

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公開特許公報(A)

(11) 特許出願公開番号

特開2005-342526
(P2005-342526A)

(43) 公開日 平成17年12月15日(2005.12.15)

(51) Int. Cl. ⁷	F I		テーマコード (参考)
A 6 1 L 27/00	A 6 1 L 27/00	Q	4 C 0 8 1
// A 6 1 M 29/02	A 6 1 M 29/02		4 C 1 6 7

審査請求 未請求 請求項の数 14 O L (全 19 頁)

(21) 出願番号 特願2005-195267 (P2005-195267)
 (22) 出願日 平成17年7月4日(2005.7.4)
 (62) 分割の表示 特願平8-516013の分割
 原出願日 平成7年4月4日(1995.4.4)
 (31) 優先権主張番号 08/341,881
 (32) 優先日 平成6年11月15日(1994.11.15)
 (33) 優先権主張国 米国 (US)

(71) 出願人 501072647
 プロビデンス ヘルス システム-オレゴン
 Providence Health System-Oregon
 アメリカ合衆国 98111-9038
 ワシントン州、シアトル、パイк ストリート 520
 520 Pike Street, Seattle, Washington 98111-9038 USA

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 エラスチンまたはエラスチン含有生体材料およびその製造方法

(57) 【要約】 (修正有)

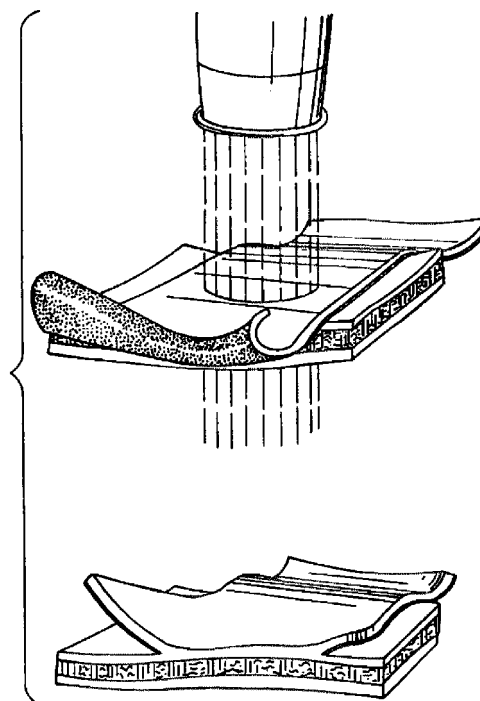
【課題】

生体組織の修復、または置換を遂行する方法を提供する。

【解決手段】

エラスチン含有生体材料および組織修復術および置換術において前記材料を使用する方法に関する。すなわち、エラスチンまたはエラスチン含有生体材料と基質を用意し、所定の光吸収性を示すエネルギー吸収材料を塗布し、光エネルギーを照射する。さらに、生体材料を実存する組織に固定するための方法に関する。

【選択図】 図1



【特許請求の範囲】

【請求項 1】

第 1 および第 2 の外表面を有するエラスチンまたはエラスチン含有生体材料層からなる組織融合性エラスチンまたはエラスチン含有生体材料であって、

前記第 1 および第 2 の外表面の少なくとも一方にエネルギー吸収材料が塗布され、

前記エネルギー吸収材料はエラスチンまたはエラスチン含有生体材料に対する浸透性を有するものであって、所定の光波長の範囲でエネルギー吸収性を示すようになっており、

前記所定の光波長の範囲内で十分な強度の光エネルギーを照射したとき、前記エラスチンまたはエラスチン含有生体材料層の前記第 1 および第 2 の外表面の一方と組織基質とが融合することを特徴とする組織融合性エラスチンまたはエラスチン含有生体材料。

10

【請求項 2】

前記エラスチンまたはエラスチン含有生体材料の前記第 1 および第 2 の外表面は、前記生体材料層の主面である請求項 1 に記載の生体材料。

【請求項 3】

前記エネルギー吸収材料は、まず前記エラスチンまたはエラスチン含有生体材料あるいは前記組織基質を通り、次いで該エネルギー吸収材料へ照射することにより、間接的に照射される請求項 1 または 2 に記載の生体材料。

【請求項 4】

前記エネルギー吸収材料は、生体適合性発色団からなる請求項 1 ないし 3 のいずれかに記載の生体材料。

20

【請求項 5】

前記エネルギー吸収材料は、エネルギー吸収染料からなる請求項 1 ないし 4 のいずれかに記載の生体材料。

【請求項 6】

前記エネルギー吸収材料は、前記エラスチンまたはエラスチン含有生体材料と前記組織基質とが融合したとき概ね消失する請求項 1 ないし 5 のいずれかに記載の生体材料。

【請求項 7】

前記エネルギー吸収材料は、前記エラスチンまたはエラスチン含有生体材料の前記第 1 または第 2 の外表面を染色するための物質からなる請求項 1 ないし 6 のいずれかに記載の生体材料。

30

【請求項 8】

前記エネルギー吸収材料は、前記生体材料の前記第 1 および第 2 の外表面の一方にエネルギー吸収材料を有する別個のエラスチン層を付与し、その後前記エラスチンまたはエラスチン生体材料に該別個のエラスチン層を融合させることにより使用される請求項 1 ないし 7 のいずれかに記載の生体材料。

【請求項 9】

前記エラスチンまたはエラスチン含有生体材料の前記第 1 または第 2 の外表面の少なくとも一方と前記組織基質とを融合させるのに必要な期間、光エネルギーを照射する際の温度は、40 ~ 140 である請求項 1 ないし 8 のいずれかに記載の生体材料。

【請求項 10】

エネルギー吸収材料の平均厚さは、0.5 ~ 300 μm である請求項 1 ないし 9 のいずれかに記載の生体材料。

40

【請求項 11】

エネルギー吸収材料における光エネルギー照射の際の波長、エネルギーレベル、吸光度および光強度は、40 ~ 140 において前記エラスチンまたはエラスチン含有生体材料の前記第 1 および第 2 の外表面と前記組織基質とが融合するように変更される請求項 1 ないし 10 のいずれかに記載の生体材料。

【請求項 12】

第 1 および第 2 の外表面を有するエラスチンまたはエラスチン含有生体材料層からなる組織融合性エラスチンまたはエラスチン含有生体材料の製造方法であって、

50

所定の光波長の範囲内でエネルギー吸収性を示すような生体材料に対する浸透性を有するエネルギー吸収材料を前記第1または第2の外表面に塗布し、

前記所定の光波長の範囲内で十分な強度の光エネルギーを照射したとき、前記エラスチンまたはエラスチン含有生体材料層の前記第1および第2の外表面の少なくとも一方と組織基質とが融合するようになっていることを特徴とする組織融合性エラスチンまたはエラスチン含有生体材料の製造方法。

【請求項13】

第1および第2の外表面を有するエラスチンまたはエラスチン含有生体材料の層と、第1および第2の外表面を有する組織基質とを有する融合された生体細胞-エラスチン含有生体材料複合物であって、

所定の光波長の範囲内で光エネルギーを吸収するエネルギー吸収材料を有し、

前記生体材料層と前記組織基質とが相互に直接融合するのに十分な量の前記エネルギー吸収材料を前記エラスチンまたはエラスチン含有生体材料および前記組織基質の前記第1および第2の外表面のいずれか一方に塗布し、

前記エラスチンまたはエラスチン含有生体材料と前記組織基質とが直接融合するのに十分な強度を有する前記所定の光波長の範囲内において放出される光エネルギーを前記エネルギー吸収材料に照射することにより、前記組織基質の前記第1および第2の外表面の少なくとも一方が前記エラスチンまたはエラスチン含有生体材料の前記第1および第2の外表面の少なくとも一方と直接融合するようになっていることを特徴とする融合された生体細胞-エラスチン含有生体材料複合物。

【請求項14】

生体組織-エラスチンまたはエラスチン含有生体組織の製造方法であって、

エラスチンまたはエラスチン含有生体材料層と組織基質とを準備し、

前記エラスチンまたはエラスチン含有生体材料層あるいは前記組織基質の第1または第2の外表面の少なくとも一方に所定の光波長の範囲内で光吸収性を示すエネルギー吸収材料を塗布し、

