

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第4663120号
(P4663120)

(45) 発行日 平成23年3月30日(2011.3.30)

(24) 登録日 平成23年1月14日(2011.1.14)

(51) Int. Cl.	F I	
A 6 1 L 27/00 (2006.01)	A 6 1 L 27/00	V
	A 6 1 L 27/00	E

請求項の数 23 (全 15 頁)

(21) 出願番号	特願2000-571962 (P2000-571962)	(73) 特許権者	591007804
(86) (22) 出願日	平成11年9月30日 (1999. 9. 30)		メドトロニック, インコーポレイテッド
(65) 公表番号	特表2003-525062 (P2003-525062A)		アメリカ合衆国 ミネソタ州 55432
(43) 公表日	平成15年8月26日 (2003. 8. 26)		, ミネアポリス, メドトロニック パーク
(86) 国際出願番号	PCT/US1999/022550		ウェイ 710
(87) 国際公開番号	W02000/018445		710Medtronic Parkway,
(87) 国際公開日	平成12年4月6日 (2000. 4. 6)		Minneapolis, Minnesota
審査請求日	平成18年9月29日 (2006. 9. 29)		sota 55432, U. S. A
(31) 優先権主張番号	60/102, 514	(73) 特許権者	303022581
(32) 優先日	平成10年9月30日 (1998. 9. 30)		トリアンニ, マーク・ダブリュー
(33) 優先権主張国	米国 (US)		アメリカ合衆国カリフォルニア州9267
(31) 優先権主張番号	60/103, 697		5, サン・ファン・キャピストラノ, ヴ
(32) 優先日	平成10年10月9日 (1998. 10. 9)		イア・デル・アモ 32882
(33) 優先権主張国	米国 (US)	(74) 代理人	100089705
			弁理士 社本 一夫

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 移植で使用される組織の無機質化を減少させる方法

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

組織由来移植用血管生体プロテーゼの製造方法であって：動物から組織を切除し、該切除した組織が、ブタの大動脈根組織、ウシの大動脈根組織、ブタの心膜、ウシの心膜、ウシの静脈、ブタの静脈、ウシの動脈及びブタの動脈からなる群から選択され；該切除した組織が有意に分解する前に、該組織を少なくとも1種の酸化剤を含んで成る組成物と接触させ、該酸化剤と接触させた組織を洗浄して酸化剤の少なくとも一部分を除去することを含んで成る方法により、該切除した組織から細胞破壊片を除去することを含んでなり、

該酸化剤が、次亜塩素酸ナトリウム、過蟻酸、過ヨウ素酸、過酢酸およびそれらの組み合わせの群から選択される、前記方法。

【請求項 2】

組織が哺乳類から得られている、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 3】

組織由来移植用血管生体プロテーゼが心臓弁から成る、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 4】

次亜塩素酸ナトリウムが約 2 ~ 約 20 mM の濃度にある、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 5】

酸化剤を含んで成る組成物が少なくとも1種のキレート化剤をさらに含んでいる、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 6】

10

20

キレート化剤をエチレンジアミン四酢酸、エチレンビス(オキシエチレンニトリロ)四酢酸(EGTA)、クエン酸、それらの塩およびそれらの組み合わせの群から選択する、請求項5に記載の方法。

【請求項7】

少なくとも1種の酸化剤を含んで成る組成物が少なくとも1種の緩衝剤をさらに含んでいる、請求項1に記載の方法。

【請求項8】

緩衝剤が約7.0～約7.5のpKaを有する、請求項7に記載の方法。

【請求項9】

緩衝剤が有機緩衝剤である、請求項7に記載の方法。

10

【請求項10】

緩衝剤をHEPES、TES、BES、MOPS、PIPES、MESおよびそれらの組み合わせの群から選択する、請求項9に記載の方法。

【請求項11】

組織を少なくとも1種の酸化剤を含んで成る組成物と接触させる工程を少なくとも約24時間行う、請求項1に記載の方法。

【請求項12】

組織を洗浄剤組成物と接触させる工程をさらに含んでいる、請求項1に記載の方法。

【請求項13】

洗浄剤組成物が少なくとも1種の還元剤を含んでいる、請求項12に記載の方法。

20

【請求項14】

洗浄剤組成物がイオン性洗浄剤または非イオン性洗浄剤を含んで成る、請求項12に記載の方法。

【請求項15】

組織を洗浄剤組成物と接触させる工程を少なくとも約30の温度で行う、請求項12に記載の方法。

【請求項16】

組織を洗浄剤組成物と接触させる工程が、該組織を該組織が該組成物中に浸漬されている間に超音波処理することを含んでいる、請求項12に記載の方法。

【請求項17】

30

組織を洗浄剤組成物と接触させる工程が、該組織を第一および第二洗浄剤組成物と接触させることから成る、請求項12に記載の方法。

【請求項18】

第一洗浄剤組成物がイオン性洗浄剤を含んで成り、そして第二洗浄剤組成物が非イオン性洗浄剤を含んで成る、請求項17に記載の方法。

【請求項19】

第一および/または第二洗浄剤組成物が少なくとも1種の還元剤を含んでいる、請求項18に記載の方法。

【請求項20】

組織を洗浄剤組成物と接触させる工程を、該組織を酸化剤を含んで成る組成物と接触させた後に行う、請求項17に記載の方法。

40

【請求項21】

組織を固定化用組成物で処理する工程をさらに含んでいる、請求項1に記載の方法。

【請求項22】

組織を固定化用組成物で処理する工程が、グルタルアルデヒドまたはカルボジイミドに基づく方法を使用することを含んでいる、請求項21に記載の方法。

【請求項23】

固定化用組成物が少なくとも1種の緩衝剤をさらに含んでいる、請求項22に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

50

【 0 0 0 1 】

関連出願との相互参照

本出願は、1998年9月30日出願の米国仮特許出願第60/102,514号、1998年10月9日出願の米国仮特許出願第60/103,697号および1998年10月28日出願の米国仮特許出願第60/105,949号に対する優先権を主張するものである（これら米国仮特許出願に言及することによってそれら全てが本明細書に組み入れられるものである）。

