

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第4230135号  
(P4230135)

(45) 発行日 平成21年2月25日(2009.2.25)

(24) 登録日 平成20年12月12日(2008.12.12)

(51) Int. Cl. F I  
**C O 8 B 37/08 (2006.01)** C O 8 B 37/08 Z  
**A 6 1 L 27/00 (2006.01)** A 6 1 L 27/00 F

請求項の数 2 (全 7 頁)

<p>(21) 出願番号 特願2001-250856 (P2001-250856)</p> <p>(22) 出願日 平成13年8月21日 (2001.8.21)</p> <p>(65) 公開番号 特開2003-55401 (P2003-55401A)</p> <p>(43) 公開日 平成15年2月26日 (2003.2.26)</p> <p>審査請求日 平成16年10月27日 (2004.10.27)</p> <p>前置審査</p>	<p>(73) 特許権者 503360115 独立行政法人科学技術振興機構 埼玉県川口市本町4丁目1番8号</p> <p>(73) 特許権者 301023238 独立行政法人物質・材料研究機構 茨城県つくば市千現一丁目2番地1</p> <p>(73) 特許権者 000195524 生化学工業株式会社 東京都千代田区丸の内一丁目6番1号</p> <p>(73) 特許権者 000190943 新田ゼラチン株式会社 大阪府大阪市浪速区桜川4丁目4番26号</p> <p>(74) 代理人 100108671 弁理士 西 義之</p> <p style="text-align: right;">最終頁に続く</p>
--	--

(54) 【発明の名称】 多官能性架橋剤によって架橋したグリコサミノグリカン-コラーゲン複合体の製造法

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

グリコサミノグリカンとコラーゲンとの架橋複合体をポリエチレングリコールのカルボキシル末端に2個以上のスクシンイミジル基を有する多官能性架橋剤を用いて製造する方法において、

リン酸緩衝液中に  $1 \times 10^8 \text{ cells/mL} \sim 1 \times 10^4 \text{ cells/mL}$  の細胞濃度範囲で架橋前に細胞をあらかじめ混合しておき、 $\text{pH} 7.0 \sim 8.0$ 、 $25 \sim 37$ 、濃度  $0.1 \sim 0.2 \text{ M}$  の  $\text{NaCl}$  を含んだ該リン酸緩衝液中でグリコサミノグリカンとコラーゲンを混合し、架橋剤濃度  $0.3 \sim 3 \text{ mM}$  で架橋することによって、生理的条件下でポリオンコンプレックスを形成せず、均一な混合溶液中で架橋形成を行ない、生きた状態

10

【請求項2】

前記複合体は、含水率が90～99重量%のゲルであることを特徴とする請求項1記載の製造法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】

本発明は、多官能性架橋剤によって架橋形成した軟骨などの組織再生マトリックス用材料であるグリコサミノグリカン-コラーゲン複合体の製造法に関する。

20

## 【 0 0 0 2 】

## 【 従来 の 技術 】

関節軟骨は、一度損傷を受けると非常に再生が困難な生体組織であることが知られている。老化やスポーツ傷害によって引き起こされる変形性関節症の患者は、世界全体で約1000万人（国内で約120万人）と言われており、軟骨を再生させるための材料開発が強く望まれている。従来、軟骨組織の主成分であるグリコサミノグリカン（ヒアルロン酸：H y A またはコンドロイチン硫酸：C h S）とポリカチオン（コラーゲン：C o l）からなる複合体の調製は、ポリイオンコンプレックスを化学架橋する方法が採られていた。

## 【 0 0 0 3 】

このような架橋生成物は、特開平8 - 3 4 7 4 7 号公報、特開平8 - 5 3 5 4 8 号公報、特表平8 - 5 0 2 0 8 2 号公報、特開平9 - 2 4 9 7 5 1 号公報、特表平10 - 5 0 1 7 0 6 号公報、特表平11 - 5 0 9 2 5 6 号公報、特表2000 - 5 0 1 9 7 5 号公報、特表2000 - 5 0 2 3 8 0 号公報などに開示されている。

10

## 【 0 0 0 4 】

## 【 発明 が 解決 し よ う と す る 課 題 】

上記の特開平9 - 2 4 9 7 5 1 号公報、特開平8 - 3 4 7 4 7 号公報、特表2000 - 5 0 1 9 7 5 号公報などに開示されている方法では、アルコール中あるいは水中で架橋反応を行うため、注入可能な架橋生体物質組成物は、細胞および組織への悪影響（細胞死）が考えられる。そのためこのような問題を回避できる架橋方法が求められている。