前記エラスチンまたはエラスチン含有生体材料層と前記組織基質の第1または第2の外表面は、前記エネルギー吸収材料が前記エラスチンまたはエラスチン含有生体材料層と前記組織基質との間に位置して相互に接触するように配置し、

前記エラスチンまたはエラスチン含有生体材料層と前記組織基質の前記第1または第2の外表面とが融合するのに十分な強度を有する前記所定の光波長の範囲内の光エネルギーを前記光エネルギー吸収材料に照射することを特徴とする生体組織-エラスチンまたはエラスチン含有生体組織の製造方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、エラスチンまたはエラスチン含有生体材料および組織修復術および置換術においてそのような生体材料を使用するための方法に関する。また、本発明は、エラスチンまたはエラスチン含有生体材料を生体組織に固定するための方法に関する。

【背景技術】

【0002】

エラスチンは、哺乳動物において遍在する細胞外基質タンパク質である。エラスチンは、例えば、皮膚、血管および肺組織中にみられ、それらの部位に強度、弾性および柔軟性を付与する。さらに、エラスチンは正常動脈の内弾性膜(IEL)および外弾性膜(EEL)に多く含まれており、平滑筋細胞の内膜への移動を抑制する可能性がある。可溶性ペプチドの形のエラスチンは、血小板由来因子に応じて平滑筋細胞の移動を抑制することが知られている(Ooyama et al., Arteriosclerosis 7:593 (1987))。エラスチン反復ヘキサペプチドは、ウシ大動脈内皮細胞を生成し(Long et al., J. Cell. Physiol. 140:512 (1989))、エラスチン・ノナペプチドは、線維芽細胞を生成することが知られている(米国特許第4,976,734号)。本発明は、これらのエラスチンの物理的および生

10

20

30

40

50

化学的特性を利用するものである。

【0003】

アテローム性動脈硬化性狭窄症の30～40%は、バルーン血管形成術を用いて開口されるが、中膜細胞の内方成長により再狭窄する。内膜への平滑筋内方成長は、バルーン血管形成術による重度の拡張による損傷や、血管吻合術または弾性板を引きはがしたりまたは除去することによるその他の血管外傷の場合のように、IELがはがれたり消失した動脈部分においてより優勢であると思われる。損傷を受けた後に動脈壁の修復が始まるが、エラスチン含有構造であるIELおよびEELは再構築（再生）されない。これらの成分は重要な構造的および調節的役割を果たしているため、それらが破壊されるとそれに伴って筋細胞移動が生じる。

10

【0004】

さらにまた、破裂し得る動脈瘤に帰する血管壁の衰弱に関連する疾患は勿論少なくとも部分的にはエラスチンの異常に関連して発生するその他の疾患も存在する。

【0005】

損傷後の筋細胞の内方成長の結果発生する血管壁の再狭窄もしくは再狭小化の問題を克服するために、血管ステントのようなプロテゼが使用されており、いくらかの成功を収めてきた。しかしながら、それらの使用はしばしば血栓症に結びついてしまう。さらに、プロテゼが根源的なアテローム性動脈硬化症を悪化させることもある。それでもプロテゼはしばしば使用されている。

【0006】

ごく最近まで、プロテゼ材料を組織に（もしくはプロテゼ組織を組織に）固定するために利用できる主要な方法には縫合糸もしくはステープルの使用が含まれていた。トロピンを添加して重合化したフィブリン重合体であるフィブリン糊も組織封鎖剤および止血剤として使用されている（主にヨーロッパにおいて）。

20

【0007】

レーザエネルギーは、フィブリン、コラーゲンおよびその他のタンパク質の熱融解により起こると考えられる動脈切開術における組織溶接に有効であることが知られている。感光性染料の使用は、標的部位へのレーザエネルギーの選択的照射を強化し、より低出力レーザシステムの使用を可能にするので、これらの両方の要素が好ましくない熱傷害の程度を低下させる。

30

【0008】

本発明は、エラスチン含有製剤の長所とレーザ溶接技術の長所を結び付け、独創的な組織修復および置換の方法を提供する。本発明は、プロテゼに関連する周知の問題が本質的にない組織プロテゼ（特に、血管プロテゼ）を可能にする。

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0009】

本発明の一般的な目的は、組織修復もしくは置換を遂行する方法を提供することである。

【0010】

本発明の特別な目的は、例えば血管ステントのようなステント、あるいは動脈、静脈または尿管置換物のような導管置換物として使用するのに適したエラスチンもしくはエラスチン含有生体材料を提供することである。本生体材料はさらに、ステントもしくは導管のカバリング（被覆）材もしくはライニング（内張り）材として使用することもできる。

40

【0011】

本発明のさらなる目的は、内腔壁を修復する際に使用するために適当なエラスチンもしくはエラスチン含有移植組織（graft）を提供することである。

【0012】

本発明のさらにもう1つの目的は、例えば膀胱内部置換もしくは修復、腸、食道または結腸の修復もしくは置換、もしくは皮膚修復または置換等の組織置換もしくは修復におい

50

て使用するために適したエラスチンもしくはエラスチン含有生体材料を提供することである。

【0013】

さらにまた、縫合糸もしくはステープルを使用することなくエラスチンもしくはエラスチン含有生体材料を生体組織へ固定する方法を提供することも本発明の目的である。

【課題を解決するための手段】

【0014】

本発明は、体組織の区域を修復し、置換し、もしくは支持する方法に関する。本方法は、エラスチンもしくはエラスチン含有生体材料を前記区域の部位に配置することおよび、前記生体材料を前記部位もしくは前記部位の周辺組織に結合させることで構成されている。結合は、エネルギー吸収材料を用いて、前記結合が実施されるべき箇所で本生体材料と前記部位もしくは前記部位の周辺組織とを接触させることによって実施する。その後、エネルギー吸収材料は、前記生体材料を前記部位もしくは前記部位の周囲組織に結合させるために十分であって、かつ前記吸収材料が吸収可能な量のエネルギーに曝される。

10

【0015】

より詳しくは、組織融合性エラスチンもしくはエラスチン含有生体材料は本発明の製造方法により製造することができ、それは各々第1および第2の外面を有するエラスチンもしくはエラスチン含有生体材料および組織基質の層からなる。

【0016】

そして少なくとも外面の1つにエネルギー吸収材料が塗布され、前記エネルギー吸収材料が本生体材料内に浸透する。

20

【0017】

前記エネルギー吸収材料は、所定の光波長の範囲内のエネルギーを吸収する。エネルギー吸収材料は、所定の波長の範囲における光エネルギーを照射したときに、エラスチンもしくはエラスチン含有生体材料の第1および第2外面の1つと組織基質とを融合するために光線の強度が十分であるように選択される。好ましくは、エラスチンもしくはエラスチン含有生体材料の第1および第2外面は、該生体材料層の主面である。典型的には、エネルギー吸収材料は、光エネルギーをまず第1にエラスチンまたはエラスチン含有生体材料もしくは組織基質を通し、その次にエネルギー吸収材料へ向けることによって間接的に照射される。

30

【0018】

本発明の好ましい製造方法においては、エネルギー吸収材料は生体適合性を有する発色団から構成され、より好ましくはエネルギー吸収染料から構成される。本発明の一実施形態においては、エネルギー吸収材料は、エラスチンもしくはエラスチン含有生体材料と組織基質とが融解するときに概ね消散（消失）する（すなわち、エネルギー吸収材料にエネルギーを与えることにより、エネルギー吸収材料そのものがエラスチンまたはエラスチン含有生体材料と組織基質との間の接触面に溶け込むように消える）。本発明のもう1つの実施形態においては、エネルギー吸収材料はエラスチンもしくはエラスチン含有生体材料の第1もしくは第2の表面を染色するための材料から構成される。

【0019】

エネルギー吸収材料はさらに、別のエラスチン層にエネルギー吸収材料をドーピングし、かかるドーピングした別のエラスチン層をエラスチンもしくはエラスチン含有生体材料に融合させることによって生体材料の外面の1つに塗布することも可能である。いずれにしても、エネルギー吸収層は、少なくとも外面の1つは概ね均一に塗布され、すなわち一般的にはエネルギー吸収材料が実質的にエラスチンもしくはエラスチン含有生体材料の外面全体が覆われていることが好ましい。

40

【0020】

エラスチンもしくはエラスチン含有生体材料および組織基質との融合に関する本発明の製造方法に影響を及ぼす重要な特性のいくつかには、光エネルギーによるエネルギー吸収材料の照射中の波長、エネルギーレベル、吸収および光強度、およびエネルギー吸収材料

