3

(1) コラーゲンスポンジ及びフリース中のヘキソサミン及びアミノ酸残基の測定

正確に秤量した各々の試料(約10mg)を密封管中の10mlの3M又は6MのHCl中で、精製窒素ガス下、1.05で15又は20時間加水分解した。

管を冷蔵庫の中で冷却しそして管を開封した後、内容物を25mlの長頸フラスコに移し、そして真空回転乾燥器

(Rotavapor RE120, Büchi, Switzerland)

中で水ジェット真空下、40で乾燥させた。残留物を5mlの水に溶解した後、残留物を再度水ジェット真空下で乾燥させた。次いで、残留物をpH2.2の充填用緩衝液(Na<sup>+</sup>に関して0.2M)5mlに取り上げた。グルコサミン及びガラクトサミン値の測定には、アリクオートを充填用緩衝液で前希釈(1+10)した後、3M HClで加水分解した試料150µlをアミノ酸分析器(AlphaPlus, 4151型, Pharmacia - LKB, Freiburg)のカルトゥーシェに注入し、そしてコンピュータ(Shimadzu, Dusseldorf)を使用して標準と比較することにより評価した。同じ手順を6M HClで加水分解した試料について実行し、この場合は50µlをさらに別の試験用カルトゥーシェに注入した。3M及び6MのHClによる二重の加水分解が最適なヘキソサミン及びアミノ酸分析に必要であり、これはヘキソサミン及びチロシンについても最高値は3M HClによる加水分解後においてのみ得られ、一方バリン、イソロイシン及びロイ

10

20

30

40

50

シンについては最高値が6MHClによる加水分解後にのみ得られるからである。

(2) コラーゲンスポンジ及びフリース中の天然コラーゲン含量の測定

試料の25~30mg(正確に秤量した)を、6mg/mlのトリプシン溶液(ウシ膵臓からの凍結乾燥製品、Boehringer, Mannheim)の1.5mlを添加した0.1M炭酸水素ナトリウム溶液(pA, Merck, Darmstadt) 30mlの中に加え、そして振盪水浴(Julabo SW 1, Seelbach)中で $23 \pm 1$ で8時間インキュベートした。試料を冷蔵庫で4℃に冷却した後、60Ti-Rotor(Beckman, Munich)中で32000Rpm、4℃で30分間遠心分離した。残留物を攪拌限外濾過セル(Mod 8010, Amicon, Witten)を使用して直径25mmのDiaflow-Filter PM 10(Amicon, Witten)を通して濾過し、そして濾液の1mlを6M HClで105℃、20時間加水分解した。引き続き加水分解物の後処理及び分析は上の(1)に記載した手順と同じであるが、但し2回の蒸発乾燥後のさらなる試料の溶解は150 $\mu$ lの充填用緩衝液中で行い、その際150 $\mu$ lをアミノ酸分析器の試験用カートウーシェに注入した。アミノ酸分析後得られるヒドロキシプロリン値( $\mu$ mol/g出発物質で示す)は試料中の分解性コラーゲンの部分を表す。全コラーゲン含量を表す、加水分解(6M HCl)及び分析を並行した試料(上の(1)参照)のヒドロキシプロリン値を前記ヒドロキシプロリン値と比較すると、トリプシン非分解性コラーゲンである「天然」の百分率比が示される。

結果を次の表に示す。

表

	<u><math>\mu\text{mol}/\text{g}</math></u>	<u><math>\text{mol}/1000\text{mol}</math></u>	
ヒドロキシプロリン	795.4	97	
アスパラギン酸	381.7	47	
トレオニン	190.1	23	
セリン	257.0	31	
グルタミン酸	691.3	84	10
プロリン	913.2	112	
グリシン	2614.6	320	
アラニン	864.9	106	
システイン/2	11.5	2	
バリン	195.7	24	
メチオニン	62.7	8	20
イソロイシン	92.8	11	
ロイシン	229.9	28	
チロシン	27.0	3	
フェニルアラニン	119.9	15	
ヒスチジン	39.8	5	
ヒドロキシリジン	126.4	15	
リジン	173.5	21	30
アルギニン	395.5	48	
合 計	8182.9	1000	
グルコサミン	9.68	1.18	
ガラクトサミン	46.30	5.66	
全ヒドロキシプロリン	$795.4 \mu\text{mol}/\text{g}$		40
トリプシン分解性ヒドロキシ プロリン	$36.9 \mu\text{mol}/\text{g}$		
「天然」コラーゲン含量	95.4%		

---

フロントページの続き

- (72)発明者 スペクター, マイアロン  
アメリカ合衆国マサチューセッツ州 02115 . ポストン . フランシスストリート75 . プリガ  
ムアンドウーメンズ ホスピタル . デパートメント・オブ・オーソピーデイツク サージエリー
- (72)発明者 エクマイアー, ズデニエク  
ドイツ連邦共和国デー - 69469 ヴアインハイム . ローテトウルムシユトラーセ28

審査官 川口 裕美子

- (56)参考文献 国際公開第93/011723 (WO, A1)  
国際公開第93/019168 (WO, A1)  
特表平05-508333 (JP, A)  
特表平04-504968 (JP, A)

- (58)調査した分野(Int.Cl.<sup>7</sup>, DB名)  
A61L 27/00