## 【 0 0 0 5 】

特表平10 - 5 0 1 7 0 6 号公報には、架橋形成したゲルに細胞を内包することが可能であると記載されている。しかしながら、水中では、浸透圧の違いにより細胞（膜）は破壊されてしまう。また、上述のように、コラーゲンとグリコサミノグリカンを水中で共存させることは不可能なため、細胞を入れることも不可能である。

20

## 【 0 0 0 6 】

また、特開平9 - 2 4 9 7 5 1 号公報には、コラーゲンとグリコサミノグリカンを多官能性架橋剤で架橋可能との内容が記載されているが、コラーゲンとグリコサミノグリカンは水溶液中では、コラーゲンのプラスチャージとグリコサミノグリカンのマイナスチャージによってポリイオンコンプレックス（不均一な沈殿）を形成するので現実的には不可能である。したがって、ポリイオンコンプレックスを形成しない架橋方法が求められている。

30

## 【 0 0 0 7 】

## 【 課 題 を 解 決 す る た め の 手 段 】

本発明は、関節軟骨の細胞外マトリックスの主成分であるポリカチオンとグリコサミノグリカンとの新規な架橋複合体の製造法を提供する。

## 【 0 0 0 8 】

すなわち、本発明は、グリコサミノグリカンとコラーゲンとの架橋複合体をポリエチレングリコールのカルボキシル末端に2個以上のスクシンイミジル基を有する多官能性架橋剤を用いて製造する方法において、リン酸緩衝液中に $1 \times 10^8$  cells/mL ~  $1 \times 10^4$  cells/mLの細胞濃度範囲で架橋前に細胞をあらかじめ混合しておき、pH 7.0 ~ 8.0、2.5 ~ 3.7、濃度0.1 ~ 0.2 MのNaClを含んだ該リン酸緩衝液中でグリコサミノグリカンとコラーゲンを混合し、架橋剤濃度0.3 ~ 3 mMで架橋することによって、生理的条件下でポリイオンコンプレックスを形成せず、均一な混合溶液中で架橋形成を行ない、生きた状態で細胞を内包する組織再生マトリックス用グリコサミノグリカン - コラーゲン複合体を合成することを特徴とするグリコサミノグリカン - コラーゲン複合体の製造法である。

40

## 【 0 0 0 9 】

また、本発明は、前記複合体は、含水率が90 ~ 99重量%のゲルであることを特徴とする上記の製造法である。

## 【 0 0 1 0 】

本発明の製造法によれば、生理的条件、すなわち、pH 7.0 - 8.0、2.5 ~ 3.7、

50

濃度 0.1 - 0.2 M の NaCl の条件下のリン酸緩衝液中で合成反応を行うことができるため、 $1 \times 10^8$  cells/mL ~  $1 \times 10^4$  cells/mL の細胞濃度範囲で細胞を架橋前にあらかじめ混合しておき、架橋反応を行うことが可能である。生理的 pH および塩濃度を含んだ溶液中で架橋反応することで細胞を生きた状態でゲル内に内包することが可能となる。必要に応じて生体中に含まれる他のイオン、例えば、カルシウムイオン、マグネシウムイオン、カリウムイオンを添加することも可能である。細胞を混合する際のコラーゲンあるいは GAG の濃度は、0.5 ~ 5 wt % が好ましい。

#### 【0011】

このことは、患部の形状（例えば、欠損した軟骨の形）をしたコラーゲンとグリコサミノグリカンと細胞との複合体からなる組織体（生体組織様構造を持った人工物）を作ることが可能であることを意味する。また、本発明の製造法で用いる架橋剤は、細胞毒性が低いため、得られた複合体は、注射器で生体内の骨、軟骨、髄核等に注入する細胞を生きた状態で内包する組織再生マトリックス用材料としても使用できる。

10

#### 【0012】

本発明の架橋複合体は、架橋密度の制御が容易であり、含水率：90 ~ 99 重量%であり、コラーゲンで分解し、軟骨、髄核、肝臓、血管の組織再生材料として優れた物性を有している。特に、グリコサミノグリカン/ポリカチオンが 50 / 50 ~ 1 / 99 重量比の時に軟骨に極めて類似した物性を示す。

#### 【0013】

##### 【発明の実施の形態】

本発明の合成法で使用する架橋剤の求電子性脱離基は、例えば、スクシンイミジル基、スルホスクシンイミジル基またはそれらの誘導体である。これらの架橋剤としては、ペンタエリトールをベースとした 4 官能性架橋剤、エチレングリコールベースの 2 官能性架橋剤、グリセリンベースの 3 官能性架橋剤、ヘキサグリセリンベースの 8 官能性架橋剤等が挙げられる。ポリエチレングリコールの分子量は、1000 以上のものが好ましいが、特に限定されない。