50

の濃度が含まれる。これらの特性は、エラスチンもしくはエラスチン含有生体材料の第1および第2外面の1つと組織基質との融合を誘起する時間の光エネルギーによる照射中の温度が約40～140、より好ましくは約50～100となるように調整される。さらにその上、本発明の好ましい製造方法におけるエネルギー吸収材料の平均厚さは約0.5～300μmである。

【0021】

以上の各場合において、前記エネルギー吸収層は、前記外表面の少なくとも一方にほぼ均一に付着させることが好ましい。

【0022】

また、前記エネルギー吸収材料は、前記外表面のいずれかをほぼ覆うようにすることが好ましい。 10

【0023】

また、前記エラスチンまたはエラスチン含有生体材料の第1および第2の外表面のいずれか一方と前記組織基質とを一体に融着させる間に照射される光エネルギーの温度は、約50度から100度であることが好ましい。

【0024】

また、前記方法において、前記エラスチンまたはエラスチン含有生体材料の第1および第2の外表面は、該生体材料層の主面であることが好ましい。

【0025】

また、前記方法では、光エネルギーは、最初に前記エラスチンまたはエラスチン含有生体材料を通過し、次に前記エネルギー吸収材料に届くように、前記エネルギー吸収材料を間接的に照射するようにすることもできる。 20

【0026】

また、前記エネルギー吸収材料は、生体適合性発色団 (biocompatible chromophore) を有することが好ましい。

【0027】

また、前記エネルギー吸収材料は、エネルギー吸収性染料を含むことが好ましい。

【0028】

また、前記方法では、前記エラスチンまたはエラスチン含有生体材料と前記組織基質とが一体に融着する際に、前記エネルギー吸収材料を実質的に散逸させるようにすることが 30

【0029】

また、前記方法では、さらに、前記エラスチンまたはエラスチン含有生体材料の前記第1または第2の面を前記エネルギー吸収材料で染色 (stain) することができる。

【0030】

また、前記方法では、分離したエラスチンの層にエネルギー吸収材料を塗布し、その後このエネルギー吸収材料が塗布された分離したエラスチンの層を別途のエラスチンまたはエラスチン含有生体材料に融着させることによって、前記エラスチンまたはエラスチン含有生体材料の外表面の一方に前記エネルギー吸収材料を付着させることができる。

【0031】

また、前記方法では、前記エネルギー吸収層は、前記外表面の少なくとも一方にほぼ均一に塗布されることが好ましい。 40

【0032】

また、前記方法では、さらに、エラスチンまたはエラスチン含有生体材料のいずれかの外表面を前記エネルギー吸収材料で実質的に覆うようにすることが好ましい。

【0033】

また、前記方法では、前記エラスチンまたはエラスチン含有生体材料の第1および第2の外表面のいずれか一方と前記組織基質とを一体に融着させる間に、約40～140の温度の光エネルギーを照射することが好ましい。

【0034】

また、前記方法では、前記エラスチンまたはエラスチン含有生体材料の第1および第2の外表面のいずれか一方と前記組織基質とを一体に融着させる間に、約50～100の温度の光エネルギーを照射することが好ましい。

【0035】

また、前記エネルギー吸収材料の平均厚さは、約0.5～300μmであることが好ましい。

【0036】

また、前記方法において、さらに、エネルギー吸収材料への光エネルギーの照射の間の波長、エネルギーレベル、吸収および光強度を適宜調節し、エネルギー吸収材料の凝集の際にエラスチンまたはエラスチン含有材料の第1および第2の外表面および組織基質の温度が約40度から140度に維持され、それによって前記エラスチンまたはエラスチン含有生体材料および組織基質を一体に融着させるようにすることもできる。

10

【0037】

本発明のその他の目的および長所は下記の説明から明らかにされるであろう。

【発明を実施するための最良の形態】

【0038】

本発明は、エラスチン含有生体材料および前記生体材料をレーザーエネルギーを用いて組織へ溶接するための方法に関する。本発明において使用するために適したエラスチン含有生体材料は、例えば、Rabaud et al. (米国特許第5,223,420号)によって開示されているようにエラスチン(例、ウシ頂部靭帯から得られたもの)、フィブリノーゲンおよびトロンピンから調製することができる(Aprahamian et al., J. Biomed. Mat. Res. 21:965 (1987)、Rabaud et al., Thromb. Res. 43:205 (1986)、Martin, Biomaterials 9:519 (1988)も参照)。

20

【0039】

このような生体材料は、一定のタイプの組織修復においては有利な場合がある血栓形成特性に関連していることがある。さらにまた、本発明において使用するために適当なエラスチン含有生体材料は、Rabaudおよびその共同研究者によって開示されているようにエラスチンおよびIII型コラーゲンから調製することもできる(Lefebvre et al., Biomaterials 13(1):28-33(1992))。このような調製は血栓形成性ではないため、血管ステント等に使用することができる。本発明において使用するために適した別のタイプのエラスチン含有生体材料は、Urry et al.によって開示されているように調製される(例えば米国特許第4,132,746号および第4,500,700号参照)(さらにまた、米国特許第4,187,852号、第4,589,882号、第4,693,718号、第4,783,523号、第4,870,055号、第5,064,430号、第5,336,256号も参照)。エラスチン含有組織(例えば、動脈)の蒸解の結果生じるエラスチン基質も使用可能である。蒸解によって、細胞、タンパク質および脂肪は除去されるが、無傷でエラスチン基質は維持される。使用される生体材料は個々の用途に応じて決められる。

30

【0040】

可溶性エラスチン(上記Rabaud et al.参照)から調製された本発明のエラスチン含有生体材料は、あらゆる特定の目的に適切なサイズおよび形状に成形することができる。成形された生体材料は次のように調製される。エラスチン(例えば、可溶性エラスチン(分子量12,000～32,000ダルトン))を緩衝液中で洗浄して膨潤させる。フィブリノーゲンもしくはクリオグロブリン(例えば、Pool et al., New Engl. J. Med. 273(1965)に従って調製したものを)を膨潤させたエラスチンに添加し、その後チオ尿素を添加し、アプロチニン等のようなプロテアーゼ阻害薬を添加、もしくは添加せずに、さらにコラーゲンを添加する。攪拌しながらトロンピンを添加し、その結果得られた混合液を直ちに目的に応じた型に注ぎ入れる。その後前記型を例えば37で15分から1時間、好ましくは30分間、定温放置し、その間フィブリン/エラスチン材料の重合化が有利に進行する。この反応は37未満の温度でも行うことができるが、反応は77ではより迅速に進行する。しかし、40度を超える温度へ反応を加熱するとトロンピンの変性が生じる

40

50

ことがある。攪拌中に混合液が冷却すると、混合のための時間がより長くなる。重合化を生じさせるためには、緩衝液中にカルシウムおよびマグネシウムが含まれていること、そして変性していないトロンピンを使用することが重要である。

【0041】

型内での重合化の後、生じた生体材料はガンマ線照射もしくはグルタルアルデヒド（好ましくは、グルタルアルデヒド、ギ酸およびピクリン酸の溶液）のような試薬を用いることによりさらに架橋させることができる。ガンマ線照射をする場合、サンプルを有益なものとするためにコバルト-60を線源とするガンマ線照射を行うのが必要である。照射線量は、例えば10~100 Mradとすることができるが、好ましくは25 Mradである。ガンマ線の照射線量が材料の強度に影響を及ぼすことが知られている（Aprahamian, J. Biomed. Mat. Res. 21:965 (1987)）。生体材料からなるシートは、適切な型を使用することによって厚さを調節して調製することができる。生体材料からなるシートは、例えば200 μm~5 mmの範囲内の厚さで作製することができる。

10

【0042】

シートは、通常は十分な強度を保持しながらレーザーエネルギーの透過を許容することができる限り薄く作られる。例えば、腸管移植片として使用するために適したシートの厚さ範囲は200 μm~5 mmであり、約2 mmが好ましい。膀胱において用いられるような、より大きな強度を必要とする移植片は、一般的にはそれよりも厚いものである。動脈ステントもしくは動脈移植片はもっと薄い（例えば、100~1000 μm）ものである。