【 0 0 0 2 】

発明の背景

ヒトおよび他の哺乳類への人工器官（プロテーゼ）の外科的移植が次第に頻繁に行われるようになってきた。このようなプロテーゼに、実例として挙げると、心臓弁、人工血管、膀胱、心臓ブラダー、左心室補助装置等がある。これらのプロテーゼは、天然組織、無機材料、合成重合体またはそれらの組み合わせから造ることができる。実例として、機械的心臓弁プロテーゼは、典型的には、重合体、炭素系材料および金属のような硬質材料から構成される。他方、弁の生体プロテーゼ（bioprostheses）は、典型的には、ブタの大動脈弁かウシの心膜のいずれかから作られる。

10

【 0 0 0 3 】

天然組織に由来するプロテーゼは、ある種特定の臨床的利点の故に、機械的装置以上に好ましい。例えば、組織由来プロテーゼは、一般に、日常的な血液凝固防止措置を必要としない。さらに、組織由来プロテーゼが働かなくなったときでも、それらは緩徐な分解性を示し、それは通常数ヶ月の期間にわたって、或いは数年にもわたって継続し得る。他方、機械的装置は、一般的には、破局的破壊を受ける。

20

【 0 0 0 4 】

いかなる人工器官も、石灰化のような無機質化のために働かなくなる可能性があるけれども、プロテーゼ変性のこの原因は組織由来プロテーゼで特に重大である。児童では、実心臓生体プロテーゼ弁インプラントの移植4年以内の機能不全の50パーセントが石灰化によって占められると言われている。成人では、この現象は移植10年以内に約20パーセントの機能不全率で起こる。例えば、ショーエン（Schoen）等の J. Lab. Invest.、52、523-532（1985）を参照されたい。この問題の臨床的重要性にもかかわらず、石灰化の病因は完全には理解されていない。さらに、現時点で知られている効果的な治療法は明らかに存在しない。

30

【 0 0 0 5 】

無機質化、特に石灰化の発端は、例えば心膜および大動脈根（aortic root）の両者を起源とする生体プロテーゼ心臓弁の組織マトリックス中に存在する細胞破壊片から主として始まることが示された。生体プロテーゼ架橋組織の石灰化は、また、細胞破壊片、および血液からインプラント組織内への細胞破壊片の可能な蓄積に関連するアルカリ性ホスファターゼの存在と結びつけて考えられていた。さらに他の人は、無機質化はカルシウムを封鎖してアパタイト（リン酸カルシウム）の核形成部位を形成する細胞破壊片中のリン脂質の結果であると提案した。

【 0 0 0 6 】

生体プロテーゼ中での無機質化が起こる機構がどうあるかと、無機質化、特に石灰化は、ブタの大動脈弁またはウシの心膜から作られた生体プロテーゼ心臓弁の臨床的機能不全の最も頻度の高い原因である。ヒトの大動脈同種移植インプラントも、生体プロテーゼ心臓弁よりも遅い速度ではあるが、弁組織、さらにまたそれに隣接する大動脈壁の両者を巻き込んだ病的石灰化を受けることが観察された。狭窄および/または再生のような形で弁の機能不全を導く病的石灰化は、再移植を必要とする。従って、生体プロテーゼ心臓弁および同種移植片の使用は、そのような組織は石灰化を受けやすいので制限されていた。事実、小児患者では、石灰化速度が加速されることが見いだされており、そのためこのグループには生体プロテーゼ心臓弁の使用は禁忌である。

40

【 0 0 0 7 】

50

この問題が初めて確認されて以来、生体プロテアーゼ心臓弁の無機質化を減少させ、または予防する幾つかの可能な方法が文献に記載された。一般的に言えば、これらの方法は生体プロテアーゼ弁を移植前に色々な物質で処理することを含むものである。役に立つと報告された物質の中に、硫酸化脂肪族アルコール、ホスフェートエステル、アミノジホスフェート、カルボン酸の誘導体および各種界面活性剤がある。それにもかかわらず、これらの方法に後 - 移植無機質化問題の解決に完全に成功することが立証されたものは一つもない。

【 0 0 0 8 】

目下のところ、生体内で無機質化する可能性がない生体プロテアーゼ心臓弁は存在しない。生体プロテアーゼ心臓弁として使用されるブタ大動脈根組織の小葉における石灰化を予防する試剤としてアミノオレイン酸 (AOA) を使用する方法はあるが、AOAはそのような装置の大動脈壁の無機質化を予防するのに有効であることは示されなかった。その結果、そのような装置は取り出されなければならない可能性がある。

10

【 0 0 0 9 】

従って、生体プロテアーゼ心臓弁、および生体内病的石灰化を受けやすい他の組織由来移植用医療装置を長期石灰化抵抗性とする必要が存在する。

発明の概要

本発明は、組織由来移植用医療装置中における組織の無機質化レベルを低下させる方法を提供するものである。この方法は、好ましくは、生体プロテアーゼ弁の無機質化、特に生体プロテアーゼ弁の病的石灰化のレベルを低下させる。

【 0 0 1 0 】

本発明の一つの好ましい態様において、本発明の方法で処理された組織由来移植用医療装置は、改善された無機質化防止性、および/または生体内病的石灰化に対して、無機質化を減少または予防する他の方法で与えられるよりも長期の抵抗性を示す。理論で縛られることを望むものではないが、本発明の方法は、組織内に存在する酵素、その他の蛋白質 (例えば、カルシウム結合性蛋白質) がそれら固有の機能を果たすのを阻害することができる。これらの蛋白質は、主として、ホスフェートおよびカルシウムの代謝に関わり、無機質化組織の主要成分であるリン酸カルシウムの形成に重要であるだろう。本発明の方法による処理は、そのような蛋白質の活性を効果的に不活性化し、そして移植後の組織中におけるホスフェートおよび/またはカルシウムの蓄積を減少させ、かくして無機質化プロセスの開始を少なくすることができる。

20

30

【 0 0 1 1 】

もう一つの好ましい態様において、本発明の方法は組織由来移植用医療装置を製造する方法を通じて組織について行われる処理を提供する。これらの処理工程は、例えば動物から組織を切除して直ぐに、またはその組織を上記医療装置に組み込んだ後に実行することができる。一つの好ましい装置は生体プロテアーゼ心臓弁である。この方法は、その装置を患者に移植した後に、弁状小葉、および大動脈壁のような支持構造体上での無機質化を減少させる。弁状小葉および大動脈壁の両者の無機質化の減少は、その装置の改善された性能をインプラントの持続期間にわたって可能にする。