20

#### 【0014】

グリコサミノグリカン (GAG) (種類によらない) と複合するポリカチオンには、コラーゲン (数 10 種類のタイプによらない) およびその誘導体、コラーゲンの変性体であるゼラチン (分子量によらない)、ポリリジン (分子量によらない)、キトサン (脱アセチル化度、分子量によらない) 等アミノ基を有する高分子が含まれる。コラーゲンは、アテロ化したもの (コラーゲン末端のテロペプチド部分を除去したもの) を用いる方が望ましい。

30

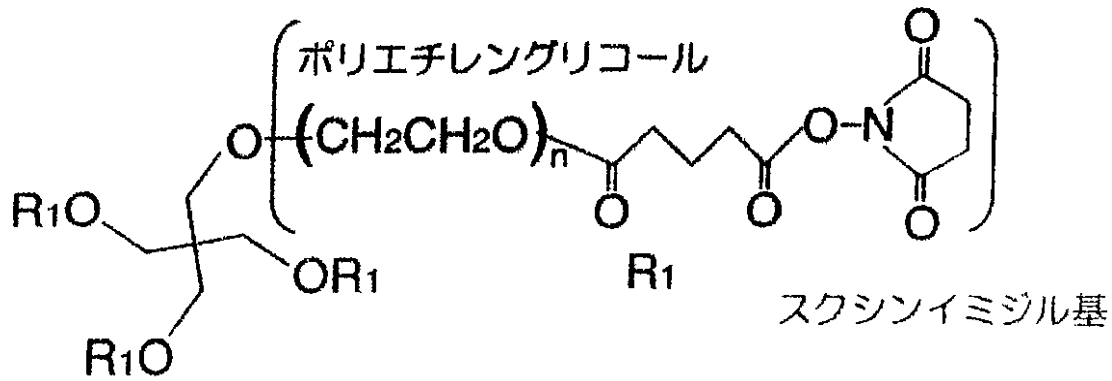
#### 【0015】

以下、下記の化学式で示されるポリエチレングリコールのカルボキシル末端にスクシンイミジル基を有する 4 官能性架橋剤 (Pentaerythritol polyethyleneglyco ether tetrasuccinimidyl glutarate) についてさらに詳しく説明する。スクシンイミジル基は、pH 7 以上においてエステルの加水分解が進行するため、生理的条件下で架橋反応を行うことができる。

#### 【0016】

##### 【化 1】

40



10

## 【0017】

ポリエチレングリコールのカルボキシル末端がスクシンイミジル化されたカルボキシル基は、pH7以上の雰囲気下においてスクシンイミジル基が脱離する。スクシンイミジル基が脱離したカルボキシル基は、コラーゲンあるいはGAGの水酸基あるいはアミノ基と反応し、コラーゲンおよびGAGの分子間、分子内の架橋を行いゲルを形成する。

## 【0018】

コラーゲンとGAGを含有するゲルの合成を行う場合、コラーゲンとGAGは、それぞれの水溶液を混合すると、ポリオンコンプレックス(PIC)を形成する。均一なコラーゲン-GAGを含有するゲルを合成するには、PICを形成しない条件下で架橋を行う必要がある。コラーゲンの良溶媒であるリン酸イオンを含む溶液でpH7.4の緩衝液を調製し、グリコサミノグリカンと混合すると、この条件ではコラーゲンとグリコサミノグリカンはポリオンコンプレックスを形成せず、均一な混合溶液が得られる。

20

## 【0019】

図1には、上記の架橋剤でII型コラーゲンを種々のpHで架橋した後の膨潤度(=(ゲル中の水の重量)/(ゲルの乾燥重量))を示す。なお、膨潤度=含水率/(100-含水率)で示される。架橋剤の濃度が増加すると膨潤度が小さくなっていくことから、架橋が進んでいることが分かる。しかしながら、架橋剤の添加量が3mM以上になるとコラーゲンの析出により不均一なゲルとなり好ましくない。よって、好ましい架橋剤濃度は0.3~3mMである。均一なゲルであれば膨潤度は特に限定されない。

30

## 【0020】

pHの影響は、架橋剤が低濃度(0.3mM)の際には認められるが、それ以外の条件では認められない。ゲル形成反応は、4では30分程度かかるのに対し、25、37では、5分以内に終了する。したがって、ゲル形成反応温度は25~37が好ましい。