【0043】

可溶性エラスチンもしくは不溶性エラスチン断片から調製された生体材料は、また例えば前記材料を管状の型内に注入することによって管状物に成形することができる。内管と外管との間にあるエラスチン溶液の架橋は、型から生体材料を抜去する前でも、もしくはチューブを取り除いた後でも進行する。内管と外管の径を種々に変化させることによって、種々の内径、外径および長さの異なる管状物を調製することができる。このタイプの型は、径の様々な内管および外管を用いて事実上あらゆるサイズの管状物を作ることができる。径の小さいチューブは冠動脈用ステントに使用できる。径が1~5インチの大きいチューブも製造することができる。これは小腸もしくは結腸の吻合のための角を形成した溶接片として使用することができる。以上述べたものは単なる一例にすぎず、様々な成形技術および成形材料を使用できる。

20

30

【0044】

上述のように、本発明で用いられるために適した生体材料は、エラスチン基質を含有する組織の蒸解物から調製することができる。

【0045】

出発材料として使用に適した組織には、動脈（例えば、ブタの冠動脈もしくは大腿動脈）、臍帯、腸、尿管等が含まれる。基質材料は、生体適合性が増加するように移植が行われている動物種由来のものが好ましい。細胞外エラスチン基質を無傷で残しながら本来の基質から細胞物質、タンパク質および脂肪を除去する（蒸解する）方法はいずれも使用できる。これらの方法には、酸性、塩基性、洗浄性、酵素性、熱的もしくは侵食性手段ならびに有機溶剤の使用の組合せも含まれる。これには水酸化ナトリウム、ギ酸、トリプシン、グアニジン、エタノール、ジエチルエーテル、アセトン、t-ブタノールの溶液中での定温放置および超音波処理を含むことができる。一般的には、蒸解は高温であるほど急速に進行する。定温放置の最適温度および時間は出発物質および使用する蒸解剤に依存し、容易に決定することができる。管状出発物質の蒸解により管状物が得られるが、それらの管状物を開いて組織移植片として使用に適したシートを成形できることを当業者であれば、認識できるであろう。またその代わりに、このような管状物を開いて、その後出発組織とは異なる径を有する管状物として再構成することもできる。

40

【0046】

しかしながら、好ましくは、管状品が必要な場合には、蒸解後の（長さの調整以外の）操作を回避できるように、適切な径をもつ管状物が得られるように出発材料が選択される

50

【0047】

エラスチン粉末からまたは組織蒸解物から調製された本発明の生体材料は、通常は生体組織へ固定される。その取付けを行うためには、既に知られている技術を含む様々な技術を使用することができる。しかし、生体材料が組織溶接エネルギー源およびこのエネルギー源によって放出されたエネルギーを吸収する試薬を用いて固定される方法が好ましい。有利であるのは、エネルギー源がレーザーのような電磁エネルギー源であり、吸収材料がそのレーザーの波長に対応する波長で吸収ピークを有する染料であることである。エラスチン生体材料および溶接される組織はこの波長では光線の吸収がはるかに少ないため、その効果は染料層の周辺域に限定される。好ましいエネルギー源は約808nmに主波長を有するレーザーダイオードであり、好ましい染料は最大吸光度が795~805nmであるインドシアニングリーン(ICG)である(WO91/04073参照)。その他のレーザー/染料の組合せも使用することができる。染料は、生体材料の生体組織と接触させ、固定させる部分に塗布することが好ましい。染料はまた、エラスチン生体材料が溶接もしくは固定されるべき組織の表面に塗布することもできる。染料は、生体材料もしくは生体材料の表面に直接塗布することができ、生体材料は、染料が個別の層もしくは被覆物として保持されるように生体材料内への染料の吸収を調節する組成物を用いて最初に処理もしくは被覆(例えば、プライミング)することができる。

10

【0048】

その代わりに、染料が表面に固定されて材料内へ吸収されることを防止するためにエラスチン生体材料に結合させることもできる。染料は溶液の形で塗布することができる、もしくは染料はその後好ましくは均一な厚さおよび染料濃度をもつ薄いシートもしくはフィルムとして利用できる溶媒に溶解もしくは懸濁させることができる。

20

【0049】

接合剤を使用する組織溶接技術を使用することができる。このような技術は既知である(WO91/04073)。接合剤として、加熱により熱的に変性するあらゆるタンパク性物質(例えば、アルブミン、フィブロネクチン、Von Willebrand因子、ビトロネクチン)のようなあらゆる血清タンパク、もしくはタンパク質またはペプチドのあらゆる混合物)を使用することができる。このような材料が例えば血管内腔内で血栓症もしくは凝固を起こすような不都合な場所以外では、トロンピン、重合化フィブリノーゲンから成る接合物が好ましい。接合物は、生体材料と組織との間により大きな粘着強度を付与する能力により選択される。接合物は、非毒性であって、一般に生体適合性でなければならない。

30

【0050】

本発明によれば、組織を露出させる(例えば、外科手技中に)ことによってレーザーからレーザーエネルギーを直接的に(例えば、染料等の)標的部位に向けることができる。いくつかの場合、即ちオープン式外科的露出が行われない血管内カテーテル治療においては、レーザーエネルギーは光ファイバによって接合部位へ導かれる。

【0051】

ICGを染料として使用する場合は、およそ800nmの標的媒質の波長を使用することができる。このような波長は、多数の組織、特に血管組織にはあまり吸収されないもので、このためこれらの組織にはほとんど影響を与えず、熱的作用は染料層に限定される。同様に本発明の生体材料は、この波長帯においてはエネルギー吸収染料に比してほとんど吸光度を有していない。従って、レーザーエネルギーは生体材料もしくは生体組織のいずれかを通過することができ、図1に示すように染料層によって吸収される。外科医が生体材料による強化もしくは置換を施すべき表面もしくは血管を露出させると、生体材料の染料を含有する表面はその面で生体組織と接触し、レーザービームを適切な場所に向けることによってレーザーエネルギーが照射される。例えば、ICGのような染料層の吸光度は、理想的には事前もしくは同時に、最適結合のための最適量の光線を照射できるように決定される。組織および生体材料が十分に接近することを確実にするために圧迫することも可能である。ダイオードレーザー源を用いると、均一な光線の誘導を保証するために、ダイオードレ

40

50

ーザ自体、もしくはコンデンサもしくは光ファイバをベースとするオプティカルデリバリシステムを材料と反対側に配置することができる。

【0052】

例えばオープン外科的動脈内膜切除術後に新規のエラスチンライニングもしくは新規内弾性膜が必要な場合は、いったん動脈から外科的にアテロームもしくはその他の病変部を切除し、その後生体材料を挿入し、染色側を下にする（図2参照）。

【0053】

本生体材料は扁平な移植片としてもしくは管状物として使用することができる。管状物は中空であっても、もしくは挿入中に内腔を支持し、低度の熱で溶解されるもしくは様々な手段を用いて溶解もしくは抜去される物質で満たされていてもよい。必要な場合は少数の外科用縫合糸（例えば、留置用縫合糸）を用いて血管端部に付着させるもしくは血管に縫合することができる。生体材料を配置したら、血管壁を通して、または生体材料を通してレーザーエネルギーを吸収染料に照射するが、このとき適切なレーザーエネルギーは生体材料において調整された吸光度に基づいて事前に決定される。その代わりに、染料を手術の時点で生体材料もしくは血管壁もしくはその両方に塗布し、その後レーザーエネルギーを照射することもできる。

【0054】

この実施態様においては、吸光度は、後にレーザーエネルギーが照射される生体材料もしくは血管壁もしくはその両方に対する外科的手術の時点で、もしくは結合または熱作用の適切性を評価するフィードバック装置を用いて決定することができる（図4はブタ大動脈へ融合されたエラスチン含有生体材料の電子顕微鏡写真である）。

【0055】

上記に加えて、本発明の生体材料は、特に患者が栄養状態もしくはその他の問題を有している場合、もしくは患者が多数の銃創またはその他の腹部傷害の症例におけるようにショック状態にある場合等、現行技術ではしばしば良好に回復しない腸もしくは結腸修復において使用するための移植片材料として用いることができる（図3参照）。