【 0 0 1 2 】

一つの態様において、本発明は組織由来移植用医療装置を製造する方法を提供する。この方法は、組織を、少なくとも1種の酸化剤を含んでいる組成物とその医療装置の移植前に接触させる工程を含んでいる。この方法は、組織を洗浄して酸化剤の少なくとも一部分、好ましくは実質的に全てを除去する工程をさらに含んでいることが好ましい。この組織由来移植用医療装置は心臓弁であるのが好ましく、その心臓弁はブタの大動脈根組織、ウシの大動脈根組織、ブタの心膜、ウシの心膜、ウシの静脈、ブタの静脈、ウシの動脈またはブタの動脈に由来することができる。

40

【 0 0 1 3 】

酸化剤は、次亜塩素酸ナトリウム、臭素酸ナトリウム、水酸化ナトリウム、ヨウ素酸ナトリウム、過ヨウ素酸ナトリウム、過蟻酸、過ヨウ素酸、重クロム酸カリウム、過マンガン酸カリウム、クロラミン T、過酢酸およびそれらの組み合わせの群から選ばれるのが好ま

50

しい。酸化剤は、次亜塩素酸ナトリウム、過蟻酸、過ヨウ素酸、過酢酸およびそれらの組み合わせの群から選ばれるのがさらに好ましい。

【0014】

酸化剤を含んでいる組成物は、少なくとも1種のキレート化剤をさらに含んでいるのが好ましい。適したキレート化剤の例として、エチレンジアミン四酢酸(EDTA)、エチレンビス(オキシエチレンニトリロ)四酢酸(EGTA)、クエン酸、それらの塩およびそれらの組み合わせが挙げられる。

【0015】

酸化剤を含んでいる組成物は、また、バッファー(buffer)(即ち、緩衝剤[buffering agent])をさらに含んでいるのが好ましい。バッファーは約7.0~約7.5のpKaを有するのが好ましい。バッファーはHEPES、TES、BES、MES、MOPSまたはPIPESのような有機バッファーであるのがさらに好ましい。このような組成物においては、酸化剤、緩衝剤およびキレート化剤の多様な組み合わせを用いることができる。

10

【0016】

特に好ましい一つの態様においては、ブタの大動脈根組織のような組織が動物の心臓から解剖で取り出され、次いで、その組織に対する自己消化性損傷を低下させ、かつ輸送中の細菌増殖を最小限に抑えるために、氷を使用して運ばれる。好ましくは、屠殺現場か、その直ぐ後の場所のいずれかにおいて、組織が有意の損傷および/または分解を受ける前に、その組織を本発明の方法に従って処理することができる。例えば、約20~30ミリモル(mM)のEDTAまたはEGTA、約10~約30mMのHEPES、および約1:400希釈度以上の濃度の次亜塩素酸ナトリウム(5%ストック漂白剤溶液)または約1:50以下のストック漂白剤(これは、一般に、約2~約20mMに相当する)を含有している食塩溶液(好ましくは、濃度約0.8~約1.0重量%の生理食塩溶液)中に組織を浸漬することができる。この組織は、上記漂白剤溶液中に、室温で、好ましくは約24時間以上、さらに好ましくは約36時間以下浸漬したままにして置かれる。

20

【0017】

組織と酸化剤を含んでいる組成物との接触前またはその接触に続いて、その組織を洗浄剤組成物と接触させるのが好ましい。これは組織を第一洗浄剤組成物と、次いで第二洗浄剤組成物と接触させる工程を含んでいるのがさらに好ましい。第一洗浄剤組成物がイオン性洗浄剤を含み、そして第二洗浄剤組成物が非イオン性洗浄剤を含んでいるのが好ましい。これらの工程は少なくとも約30の温度で行われるのが好ましい。ある特定の態様では、これらの工程は、組織を、それが洗浄剤組成物中にある間に、約30~約45の温度において超音波処理することを含む。

30

【0018】

石灰化の初期事象に関わると推測される蛋白質は、基を隠すことができるそれら蛋白質の三次構造のために、必ずしも接近することができない。従って、還元剤の使用を、還元剤は生物活性を持つ蛋白質を不活性化する際に有効である可能性があるので、採用することができる。かくして、ある特定の好ましい態様については、洗浄剤組成物はDTT、およびジスルフィド結合を還元する能力がある他の還元剤のような還元剤を含んでいることができる。

40

【0019】

もう一つの好ましい態様は、組織由来移植用医療装置の無機質化を減少させる方法に関する。この方法は次の：組織を少なくとも1種の酸化剤を含んでいる組成物と接触させ；その組織を洗浄して酸化剤の少なくとも一部分を除去し；そしてその組織を、上記医療装置の移植に先立って、少なくとも1種の還元剤を含んでいる洗浄剤組成物と接触させる工程を含んでいる。

【0020】

さらにもう一つの好ましい態様は、組織由来移植用医療装置の無機質化を減少させる方法に関する。この方法は次の：組織を非ホスフェート緩衝有機食塩溶液と接触させ；その組織を少なくとも1種の酸化剤を含んでいる組成物と接触させ；その組織を洗浄して酸化剤

50

の少なくとも一部分を除去し；その組織を、少なくとも1種のイオン性洗浄剤および少なくとも1種の還元剤を含んでいる第一洗浄剤組成物と接触させ；その組織を洗浄して第一洗浄剤組成物の少なくとも一部分を除去し；そしてその組織を、上記医療装置の移植に先立って、少なくとも1種の非イオン性洗浄剤および少なくとも1種の還元剤を含んでいる第二洗浄剤組成物と接触させる工程を含んでいる。

【0021】

本発明で使用される組成物は、全て、一般的には、水性系である。さらに、本発明の処理工程は所望とされる任意の順序で行うことができる。例えば、組織を酸化剤を含んでいる組成物で処理し、続いて還元剤を含みまたは含まない一つまたは二つ以上の洗浄剤組成物で処理し、次いでその組成物を固定化することができる。或いはまた、組織を還元剤を含みまたは含まない洗浄剤組成物で処理し、続いて酸化剤で処理し、次いで還元剤を含みまたは含まない第二洗浄剤組成物で処理し、続いて固定化処理することができる。或いは、例えば組織を酸化剤または洗浄剤組成物と接触させる前に、（例えば、グルタルアルデヒドまたはカルボジイミドに基づく方法を使用する）固定化プロセスをまず実施することができる。