## 【0021】

図2は、pH7.4のリン酸緩衝液中に種々の濃度の塩を添加し、コラーゲンとヒアルロン酸(Co1/HyA=1:1)およびコラーゲンとコンドロイチン硫酸(Co1/ChS=1:1)を架橋した場合の生成物の透過率を調べた結果を示している。pH7.4の条件では、どの塩濃度でもPIC形成は認められないことが分かった。すなわち、このことは、生理的条件下で反応を進めることが可能であること、つまり、細胞を架橋前にあらかじめ混合しておき、架橋反応を行うことが可能であることを意味する。

40

## 【0022】

なお、透過率測定は、分光光度計によって500nmの光の透過率を調べることで行った。透過率100%ということは、光が完全に透過することで、均一で透明な液体であることを示す。0%では光が全く透過しないということで、ポリオンコンプレックスのような沈殿が形成されていることを意味する。水中でコラーゲンとグリコサミノグリカンを混合するとポリオンコンプレックスが形成されて透過率が0%になるが、リン酸イオンを含んだ緩衝溶液中で混合すると混合溶液の透過率がほぼ100%であることから均一に混合していることが分かる。透過率のデータは、生理的pHに加え、生理的塩濃度でも均一

50

な混合溶液が得られることを示している。

【0023】

コラーゲン単独の場合と同様に、GAGを添加した系でも0.3～10mMの範囲でゲルが得られ(HyAは0.1～10mM)、添加する架橋剤の濃度の増加に伴い、膨潤度は減少する。しかしながら、コラーゲン単独の場合と同様、架橋剤の添加量が3mM以上になるとコラーゲンの析出により不均一なゲルとなり好ましくない。ゲル形成反応は、コラーゲン-GAGの場合も37℃では5分以内で終了する。

【0024】

【実施例】

参考例1

pH7.4の0.1Mリン酸緩衝液(4℃)に塩を添加し、生理的条件下(pH7.4、0.15M NaCl)とし、II型コラーゲン+10wt%ヒアルロン酸(HyA)を溶解し、その後、1.0mMの濃度の架橋剤を添加した。架橋剤として、ポリエチレングリコール(ユニット数n=56)のカルボキシル末端にスクシンイミジル基を持つペンタエリトールベースの4官能性ポリエチレングリコールを使用した。

10

【0025】

十分攪拌後、脱泡し、37℃の温水中で18時間かけて架橋反応を行ったところ、コラーゲンとヒアルロン酸を含有するゲルが合成された。得られたコラーゲン-グリコサミノグリカン複合マトリックスの膨潤度(=(ゲル中の水の重量)/(ゲルの乾燥重量))は108.8であった。PIC形成は認められなかった。

20

【0026】

参考例2

架橋剤の濃度を0.3mMとした以外は参考例1と同様に合成を行った。参考例1と同様のゲルが得られた。得られたコラーゲン-グリコサミノグリカン複合マトリックスの膨潤度は177.6であった。

【0027】

参考例3

架橋剤の濃度を3mMとした以外は参考例1と同様に合成を行った。参考例1と同様のゲルが得られた。得られたコラーゲン-グリコサミノグリカン複合マトリックスの膨潤度は83.8であった。

30

【0028】

参考例4

ヒアルロン酸の代わりにコンドロイチン硫酸(ChS)を用い、1.0mMの濃度の架橋剤を添加した以外は参考例1と同様に合成を行った。参考例1と同様のゲルが得られた。得られたコラーゲン-グリコサミノグリカン複合マトリックスの膨潤度は95.6であった。

【0029】

参考例5

架橋剤の濃度を0.3mMとした以外は参考例4と同様に合成を行った。参考例1と同様のゲルが得られた。得られたコラーゲン-グリコサミノグリカン複合マトリックスの膨潤度は110.7であった。

40

【0030】

比較例1

1mMの濃度の架橋剤を添加した以外は参考例4と同様に架橋反応を行った。架橋剤の濃度が低いためゲルが形成されなかった。

【0031】

比較例2

10mMの濃度の架橋剤を添加した以外は参考例1と同様に架橋反応を行った。得られたコラーゲン-グリコサミノグリカン複合マトリックスの膨潤度は22.1であった。各参考例と比較して架橋剤の濃度が高いため架橋剤中のポリエチレングリコール鎖の影響でコ