【0056】

例えばこのような移植片を使用することにより、腸内容物を密封でき、それによって腹膜炎の確率を低下させることができる。さらに、移植片は肝臓のような固形臓器において破裂が生じた場合に使用できる。同様に、本発明の生体材料は排尿システムの部分、即ち腎臓の腎杯から尿道までの部分を修復もしくは置換するために使用することができる。さらにまた移植片は、心房中隔欠損のような心室における欠損ならびに気管支もしくは直腸瘻を密封するためにも使用できる。この生体材料は、さらに動脈瘤のための脳血管用移植片として使用することもできる。本生体材料は、標的レーザー融合術を用いて適所にシールされる。直接露出が不可能もしくは不適切な部位で使用するために、種々のカテーテルもしくは内視鏡システムを使用して標的部位へレーザーエネルギーを照射することができる。

【0057】

本発明におけるエラスチン含有生体材料は、様々なその他の臨床および外科的状況において組織修復用移植に使用することができる。血管ステントの形で生体材料を配置させるためには、前記生体材料は収縮したバルーンカテーテル上に予め取り付けることができる。バルーンカテーテルは常法により所望の動脈もしくは静脈の中へ挿入することができる。その後バルーンを拡張し、血管壁に対してステント（生体材料）を押しつけ、その後バルーンを通してレーザー光を照射してステントを適切な場所に固定することができる（染料は生体材料の外側に存在し得る）。

【0058】

その後バルーンを収縮させてステントをその場所に残したまま抜去することができる。血管通過中のステントを保護し、ステントを適切な場所に配置させた後抜去するために保護スリーブ（例、プラスチック製）を使用することができる。本発明の生体材料はさらに、金属製もしくは合成スカフォード（足場）もしくはステントのための生体適合性被覆剤として使用することもできる。このような場合は、レーザーによる結合を必要としない単純

10

20

30

40

50

な機械的装着が使用できる。しかし、レーザーによる結合は、特別な必要に応じて、例えば腹部大動脈瘤のためのステントを装着する場合のような適切な機械的結合が生じない場合に使用することができる。

【0059】

他にカテーテルによる血管ステント装着術は、バルーンデリバリシステムを用いて、または用いずに一時的に機械製ステントを使用する方法である。

【0060】

さらにもう1つのカテーテルによる血管ステント装着術では、熱変形性金属（ニチノールもしくはその他類似のタイプの金属）製の人工骨格（スカフォード）もしくはステントもしくはステント生体材料の真下のカテーテルチューブに結合される被覆材を使用する。ステントは所望の場所に挿入され、それに基づいてステントの変形性金属がステントを血管壁に対して接触するように作動させる。その後レーザー光は、カテーテル組立体に組み入れられた光ファイバシステムを経由して照射される。

10

【0061】

エラスチン含有生体材料はさらに、疾患血管または損傷血管もしくは食道、心膜、肺胸膜等のような非血管組織の部分を置換するために使用することもできる。

【0062】

本生体材料はさらに、例えば火傷もしくは創傷治療において皮膚層置換物として使用することもできる。そのようなものとして、本生体材料は上皮細胞再生のための足場として作用する永続的ドレッシング剤として役立つ。本生体材料は、抗生物質、止血剤もしくは最小全身性薬剤レベルで高局所濃度を得る種々の治療のために所望のその他の薬剤を含有することができる。エラスチン生体材料を、組織部位の上に染料とともに配し、その後適切な波長のレーザーエネルギーを用いて融解させることができる。

20

【0063】

管状の身体構造の修復術に加えて、本発明の生体材料はさらに臓器再建術にも使用することができる。例えば、本生体材料は膀胱再建術において使用するために適当な袋状に成形、もしくはその他の方法で形作ることができる。本発明の生体材料はまた食道置換のために適するように成形し、もしくはその他の方法で形作ることができる。さらに、咽頭から胃への食物の通過をコントロールできるように特別な内壁支持物が必要とされる場合は、金属製もしくは合成メッシュをインプラントと連結させることもできる。これは食道狭窄症、びらん性食道炎の酸逆流の修復、またはより好ましくは食道癌のための手術もしくは化学療法の間にもしくは後の損傷した食道部分を一新するために使用することも可能である。

30

【0064】

一定の適用に対しては、本発明の生体材料を強い機械的特性を有する支持材料と組み合わせて使用することが適切な場合がある。

【0065】

それらの適用のためには、本生体材料は、例えばここに説明したような成形技術を用いて支持材料（上述のステントの説明を参照）上にコーティングすることができる。好ましい支持材料には、平織ポリエチレンテレフタレート（ダクロン）、テフロン（テフロンは登録商標）、ポリオレフィン共重合体、ポリウレタン、ポリビニルアルコールのような重合体もしくはその他の重合体が含まれる。さらに、フィブリンおよびエラスチンのような天然高分子体と、ポリウレタン、ポリアクリル酸もしくはポリビニルアルコールのような合成高分子体とで混成した重合体を使用することもできる（sets Giusti et al., Trends in Polymer Science 1:261(1993)）。このような混成材料は重合体の有用な機械的特性とエラスチン含有材料の適切な生体適合性を備えている。合成物質もしくはエラスチン生体材料をコーティングした金属、または生体材料/合成物質の混成物から作られるその他のプロテーゼには、例えば心臓弁リングおよび食道ステントが含まれる。

40

【0066】

本発明のエラスチン含有プロテーゼは、薬剤を含有できるように調製することができ、

50

この薬剤を前記プロテアーゼによって特定の身体部位に送達することができる。例えば、血管ステントは、ヘパリンのような血液の凝固を防止する薬剤もしくはヒルジンのような抗血小板薬、平滑筋内方成長を防止する薬剤もしくは内皮細胞の再成長を促進する薬剤を含有するように製造することができる。血管拡張薬もまた含有させることができる。エラスチン含有生体材料から形成されたプロテアーゼはさらに生存可能な細胞でコーティングすることもできる。

【0067】

エラスチン含有生体材料から形成されたプロテアーゼはさらにまた生存可能な細胞、好ましくはプロテアーゼを施される者の細胞でコーティングすることもできる。好ましくは（例えば、脂肪吸引中に採取されたような）自家内皮細胞を、移植（例えば血管ステント適応症）に先だってエラスチン生体プロテアーゼ上にうえつけることができる。その他に、エラスチン生体材料は、植え込み前に培養皮膚細胞をその生体材料上に配置できる場合は皮膚置換もしくは修復媒体として使用することができる。したがって皮膚細胞はエラスチン生体材料をコーティングするために使用することができる。

10

【0068】

本発明のいくつかの態様を下記の非限定的実施例の中でより詳細に説明する。

【0069】

[実施例1] 可溶性ペプチドからのエラスチン含有生体材料シートの調製

生体材料製造に使用した材料：

リン酸緩衝液：使用したリン酸緩衝液は、リン酸ナトリウム 1 mM、塩化ナトリウム 150 mM、塩化カルシウム 2 mM、塩化マグネシウム 1 mMを含有していた（pH 7.4）。

20

【0070】

可溶性エラスチンペプチド：ウシ頂部靭帯由来エラスチン粉末をシグマ社（セントルイス、ミズーリ州）から入手した。下記の方法により可溶性エラスチンペプチドを得た。：エラスチン粉末 2.7 gを80%エタノールに溶解させた1 MのKOH溶液 35 ml中に懸濁させた。

【0071】

この懸濁液を50 で2.5時間攪拌した。次に、脱イオン水 10 mlを添加し、この溶液を濃縮された12 MのHClを用いてpH 7.4に中和した。この溶液を4 で12時間冷却した。塩の結晶から透明な溶液をデカンテーションして分け、その上清を2,000 rpmで15分間遠心分離した。この溶液をその後10,000 MWカットオフ透析用チューブを用いて、1回の所要時間を15時間とし、2時間の間隔をおいて水道水を3回交換して透析を行った。この透析を1回の所要時間を15時間とし、2時間の間隔をおいて脱イオン水を6回交換して継続して行った。その結果生じた透析物を凍結乾燥し、-20 で保存した。収率は40%であった。

30

【0072】

クリオグロブリンの調製：Pool and Shannon (New engl. J. Med. 273 (1965))の方法を修正した方法を用いてクリオグロブリンを製造した。クリオグロブリンは主としてフィブリノーゲン(40 mg/ml)およびフィブロネクチン(10 mg/ml)を含有する(フィブリノーゲンおよびフィブロネクチンの濃度は変動する)。手短に言えば、アデニン、クエン酸塩およびデキストロース抗凝固剤を含有する標準500 ml血液収集バッグにブタの血液を採取した。この血液を20本の50 mlプラスチック製遠心分離用試験管に移し、1500 rpmで15分間遠心分離を行った。血漿を赤血球層からデカンテーションし、-70 で12時間冷凍した。血漿をその後4 で解凍した。クリオグロブリンを4 1500 rpmで15分間、血漿を遠心分離することによって収集した。上清をデカンテーションし、パストゥールピペットを用いて沈澱物を除去することにより収集した。