10

【0022】

本明細書で使用される「組織由来移植用医療装置」とは、全体または一部が動物、典型的には哺乳類に由来するか、または他の有機組織から作られて、単独でまたは生体プロテアーゼの一部として移植されることになる器官または組織を含むことを意味する。かくして、この用語は、一般に心臓、心臓弁、大静脈根組織と他の心臓構成要素、心膜、血管代替物、例えば静脈および/または動脈、または移植体、心臓代替物、尿管と膀胱代替物、腸管並びに組織切除物等のような生体プロテアーゼ組織を包含する。

20

【0023】

本明細書で使用される用語「病的石灰化」は、リン酸カルシウム無機塩の望ましくない沈着のことを言う。いかなる理論または機構によっても縛られるものではないが、石灰化は宿主因子、インプラント因子、および他の患者関連外来因子に起因するだろう。カルシウムの沈着物は、失活細胞、特に最早機能していないか、または機能不全になっているカルシウムチャンネルを有する細胞膜に関係付けられることを示唆している証拠がある。石灰化は、組織由来移植用装置中で、結局は、弁の機能不全に導き得る結節に発達するヒドロキシアパタイトを形成させるのに適切な濃度および分子整列の条件下で存在するカルシウムおよびリンの蓄積から始まることが観察された。

30

【0024】

本明細書で使用される用語「減少した無機質化」は、本発明の組織由来移植用医療装置に対する、リン酸カルシウム無機塩のような無機質の観察された蓄積の量的減少のことを言い、そして好ましくはそのような装置の大動脈壁または小葉に対する上記の量的減少のことを言う。

【0025】

好ましい態様の詳しい説明

1. 組織の調達と初期処理

本発明の方法で用いられる組織由来移植用医療装置は、哺乳動物の種から得ることができる。本発明においては、組織由来移植用医療装置用組織を提供するのに適した哺乳動物の種として、例えば豚、雌牛、羊等々が挙げられる。哺乳動物の種は豚または雌牛であるのが好ましい。本発明の方法における使用に好ましい組織としては、例えばブタの大動脈根組織、ウシの大動脈根組織、ブタおよび/またはウシの心膜または静脈および動脈が挙げられる。組織由来移植用医療装置は心臓弁を含んでいるのが好ましい。

40

【0026】

一般的には、組織由来移植用医療装置用の組織は屠殺場から直接得られ、その屠殺場で解剖され、そして望まれない周囲の組織が取り除かれる。組織は、屠殺現場か、その直ぐ後の場所のいずれかにおいて、組織が有意の損傷および/または分解を受ける前に、本発明に従って処理される。それは、本発明の色々な工程で、広範囲の順序のいずれででも処理

50

することができる。

【0027】

典型的な状況では、組織が一旦得られたら、その組織に対する自己消化性損傷を低下させ、そして輸送中の細菌増殖を最小限に抑えるために、その組織は氷を使用して運ばれる。組織は、本明細書に記載される組織の処理を行い得る場所まで約24時間以内に運ばれ、受け取られるのが好ましい。

【0028】

一つの方法において、組織は非ホスフェート緩衝有機食塩溶液で完全に洗浄される。非ホスフェート緩衝有機食塩溶液は、組織と接触する可能性がある過剰の血液および体液の除去を助けつつ、その組織のマトリックスを安定化する。本発明の方法では、非ホスフェート緩衝有機食塩溶液は組織由来移植用医療装置中のホスフェート含有物質を除去する役を果たすので、そのような有機食塩溶液が好ましい。

【0029】

本発明の実施において使用される非ホスフェート緩衝有機食塩溶液に適した緩衝剤は、生理的に許容できるpHを保つのに足る緩衝能を有し、そして組織由来移植用医療装置に対して有害な影響を引き起こさないそのような緩衝剤である。非ホスフェート緩衝有機食塩溶液は、緩衝剤を約10～約30mMの濃度で含んでいるのが好ましい。緩衝剤としては、例えば酢酸塩、硼酸塩、クエン酸塩、HEPES(N-2-ヒドロキシエチルピペラジン-N'-2-エタンスルホン酸)、BES(N,N-ビス[2-ヒドロキシエチル]-2-アミノ-エタンスルホン酸)、TES(N-トリス[ヒドロキシメチル]メチル-2-アミノエタンスルホン酸)、MOPS(モルホリンプロパンスルホン酸)、PIPES(ピペラジン-N,N'-ビス[2-エタンスルホン酸]またはMES(2-モルホリノエタンスルホン酸)が挙げられ、そしてこの緩衝剤は、典型的には、約6.5～約8.5のpH範囲で緩衝作用を与える。有機バッファーは、一般的には、組織マトリックスに、リン酸ナトリウムのようなこの技術分野で知られている他の生理的バッファーがそうであるように、ヒドロキシアパタイトの形成に関与し得る追加のホスフェートを加えないので、有機バッファーが好ましい。有機バッファーは、また、引き続き架橋化学作用を妨害することなく、溶液を緩衝する手段を提供する。緩衝剤は、HEPES、TES、BES、MOPS、PIPESまたはMESであるのが好ましい。本発明の食塩溶液で用いられる緩衝剤はHEPESであるのがさらに好ましい。HEPESは、組織の加工処理に非常に適している約7.4のpKaを与えるからである。

【0030】

非ホスフェート緩衝有機食塩溶液を使用することは、典型的には、核形成事象の可能性を低下させる。溶液を緩衝するのにホスフェート塩を使用することは、ホスフェート・ PO_4^{3-} のレベルを、そのホスフェート塩がカルシウムのような有効二価カチオンを結合し、かくしてリン酸カルシウム塩を沈殿させ易い環境を作り出す点まで高める。試験管内石灰化モデルでは、過度に高いホスフェートおよびカルシウムのレベルが使用された。これら元素のそのようなマトリックスを奪うことは、核形成は、組織が移植に先立って固定および貯蔵された後も、長期効果を有していることができるので、初期の核形成事象が組織の加工処理を進めている最中に起こるのを前もって妨げることになる。従って、第一処理工程では、解剖組織をできるだけ速やかに、典型的には24時間以内に本発明の非ホスフェート緩衝有機食塩溶液で処理するのが好ましい。組織の初期処理は、この処理で、一般に、カルシウム、ホスフェート、マグネシウム、二価カチオンおよび非イオン性化合物のような可溶性イオンの、組織からのより良好な拡散が可能になるので好ましい。これらの元素は、一般に、異栄養性無機質化、具体的には同石灰化の一次成分である。