50

ラーゲンが析出・沈殿し、不均一なゲルになった。

【0032】

図3に、参考例1～5および比較例1、2により得られたコラーゲン-グリコサミノグリカン複合マトリックスの膨潤度を示すように、架橋剤濃度が高くなるにつれ膨潤度が小さくなること分かる。

【0033】

実施例1

参考例1と同様に、pH7.4の0.1Mリン酸緩衝液(4)に塩を添加し、生理的条件下とし、I型コラーゲン+10wt%ヒアルロン酸(HyA)を溶解し、軟骨細胞を架橋前にあらかじめ混合して、 $1 \times 10^6$  cells/mLの濃度になるように調整した軟骨細胞-コラーゲン-ヒアルロン酸の混合溶液(pH7.4, 0.15M NaCl)にペンタエリトリトールベースの4官能性架橋剤を入れ、37で10分間インキュベートした。その結果の写真を図4に示す。写真中の丸いものが全てゲル中に内包した軟骨細胞である。軟骨細胞は、コラーゲン-ヒアルロン酸ゲル中に均一に分散しており、軟骨細胞特有の丸い形態をしていることが明らかである。

10

【図面の簡単な説明】

【図1】図1は、ポリエチレングリコールのカルボキシル末端にスクシンイミジル基を有する四官能性架橋剤でI型コラーゲンを種々のpHで架橋した後の膨潤度を示すグラフである。

【図2】図2は、pH7.4のリン酸緩衝液中に種々の濃度の塩を添加した場合の透過率を示すグラフである。

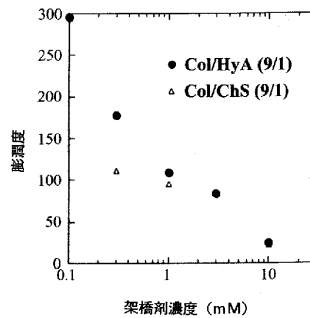
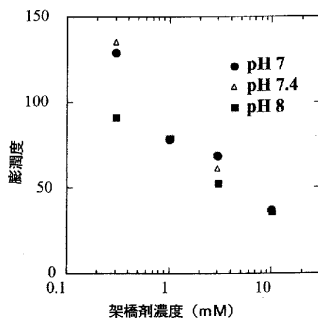
20

【図3】図3は、参考例1～5および比較例1、2により得られたコラーゲン-グリコサミノグリカン複合マトリックスの膨潤度を示すグラフである。

【図4】図4は、実施例1により得られたコラーゲン-グリコサミノグリカン複合マトリックスに内包された軟骨細胞を示す図面代用写真である。

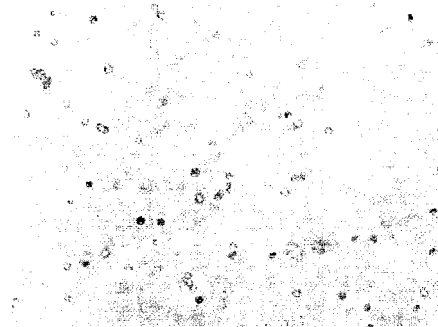
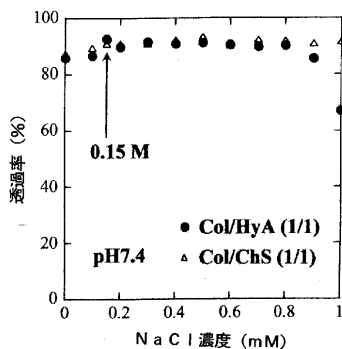
【図1】

【図3】



【図2】

【図4】



## フロントページの続き

- (72)発明者 田中 順三  
茨城県つくば市鹿島台3 - 6
- (72)発明者 田口 哲志  
茨城県つくば市稲荷前19 - 8 スプリーム成城B205
- (72)発明者 宮崎 匡輔  
東京都八王子市子安町3 - 33 - 3
- (72)発明者 佐倉 義幸  
神奈川県横浜市金沢区寺前1 - 18 - 15
- (72)発明者 大塚 龍郎  
兵庫県尼崎市七松町1 - 3 - 2 - 2404
- (72)発明者 萬代 佳宣  
大阪府八尾市南木ノ本2 - 77 - 14

審査官 福井 悟

- (56)参考文献 特開平07 - 278203 (JP, A)  
特開2004 - 107663 (JP, A)  
特表平10 - 501706 (JP, A)  
特表2000 - 502380 (JP, A)

## (58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

C08B 1/00-37/18

A61L 27/00-27/60

JSTPlus(JDreamII)

JMEDPlus(JDreamII)

JST7580(JDreamII)