40

【0073】

各試験管をさらに0.9%のNaClおよび0.66%のクエン酸ナトリウムを含有するクエン酸ナトリウム溶液 3 mlを用いて洗浄した。このクリオグロブリンを貯蔵し、-

50

70 で凍結し、凍結乾燥して使用時まで - 20 で保存した。

【0074】

チオ尿素：試薬等級のチオ尿素をシグマ社（セントルイス、ミズーリ州）から入手した。0.5 mg/ml 溶液を使用した。

【0075】

I型コラーゲン：酸に可溶性のI型コラーゲンをシグマ社から入手した。これはBornsteinの方法を修正した方法によるラット尾の腱からのものを用いた。コラーゲン2 mgを0.6 mlリン酸緩衝液中で60、10分間溶解するまで加熱した。これをその後37へ冷却して使用した。

【0076】

トロンピン：凍結乾燥した形のウシ血漿由来トロンピンをシグマ社から入手した。水1 mlを用いて再構成したとき、この溶液は1 ml当たり106 NIH単位を含んでいた。

【0077】

アプロチニン：ウシ肺由来アプロチニンをシグマ社から入手した。これは1 ml当たり15~30 TIU（トリプシン阻害単位）を含んでいた。

【0078】

調製：620 μm石英ファイバを40 mm x 25 mmのガラス板の片面に接着し、輪ゴムを用いて第2のガラス板を第1のガラス板に付着させることによって6個の型を作製した。各型は約0.5 mlの容器に構成した。

【0079】

生体材料は下記のものゝ逐次添加および混合することによって調製した：

37 でリン酸塩緩衝液（PB）2 ml中に可溶性カップ-エラスチンもしくはカップ-エラスチン粉末200 mg（1 mMの PO_4 、150 mMのNaCl、2 mMの Ca^{2+} 、1 mMの Mg^{2+} 、pH 7.4）を溶解した。

【0080】

P：B 1 ml中にクリオグロブリン160 mg（37）

PB 0.6 ml中にコラーゲン2 mg（60、37）

200 μlチオ尿素（0.5 mg/ml）

200 μlアプロチニン（5単位）

上記の溶液0.6 mlを試験管に入れ、トロンピン溶液50 μlを添加した（~6単位）。この溶液を直ちに型に装填した。グルタルアルデヒドを用いてその結果生じたシートを2分間架橋させた。

【0081】

結果：上述のようにして調製されたシートはわずかに黄味を帯び不透明であった。グルタルアルデヒド固定シートは、固定していないシートに比べて伸縮性が小さく、容易に裂けた。グルタルアルデヒド固定シートを電子顕微鏡により観察した。これらのシートは100xおよび1000xでは平滑な凝集性の表面外観を有していた。

【0082】

[実施例2] エラスチン含有生体材料シートの組織溶接

前溶接：1 mg/mlのICG溶液を、外膜を注意深く切り取り滅菌した0.9% NaCl溶液中で洗浄し1 cm²角に切片化した新鮮ブタ大動脈に塗布した。1 mg/mlのICG溶液を最低3分間大動脈の内腔側に塗布し、拭き取った（ICGはシグマ社から入手したもので90%染料および10%ヨウ化ナトリウムを含有していた。（7.25 x 10⁻⁶ M溶液を用いて780 nmで測定した吸光係数は175, 000 M⁻¹ cm⁻¹であった。最高吸光度はICGが血清タンパク質に結合すると805 nmへ変動する（Land sman et al., J. Appl. Physiol. 40(1976)））。ICGをドーピングしたフィブリノーゲン約40 mg/mlおよびフィブロンectin 10 mg/mlを含有する少量のクリオグロブリンもまた塗布し、生体材料をその上に置いた。2種の材料を2枚のスライドガラスの間に置いた。これを0.9%含塩溶液中に浸漬した。

【0083】

10

20

30

40

50

溶接：実施例1と同様に作製した生体材料のシートをpH7.4のリン酸緩衝液中で平衡させた。そして、ヒ化アルミニウムガリウムダイオードレーザーを用いてICG染色ブタ大動脈に溶接した。最高出力は808で±1.5nmであった。ポリエチレン被覆材料を用いてこのレーザーを1μm石英ファイバと連結させた。レーザーエネルギーは集束レンズを用いて視準し、石英ファイバと連結させた。ファイバの遠位端のスポットサイズは集束レンズとファイバの近位端との距離を調整することによって1~4mmまで変化させることができる。

【0084】

レーザーは連続的に作動し、CW、ファイバの遠位端で測定した出力は1.5Wであった。石英ファイバはスライド、生体材料、大動脈の真上に配置した。溶接前に、レーザーのスポットサイズを測定した。溶接は含塩水下で0.85Wの照射では明らかに発生するが、1.32Wでは発生しない。溶接するために十分な時間は20秒であり、それを40秒にすると生体材料は褐色に変色し、また炭化が起こった。

【0085】

[実施例3] 動脈蒸解物からのエラスチン含有生体材料の調製

長さ4cmの新鮮なブタ頸動脈をきれいに切除し、0.9%含塩水を2回交換して一晚洗浄した。血管をその後0.5MのNaOH中に入れ、120分間超音波処理を行った(Crissman, R.(1987)の修正方法)(Crissman, Rogert S. 鼎omparison of Two Digestive techniques for Preparation of Vascular Elastic Networks for SEM Observation (SEM観察のための血管弾性網状組織の調製に関する2種の蒸解法の比較)", Journal of Electron Microscopy Techniques 6:335-348(1987))。蒸解させた血管をその後蒸留水中で洗浄し、225°Fで30分間オートクレーブにかけた。蒸解させた血管は真珠光沢の白色半透明の外観をしており、水から取り出すと直ぐに崩壊することからコラーゲンおよびその他の構造支持タンパク質の欠如が明らかになった。

【0086】

動脈蒸解物のブタ大動脈への溶接は下記の方法により行った。新鮮ブタ大動脈に5分間をかけて5mg/mlのICGをコーティングした。過剰のICG溶液は拭い去った。NaOH超音波処理により蒸解した頸動脈エラスチンの1×1cmの切片を新たに染色した大動脈の上に置いた。パルス・ヒ化アルミニウムガリウムダイオードレーザーのアレイ(スター・メディカル・テクノロジーズ社)を使用してこれらの切片を溶接した。790~810nmの光線での5ミリ秒パルスを2ジュールで放射させ、カバーガラスに被覆されたエラスチン蒸解物上に均一な4×4mmのビームを作り出すコンデンサレンズを用いて組織に照射した。10パルスまで良好な溶接が達成された。ブタ大動脈へ溶接されたエラスチン蒸解物の光線顕微鏡写真は図6に示す。

【0087】

[実施例4] エラスチン含有生体材料の調製およびブタ大動脈への融合

材料：40μmスクリーンを用いてウシ頂部靭帯由来エラスチン粉末(シグマ社、セントルイス、ミズーリ州)をふるいにかけて、リン酸緩衝液を用いて膨潤させた。その後エラスチン断片をリン酸塩緩衝液に溶解させたフィブリノーゲン67mg(シグマ社)、2mlの酸可溶性I型コラーゲン、チオ尿素2.8mg、2mMのCa²⁺、1mMのMg²⁺および75単位のトロンピンと反応させ、型に注入して77°Cに加熱した。この生体材料からなる厚さ1mmのシートおよびチューブを取り出して後に使用するために33%エタノール中で保存した。

【0088】

インドシアニングリーン染料を脱イオン水に溶解させて1%溶液とし、これを新鮮ブタ大動脈の内腔表面に塗布した。染料を5分間そのままにし、残った染料を拭い去った。このエラスチン生体材料をICGで染色した大動脈の上におき、カバーガラスで覆った。800nm、5msパルスで光線を放射するヒ化ガリウムダイオードレーザーのアレイの出力を収集するコンデンサレンズを用いてレーザーエネルギーを照射した。6mm²のスポットを1~10パルスに対して2.89ジュールで照射したところ適正な溶接が生じた。その