【0031】

本発明での使用に適した非ホスフェート緩衝有機食塩溶液は、典型的には、追加の成分を含み、そしてこの成分としては、例えば、好ましくは約0.8～約1.0重量%の食塩溶液が挙げられる。さらに、非ホスフェート緩衝有機食塩溶液はキレート化剤を含んでいるのが好ましい。キレート化剤はその食塩溶液中に約20～約30mMの濃度で存在するのが好ましい。適したキレート化剤として、例えばEDTA(エチレンジアミン四酢酸)、EGTA

10

20

30

40

50

(エチレンビス(オキシエチレンニトリロ)四酢酸)、クエン酸またはそれらの塩、およびクエン酸ナトリウムが挙げられる。本発明の方法で用いられるキレート化剤は、好ましくはカルシウム、マグネシウム、亜鉛およびマンガンのような二価のカチオンを結合する。初期加工処理中に組織由来移植用医療装置からのそのようなイオンの除去は、組織を、組織中に存在することがあるホスフェートイオンと一緒に、これら二価イオンの自然沈殿に対する感受性をより小さくする。かくして、これら二価カチオンを取り去ることがアパタイトの形成を妨げることになる。

【0032】

一つの好ましい態様において、本発明の非ホスフェート緩衝有機食塩溶液は食塩が約0.9重量%であり、約10mM(ミリモル)~約30mMのHEPESバッファの緩衝作用により約7.4のpHとされ、そして約20~約30mMのEDTAを含んでいる。前記の非ホスフェート緩衝有機食塩溶液中での洗浄に続いて、組織由来医療装置は、さらに加工処理されるまで、約4時間において約4~約16時間保持して置くことができる。

10

【0033】

2. 組織の後続処理、輸送および貯蔵

組織由来移植用医療装置を洗浄し、そして輸送に先立って貯蔵した後、その調達された組織を酸化剤含有組成物に移し、その中に浸漬するのが好ましい。或いはまた、その組織を直ちに洗浄し、そして酸化剤を含んでいる組成物中に貯蔵することもできる。この組成物は組織を屠殺場から製造施設まで輸送するために用いることができる。

【0034】

この組成物は1種または2種以上の酸化剤を含む。一般的には、酸化剤は電子を受容する能力を有するが、但しこの特定の系ではそれらはその能力では機能しないこともある。酸化剤は次亜塩素酸ナトリウム、臭素酸ナトリウム、水酸化ナトリウム、ヨウ素酸ナトリウム、過ヨウ素酸ナトリウム、過蟻酸、過ヨウ素酸、重クロム酸カリウム、過マンガン酸カリウム、クロラミンT、過酢酸およびそれらの組み合わせの群から選ばれるのが好ましい。酸化剤は次亜塩素酸ナトリウム、過蟻酸、過ヨウ素酸、過酢酸およびそれらの組み合わせの群から選ばれるのがさらに好ましい。酸化剤はその組成物中に好ましくは約2~約20mM、さらに好ましくは約5~約10mMの量で存在する。

20

【0035】

この組成物は、また、前記のとおり、キレート化剤を含んでいるのが好ましく、また緩衝剤および食塩溶液を前記の濃度で含んでいるのも好ましい。緩衝剤は、約6.5~約7.5のpKaを有しているのが好ましい。緩衝剤は、HEPES、TES、BESまたは前記の他のもののような有機バッファであるのがさらに好ましい。組織は、約20~約30ミリモル(mM)のEDTA、約10~約30mMのHEPES、および約1:400希釈度以上の濃度の次亜塩素酸ナトリウム(5%ストック漂白剤溶液)または約1:50以下のストック漂白剤(これは、一般に、約2~約20mMに相当する)を含有している0.9%食塩溶液(生理食塩溶液)中に浸漬されるのが好ましい。組織は、上記漂白剤溶液中に、室温で、好ましくは約24時間以上、さらに好ましくは約36時間以下浸漬したままにして置かれる。

30

【0036】

次亜塩素酸ナトリウムのような酸化剤を含んでいる組成物は、キナーゼ、ホスファターゼ、および石灰化プロセスの開始に不可欠であろう組織マトリックス内の他の蛋白質のような特定の蛋白質の活性を「不活性化する」ように作用することができる。この組成物中で酸化剤を使用することによって蛋白質構造の生物学的機能を阻害することができると考えられる。例えば、アミノ酸側鎖の特定-R基の酸化は特定の蛋白質の折り畳みを阻止することができ、かくしてこの酵素の固有のコンフォメーションを乱して、その酵素をして基質を加工することができないようにする。

40

【0037】

理論で縛られることは望まないけれども、酸化剤は細胞外マトリックス(ECM: extra-cellular matrix)中に存する細胞内において起こる酵素反応を切り離すと考えられる。これらの酵素は、カルシウムとホスフェートを、色々なエネルギー利用と細胞信号発信機構で

50

利用する。組織の加工処理中に存在し得る適正な条件下では、これらの酵素はECM中でアパタイト（即ち、ヒドロキシアパタイト）を形成するのに必要なイオンを封鎖する原因であろう。蛋白質の活性部位の変性以外に、他の反応も起こり得る。特定の蛋白質中に存在し得るジスルフィド結合が破壊されて、その三次構造の一部を変えることによって蛋白質の機能異常をもたらす。

【0038】

1種または2種以上の酸化剤を含んでいる組成物は、ヘパリン、コンドロイチン硫酸、デルマチン硫酸のようなグリコサミノグリカン中に存在する糖の還元作用に作用することができる。その酸化過程は、架橋に敏感なこれらの化合物を生成させることができると思われる。この溶液は殺菌性溶液であると考えことができ、輸送中のその溶液中における細菌の増殖を阻害するだろう。酸化剤を含んでいる上記組成物中に入れられた組織由来移植用医療装置は、所望どおりに貯蔵および/または輸送することができる。

10

【0039】

3. 組織の追加の加工処理

上記の酸化剤を含んでいる組成物による処理に続いて、その組織由来移植用医療装置は、その酸化剤を完全に除去するために、前記の非ホスフェート緩衝有機食塩溶液で徹底的に洗浄されるのが好ましい。組織由来移植用医療装置は室温で約8～約18時間洗浄されるのが好ましい。非ホスフェート緩衝有機食塩溶液は、頻繁に、例えば約20～約30分毎に替えられるのが好ましい。この頻繁な液替え（solution change）は、洗浄処理中に、ほぼ32-容積変化（volume change）、即ち1容積変化当たり約250 mLに等しくなるようにすることができる。