後サンプルを二分し、顕微鏡観察のためにホルマリン中で固定した。図5はエラスチン染料を用いて染色された溶接状態の光線顕微鏡写真である。生体材料もしくは大動脈に検出し得る熱傷害もしくはその他の損傷のない、エラスチン生体材料のブタ大動脈への優れた溶接が認められた。

【0089】

[実施例5] エラスチン含有生体材料の調製およびブタ大動脈への融合

材料：ウシ頂部靭帯由来エラスチン、ブタ血漿由来のフィブリノーゲンおよびラット尾腱由来の酸可溶性I型コラーゲンはシグマ・ケミカル社（セントルイス、ミズーリ州）から入手した。エラスチンは50で2.5時間、1MのKOH/80%エタノール溶液中に溶解させた（Hornbreck）。凍結沈澱物をPoolとShannonの方法（Pool and Shannon）によりブタ血漿から入手した。

10

【0090】

新鮮ブタ大動脈はカールトンパッケージング社（カールトン、オレゴン州）から入手し、使用時に解凍するまで-20で保存した。

【0091】

エラスチン-フィブリン生体材料はRabaud（Rabaud）によって開発された方法と同様にして調製した。溶解性エラスチンと凍結沈澱物から作られる移植片は、緩衝液2mlに溶解させた可溶性エラスチン200mg、緩衝液1mlに溶解させた凍結乾燥させた凍結沈澱物160mg、緩衝液0.6mlに溶解させたI型コラーゲン2mg、およびチオ尿素溶液0.2ml（0.5mg/ml H₂O）を完全に混合しながら逐次添加することによって調製した。6単位のトロンピンをこの混合物0.5mlに対して添加し、1mlシリンジ中で完全に混合し、4cm²ガラス型内に射出した。この型を37で30分間定温放置し、25mradのofg照射（コバルト源）を行った。生体材料は33%エタノール中に4で保存した。使用する前に、生体材料は含塩水を用いて数回洗浄した。

20

【0092】

移植片また不溶性エラスチンおよびフィブリノーゲンをを用いて作製した。シグマ社から入手した凍結乾燥エラスチンを使用前にU.S.No.4000メッシュのふるい（タイラー社）を通過させた。40μm以下の粒子だけを使用した。ふるいにかけたエラスチン28mgを過剰のリン酸緩衝液中で一晩膨潤させ、洗浄した。この混合物を1000rpmで10分間遠心し、余分な緩衝液を廃棄した。膨潤したエラスチンをリン酸緩衝液2ml中に懸濁させた。この懸濁液に、緩衝液1mlに溶解させた凍結乾燥フィブリノーゲン67mg、緩衝液0.6mlに溶解させたI型コラーゲン2mgおよびチオ尿素溶液0.2ml（0.5mg/ml H₂O）を逐次添加した。

30

【0093】

最後に、33単位のトロンピンを添加し、その混合物を完全に渦巻攪拌し、迅速に3cm×7cmの型に注入した。この型を37で30分間定温放置した。生体材料は33%エタノール中に4で保存した。使用する前に、生体材料は含塩水を用いて数回洗浄した。

【0094】

可溶性エラスチン凍結沈澱物の移植片を808nmの連続波を光学放射するヒ化アルミニウムガリウムダイオードアレイレーザを用いてブタ大動脈に融合させた。新鮮ブタ大動脈を0.9%NaCl中で洗浄して2cm²の薄片を切り取った。1もしくは5mg/mlのインドシアニングリーン（シグマ社）水溶液をパスツールピペットから大動脈に塗布し、5分間放置し、その後吸い取った。この組織をその後15分間0.9%含塩水中で平衡化させ、結合していない染料を取り除いた。その後この生体材料を大動脈の内腔面に接触させた。レーザビームを図1に示されているようにカバーガラスを通して生体材料の表面で1μm融解シリカファイバ（ポリマイクロテクノロジーズ・フェニックス、アリゾナ州）によって照射した。レーザビームのスポットサイズは距離によって、1~4mmの間で変動した。ファイバチップから測定したレーザ出力は1.5Wであり、曝露時間は5~4秒の間で変動した。

40

50

【0095】

不溶性エラスチン-フィブリノーゲンの移植片は、790～810nmパルスの光学放射をするヒ化アルミニウムガリウムダイオードアレイレーザー（スター・メディカル・テクノロジーズ社）を用いてブタ大動脈へ融合させた。解凍したブタ大動脈を調製し、新鮮大動脈を上述したように5mg/mlのICG水溶液を用いて染色した。

【0096】

生体材料を大動脈の染色された内腔表面に接触させた後、レーザーエネルギーをカバークラスの反対側に位置する銅をコーティングしたコンデンサレンズによって生体材料に向けた。レーザー出力2Jでパルス時間5m秒に設定した。

【0097】

[実施例6]

ウシ頂部靭帯由来エラスチン、ブタ血漿由来のフィブリノーゲン、およびラット尾腱由来酸可溶性I型コラーゲンをシグマ社（セントルイス、ミズーリ州）から入手した。

【0098】

インドシアニングリーン1mgを24%ヒト血清アルブミン溶液1mlに溶解させた。フィブリノーゲン67mgを37℃でリン酸緩衝液1mlに溶解させた。混合するに先立ち16.6単位のトロンピンをこのインドシアニンググリーン溶液に添加した。その混合物を4℃に冷却した。2つの混合物を迅速に混合し、3×7cmの型に注入または流し込み、37℃で30分間定温放置した。

【0099】

シグマ社から入手した凍結乾燥エラスチンを使用前にU.S.No.400メッシュのふるい（タイラー社）を通過させた。40μm以下の粒子だけを使用した。ふるいにかけてエラスチン210mgを過量のリン酸緩衝液中で一晩膨潤させて洗浄した。その混合液を1000rpmで10分間、遠心し過剰な緩衝液を廃棄した。膨潤したエラスチンをリン酸緩衝液1.5ml中に懸濁させた。この懸濁液に、0.75mlの緩衝液に溶解させた凍結乾燥フィブリノーゲン67mg、0.45mlの緩衝液に溶解させたI型コラーゲン2mgおよびチオ尿素溶液0.15ml（0.5mg/ml H₂O）を逐次添加した。最後に、26単位のトロンピンを添加し、その混合物を完全に渦巻攪拌し、3×7cmの型に入れたインドシアニンググリーンを用いてドーピングしたフィブリン基質上に迅速に注ぎ入れた。この型を再び37℃で30分間定温放置した。型から取り出すと、2つの層は分離不能で、これにより単一の移植片が得られた。

【0100】

上記した全ての文献は、それらを引用することによってそれらの全体が本件出願に組み込まれたものとなる。

【0101】

当業者は、ここに開示されていることを読むことによって、本発明の真の範囲から逸脱することなく形態や細部における種々の変更が可能であることを理解するであろう。

【図面の簡単な説明】

【0102】

【図1】生体材料および露出された本来の組織へレーザーエネルギー照射の様子を示す図である。

【図2】動脈内へのエラスチン生体材料の配置状態を示す図である。

【図3】腸管移植片としての生体材料の使用を示す図である。

【図4】連続発振ダイオードレーザーを用いてブタ大動脈へ融合させたエラスチン含有生体材料（Rabaud et al.の方法に従ってエラスチン、フィブリノーゲンおよびトロンピンを用いて調製）の走査型電子顕微鏡写真である。

【図5】パルスダイオードレーザーを用いてブタ大動脈へ融合させたエラスチン含有生体材料の光線顕微鏡写真である。図中E = エラスチン生体材料を示し；A = 大動脈を示す。

【図6】ブタ頸動脈へ溶接した動脈蒸解物に由来するエラスチン含有生体材料の光線顕微鏡写真である。図中E = エラスチン生体材料を示し、A = 大動脈を示す。

10

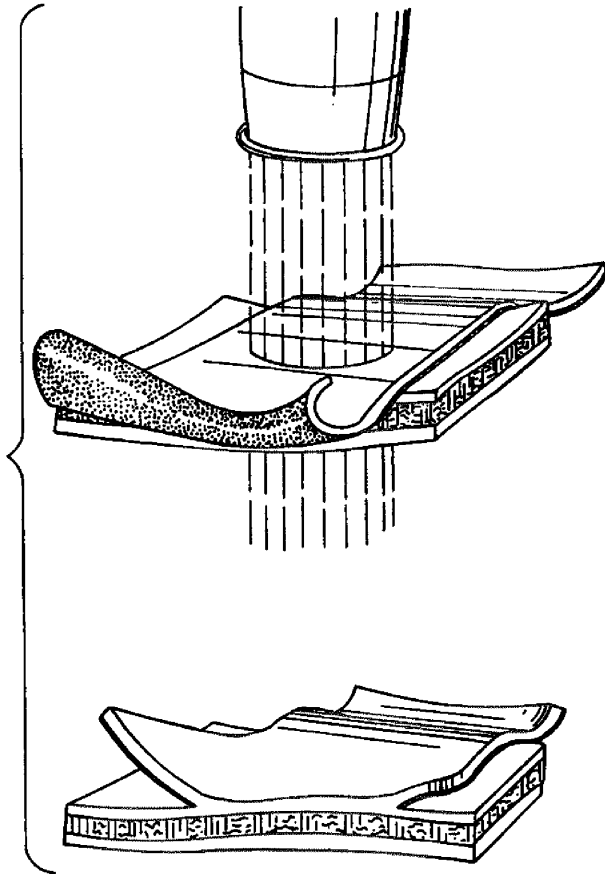
20

30

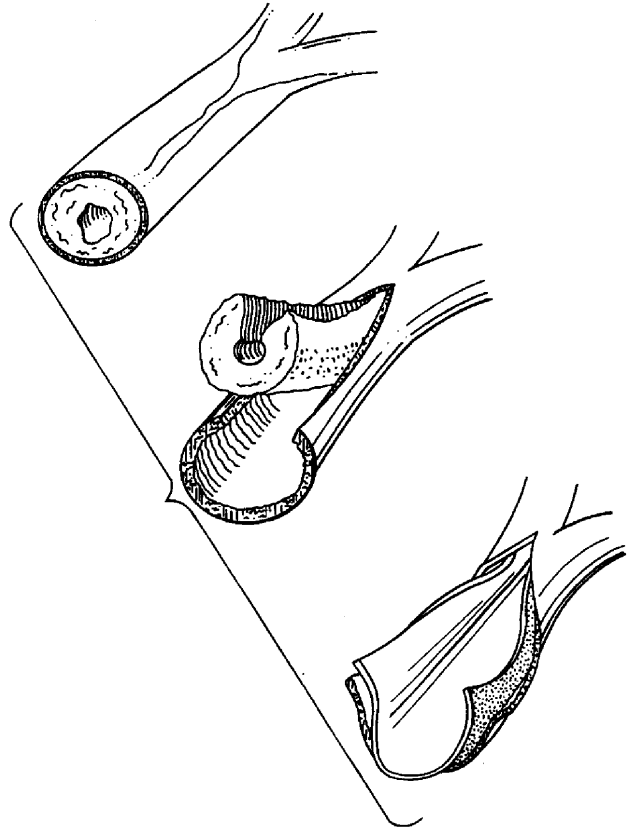
40

50

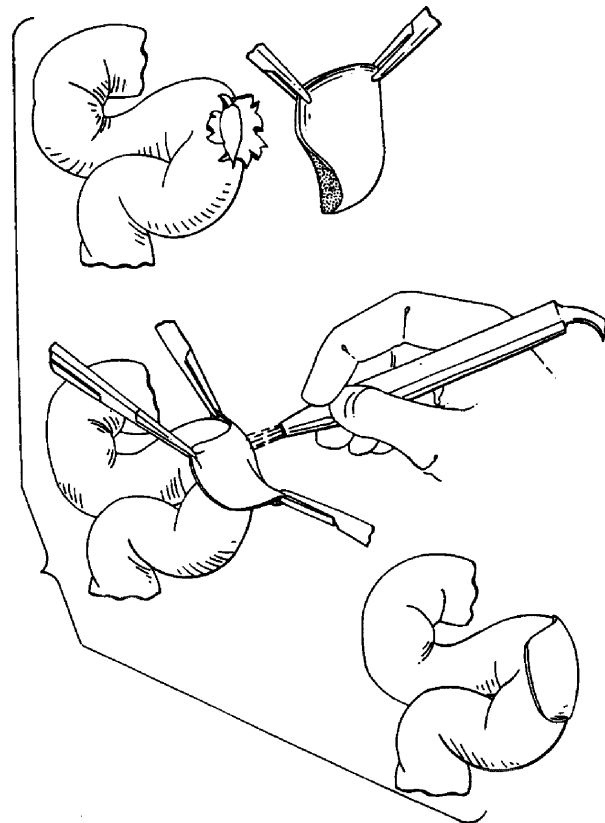
【 図 1 】



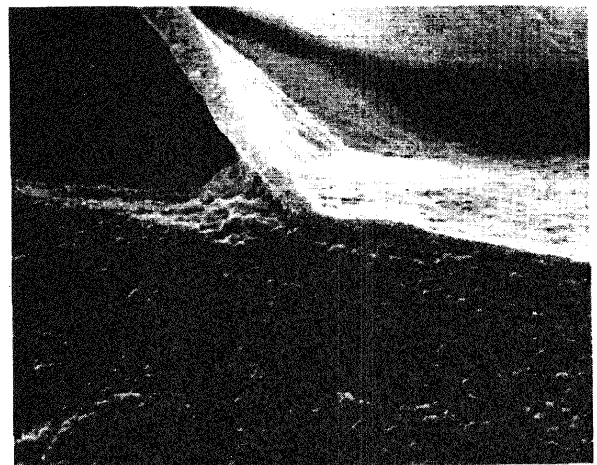
【 図 2 】



【 図 3 】



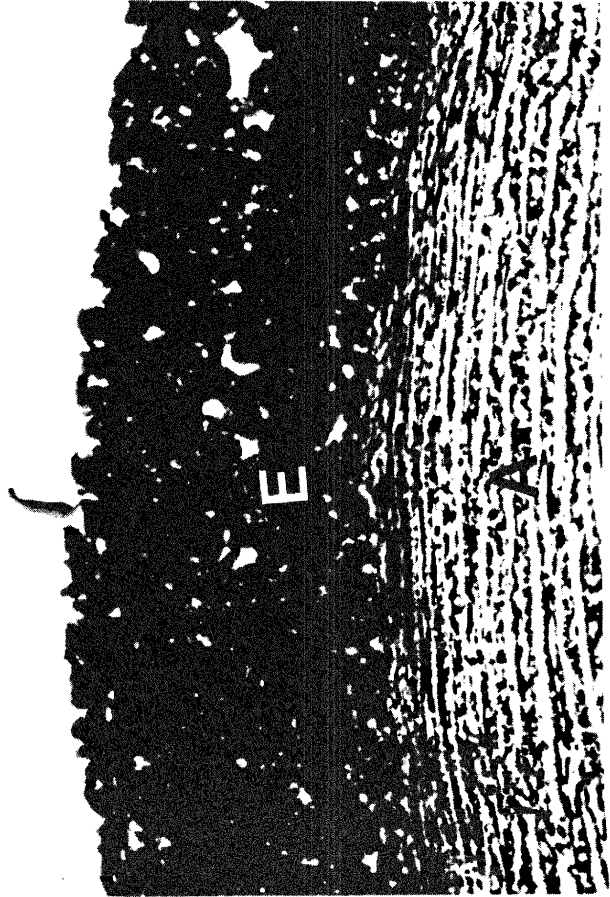
【 図 4 】



【 図 5 】



【 図 6 】



フロントページの続き

(71)出願人 505253846

グレゴリー ケントン ダブリュ.

アメリカ合衆国 97201 オレゴン州、 ポートランド ワパト アベニュー エス.ダブリ
ュ.3969

(74)代理人 100091627

弁理士 朝比 一夫

(74)代理人 100091292

弁理士 増田 達哉

(72)発明者 グレゴリー ケントン ダブリュ.

アメリカ合衆国 97201 オレゴン州、 ポートランド ワパト アベニュー エス.ダブリ
ュ.3969

(72)発明者 グランケマイヤー ジョン

アメリカ合衆国 98103 ワシントン州、 シアトル サニーサイド アベニュー エヌ.6
537

Fターム(参考) 4C081 AA12 AA14 AB19 AC09 CD11 EA14

4C167 AA41 AA50 BB06 CC08 CC26 GG42 GG43