20

【0040】

使用される特定の洗浄処理の実験計画がどうであろうと、組織-対-非ホスフェート緩衝有機食塩溶液比、即ち組織-対-容積比はかなり大きいのがよい。この方法で用いられる大きな組織-対-容積比は、組織のECMから外への溶質の最大可能拡散（即ち、除去）勾配を作り出し、そして物質をその周りの非ホスフェート緩衝有機食塩溶液への運動を促進するように設計される。上記の頻繁な容積変化は、拡散勾配を、酸化剤をECMから除去するのを助けるように維持するのに有効である。本明細書中で説明される洗浄処理中に、組織は、所望によって、超音波処理器を用いて超音波処理に付すことができる。超音波処理器を使用することは、それが組織からの物質の拡散をさらに助けると言う点で有利であるだろう。

30

【0041】

さらに、上記洗浄処理中の温度は約45℃以下に保たれるのが好ましい。洗浄処理温度の維持は、熱交換システムを超音波処理と併用することによって成し遂げることができる。熱交換システムは、洗浄剤組成物を（組織を含んでいる）反応容器から水浴中に浸漬されているステンレス鋼製コイル（熱交換器）へと、好ましくは約35～約45℃の温度においてポンプ輸送し、そして反応容器に戻すことを含む。

【0042】

4. 組織の洗浄剤による処理

組織を完全に洗浄し、かくして酸化剤の除去を確実にした後、その組織を少なくとも1種の洗浄剤を含んでいる第一組成物中に浸漬するのが好ましい。洗浄剤はドデシル硫酸ナトリウム（SDS）のようなイオン性洗浄剤であるのが好ましいが、但し非常に多くの他のイオン性洗浄剤も使用することができる。例を挙げると、カプリル酸ナトリウム、デオキシコール酸ナトリウムおよび1-デカンスルホン酸ナトリウムがある。イオン性洗浄剤の濃度は約0.5～約2.5%（固体については重量/容量、または液体については容量/容量）の範囲内にあるのが好ましく、約0.5～約1.5%（固体については重量/容量、または液体については容量/容量）の範囲がさらに好ましい。洗浄剤組成物は、また、約10～約30 mMのHEPES（または前記の他のバッファー）、約20～約30 mMのEDTA（または前記の他のキレート化剤）、および（重量で）約0.8～約1.0%の量での食塩を含んでいるのが好ましい。

40

50

【 0 0 4 3 】

この溶液は、また、場合によって、DTT（ジチオトレイトール）（または同様のそのような試剤）のような還元剤を10～約200mMの範囲で含んでいることができる。他の適した還元剤の例として、例えば2-メルカプトエチルアミンおよびDTE（ジチオエリトリトール）が挙げられる。還元剤も蛋白質を不活性化する可能性を有し、そしてそのような処理は生物活性化合物の三次構造を一部変えてそれらを不活性にする。或いはまた、組織は上記還元剤、および場合によって使用される他の成分を含み、洗浄剤を含んでいない水溶液で処理することもできる。

【 0 0 4 4 】

組織は、続いて、第一洗浄剤含有組成物中に少なくとも約30の温度で少なくとも約24時間入れて置かれる。このプロセスが行われる温度は、除去または変性されるべき細胞膜および関連蛋白質のリン脂質に接近する洗浄剤の能力に有意の影響を及ぼし得る。リン脂質の二重層が加熱されると、それら二重層は特定の温度範囲にわたって物理的性質に変化を受けることが知られている。この「相転移」は脂肪アシル鎖の炭素-炭素結合の周りの増加した運動に起因するものである。このアシル鎖は、より低い温度（即ち、室温）における高配向ゲル様状態からより高温でのより移動性の高い流動状態へと推移する。ゲル-流体転移中に熱エネルギーが吸収され、リン脂質二重層はその「溶融温度」を通り過ぎる。このプロセスで用いられる温度における細胞膜の二重層の流動度は、その細胞膜の溶解容易性をより大きくするのを可能にする。

【 0 0 4 5 】

組織の洗浄剤による処理中に、その組織を前記の超音波処理に付すことができる。この処理中の温度は、例えば、熱交換システムを超音波処理システムと併用して、典型的には約50以下、好ましくは約45以下に保たれる。

【 0 0 4 6 】

洗浄剤は、ECMからの細胞、細胞破壊片および細胞器官の除去を促進するために使用される。細胞膜および細胞器官の膜は、無機質化プロセス中のアパタイト形成の核化に関する酵素および蛋白質の大部分を収容していることが知られている。これら膜の可溶化も、抽出プロセス中にそれら蛋白質を変質させることによって石灰化の抑制を助けることができる。細胞膜の最も大きな部分を構成しているリン脂質が石灰化の開始に関係するということも提案された。洗浄剤処理は蛋白質を抽出するプロセスで細胞膜のリン脂質二重層を解体する。

【 0 0 4 7 】

洗浄剤組成物による処理後に、組織由来移植用医療装置は、典型的には、前記の非ホスフェート緩衝有機食塩溶液を利用するもう一つの徹底的な洗浄プロセスに通される。洗浄後に、その組織由来移植用医療装置を第二洗浄剤組成物に入れる。この第二洗浄剤組成物は上記の第一洗浄剤組成物よりも大きなリン脂質親和性を有する。第二洗浄剤組成物は洗浄剤MP-40を含んでいるのが好ましいが、但しトリトン（Triton）X-100、ツイーン（Tween）シリーズおよびオクチルグルコシドのような他の非イオン性洗浄剤も使用することができる。この洗浄剤の使用は、細胞物質および同破壊片の除去をさらに助けるように設計される。

【 0 0 4 8 】

この第二洗浄剤組成物は、また、約10～約30mMのHEPES（または前記の他のバッファー）、約20～約30mMのEDTA（または前記の他のキレート化剤）、および（重量で）約0.8～約1.0%の量での食塩を含んでいるのが好ましい。この洗浄剤も前記で第一洗浄剤組成物において説明された還元剤を含んでいることができる。第二洗浄剤含有組成物中で用いられる洗浄剤濃度は、第一洗浄剤含有組成物中で用いられる洗浄剤濃度と同様であるが、この場合使用される標準濃度は約0.5～約2.5%（液体について容量/容量）であるのが好ましく、約0.5～約1.5%（液体について容量/容量）であるのがさらに好ましい。本明細書に記載される非イオン性洗浄剤は、色々な濃度において異なる仕方で作用するだろう。例えば、（臨界ミセル濃度よりも高い）高濃度では、非イオン

10

20

30

40

50

性洗淨剤は、洗淨剤とリン脂質と内在膜蛋白質との混合ミセルを形成することによって生体膜を可溶化する。低濃度では、非イオン性洗淨剤はほとんどの膜蛋白質の疎水性領域に結合し、それら蛋白質を水溶液中に溶けるようにする。

【0049】

組織由来移植用医療装置は、典型的には、第二洗淨剤含有組成物中に少なくとも約30の温度で少なくとも約24時間入れて置かれる。このプロセスのこの段階中に、組織由来移植用医療装置を、前記のように、超音波処理に付すことができる。前記でさらに説明されたように、温度は、熱交換システムと超音波処理システムとを併用して、典型的には約50以下、好ましくは約45以下に保たれる。

【0050】

第二洗淨剤含有組成物による処理後に、組織由来移植用医療装置は、前記の非ホスフェート緩衝有機食塩溶液中で、室温（例えば、約25～約30）において約24時間徹底的に洗淨される。この洗淨処理の完了時に、組織由来移植用医療装置は非ホスフェート緩衝有機食塩溶液に入れて置かれ、そして固定化プロセスまで4において貯蔵される。

【0051】

洗淨剤含有組成物の使用順序が変更可能であることは、当業者であれば理解されるであろう。即ち、組織由来移植用医療装置の非イオン性洗淨剤含有組成物による処理は、組織由来移植用医療装置のイオン性洗淨剤含有組成物による処理の前に用いることができる。さらに、本明細書に記載される方法は、具体的には、個々の処理工程を組織由来移植用医療装置の加工処理手順内のどこにでも置くことができるという点で、モジュール式となすように設計される。例えば、洗淨剤を酸化剤の曝露に先だって輸送溶液中で使用し、続いてもう一つの洗淨剤処理を行うことができる。

【0052】

5. 組織の固定化

上記の洗淨剤処理および洗淨処理の後に、組織の固定化を行うのが好ましいが、但し固定化は本明細書に記載されるいかなる処理工程の前でも行うことができるだろう。典型的には、固定化に先立って、組織由来移植用医療装置は、前記の非ホスフェート緩衝有機食塩溶液と同様の非ホスフェート緩衝有機食塩溶液で洗淨されるが、しかしHEPESのような緩衝剤は約10～約20mMの濃度で用いられる。本発明の方法では、組織由来移植用医療装置を保存する二つの択一的固定化処理法を用いることができる。第一の固定化処理は、組織由来移植用医療装置を、上記の調製された非ホスフェート緩衝有機食塩溶液中の約0.2%グルタルアルデヒド溶液に案内する架橋法を用いるものである。この固定化法は完結させるのにほぼ7日かかるが、この方法は当業者に周知である。

【0053】

第二の固定化処理は、米国特許第5,447,536号（ギアルドット [Giardot] 等）および同第5,733,339号明細書（ギアルドット等）、並びに欧州特許第897942A明細書（カハラン [Cahalan] 等）に開示される、組織由来移植用医療装置をほぼ水溶性のカルボジイミドに案内する架橋法を用いるものである。この固定化法は、コラーゲン分子のアミノ酸骨格上の有効側鎖のより多くを利用する二段階法である。

【0054】

次の実施例で本発明をさらに十分に説明する。記載される個々の試薬、装置および手順は単に説明のためのものであって、本発明をいかなる意味でも限定しようとするものではない。

【0055】

実施例

各種の択一的組織加工処理に関する酵素活性

I. 背景

石灰化を抑制する現在の処理法は、小葉および壁の両者の保護を完全には与えない。文献で公にされている報告によると、石灰化の開始事象はそのほとんどが細胞に基づくことは確かである。この核化の正確な機構は未知であるが、細胞内の蛋白質またはイオンバラン

10

20

30

40

50

スの信号変換、エネルギー利用、後トランスナショナル変性 (post transnational modifications) におけるカルシウムおよび/またはホスフェートの使用に関する蛋白質が与っている可能性がある。

【 0 0 5 6 】

これらの第一の工程が核化の事象に関する可能性があるかどうかを理解する試みにおいて、それら機能を変質により不活性化する理論を吟味するために蛋白質が用いられた。このモデル系では、処理後の蛋白質の機能を試験するために、プロテアーゼが用いられる。これらの蛋白質では、異なる結合機構によってそれらの三次構造を、水素結合によってトリプシンを、そしてジスルフィド結合と水素結合との組み合わせによってキモトリプシンを保持するのが促進される。

10

【 0 0 5 7 】

これらの実験において、トリプシンおよびキモトリプシンは、酵素の攻撃後に着色した副生成物を遊離するコラーゲン系基質 (アゾコール [AZOCOLL]、シグマ・ケミカル社 [Sigma Chemical]) を消化するそれらの能力に基づいて選択された。

【 0 0 5 8 】

I I . 概要

トリプシンおよびキモトリプシンを、酸化剤、還元剤または洗浄剤 (1種または複数種) のいずれかに対する曝露による幾つかの変質/不活性化法に付した。予備的データは、変質はこれら蛋白質の三次構造を変えることによってそれら蛋白質を不活性化し得ることを示している。

20

【 0 0 5 9 】

I I I . 材料

ホスフェート緩衝食塩溶液 (PBS)、シグマ製品 No. 1000-3、シグマ・ケミカル社、セントルイス (St. Louis)、MO ;
生理食塩 (NS)、シグマ 430AG-4、シグマ社 (Sigma) ;
アゾコール (アゾ染料含浸コラーゲン、製品 No. 194933)、カルバイオケム社 (Calbiochem)、サンディエゴ (San Diego)、CA ;
次亜塩素酸ナトリウム (漂白剤) ;
過酢酸、アルドリッチ・ケミカル社 (Aldrich Chemical Co.)、ミルウォーキー (Milwaukee)、WI ;
SDS、シグマ製品 No. L4509、シグマ・ケミカル社 ;
トリプシン (タイプ I、ウシの膵臓、製品 No. T4665)、シグマ社 ;
キモトリプシン (ウシの膵臓、製品 No. C4129)、シグマ社 ;
DTT (ジチオトレイトール、製品 No. D0632)、シグマ社 ;

30

水浴

分光光度計 (ベックマンモデル [Beckman Model])

V I . 方法

蛋白質の調製

これら酵素の自己消化に対する感受性の故に、蛋白質溶液は全て実験当日に新しく調製し、そして使用するまで氷を使用して貯蔵した。

40

【 0 0 6 0 】

トリプシンおよびキモトリプシンのストック溶液を、そのメーカーが供給する乾燥粉末から pH 7.4 の PBS 中で室温において可溶化した。蛋白質の濃度は 1 mg / mL に設定した。蛋白質の各溶液を 0.45 μm のシリンジフィルターを通して滅菌濾過して可能性のある細菌汚染を排除した。

【 0 0 6 1 】

蛋白質の希釈標準溶液を、濃縮ストックから 100 μg / mL の最終濃度に希釈することによって調製した。

蛋白質の処理

蛋白質を各々次の条件下で各種試剤に曝露した。

50

【 0 0 6 2 】

酸化剤：蛋白質を過酢酸が漂白剤のどちらかに室温で2時間曝露した。処理後に、それら蛋白質を脱塩カラム（セファデックス [Sephadex] G - 2 5）を通過させて酸化剤を蛋白質から分離した。そのカラムからPBSを用いて蛋白質を溶離させた。蛋白質の溶離を、UV吸光度を280nmにおいてモニターすることによって追跡した。溶離蛋白質を0.5mLの一定量ずつに分けて採取した。最大UV吸光度を有するそれら部分標本を分析に使用した。

【 0 0 6 3 】

還元剤：キモトリプシンをDTT（最終濃度10mMのPBS、pH7.4）にSDS（1%重量：容量）の存在下で曝露した。この蛋白質を還元剤と共に2時間インキュベートした。全てのジスルフィド結合に作用し、そしてそれら結合が完全に還元されるのを確実にするために、反応を昇温下（37~40）で行った。その蛋白質を、その検定の準備のために、上記のように、セファデックスG - 2 5カラムを通過させた。その蛋白質をカラムから溶離させた後、それを直ちに検定で使用した。

10

【 0 0 6 4 】

変質：トリプシンをSDS（pH7.4のPBS中最終濃度1%重量：容量）に曝露した。その蛋白質をPBSに対して透析して過剰のSDSを除去することによって検定の準備を整えた。透析は自己消化を最小限に抑えるために4で行われた。

【 0 0 6 5 】

酵素活性の評価

20

ある試剤に曝露された蛋白質を、各々、アゾ基含有染料を含む基質コラーゲンと共にインキュベートすることによってその蛋白質の活性を評価した。アゾコールはPBS中に1mg/mLの濃度で懸濁せしめられた。

【 0 0 6 6 】

この検定のために、1mLの蛋白質を1mLの基質アゾコールと混合した。反応をエッペンドルフ・マイクロフュージュ管（Ependorff microfuge tubes）中で37において20分間行った。反応時間の終点で、その混合物を遠心分離して、その水溶性から未消化アゾコールを分離することによって反応を停止させた。その水溶性をそれら遠心管から取り出し、そして（可溶性アゾ染料を含んでいる）その溶液の吸光度を520nmにおいてモニターした。

30

【 0 0 6 7 】

対照は、蛋白質に作用させるために用いられる適切な試剤を含んでいるPBSであったが、その蛋白質自体を含んでいない陰性対照より成るものであった。陽性対照は上記処理に曝露されない酵素であった。それらの一定量ずつをストック溶液からアゾコールの反応容器に直接分取した。

【 0 0 6 8 】

データの分析

実験は全て三回ずつ行われた。報告されるデータは三回の読みの平均である。実験はモデル系の実行可能性を試験するために行われた；色々なグループについて、またはそれらグループ間で統計的分析を行う試みはしなかった。

40

【 0 0 6 9 】

V. 結果

【 0 0 7 0 】

【表1】

トリプシンの酸化剤（1種または複数種）に対する曝露

試料	吸光度、@ 520 nm
陰性対照	0.089
陽性対照	0.664
処理試料	0.342

【0071】

10

【表2】

トリプシンの変質剤（SDS）に対する曝露

試料	吸光度、@ 520 nm
陰性対照	0.004
陽性対照	0.544
処理試料	0.066

20

【0072】

【表3】

キモトリプシンの還元剤に対する曝露

試料	吸光度、@ 520 nm
陰性対照	0.003
陽性対照	0.523
処理試料	0.031

30

V I . 考 察

データは、上記の処理が組織の細胞外マトリックス内の蛋白質を不活性化するのに役立てることができることを示唆している。後続の組織マトリックス処理を評価するために、あるモデルを採用し、その評価に信頼性があると考える前に、評価しなければならない幾つかの点がある。第一は陰性対照中の反応した基質の外観である。これは、酸化剤の場合、試薬の会合により起こるある種の可能な反応が存在することを意味しているだろう。

【0073】

SDSを用いる他の実験については、その低いバックグラウンドは反応に曝露される酵素から検定に運び込まれる過剰のSDSに起因している可能性がある。SDSはアゾコールに結合してその分解感受性をより小さくするだろう。

40

【0074】

引用刊行物、特許明細書および特許ドキュメントは、全て、それらがたとえ個々に言及されて含まれているとしても、ここに言及することにより本明細書に組み入れられるものである。以上、本発明を色々な特定の好ましい態様および技術を参照して説明した。しかし、多くの変更および修正をなし得、それらも同時に本発明の精神と範囲内に留まるものであることを理解されるべきである。

フロントページの続き

(31)優先権主張番号 60/105,949

(32)優先日 平成10年10月28日(1998.10.28)

(33)優先権主張国 米国(US)

(74)代理人 100071124

弁理士 今井 庄亮

(74)代理人 100076691

弁理士 増井 忠式

(74)代理人 100075270

弁理士 小林 泰

(74)代理人 100096013

弁理士 富田 博行

(74)代理人 100094008

弁理士 沖本 一暁

(72)発明者 トーリアンニ, マーク・ダブリュー

アメリカ合衆国カリフォルニア州92675, サン・ファン・キャピストラーノ, ヴィア・デル・アモ 32882

審査官 川口 裕美子

(56)参考文献 特表平04-501077(JP, A)

特開昭56-158651(JP, A)

特表平11-503051(JP, A)

特開平08-038590(JP, A)

特開昭57-190555(JP, A)

特表昭59-502104(JP, A)

特開昭61-056101(JP, A)

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

A61L 27/00

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamII)