

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第5053470号  
(P5053470)

(45) 発行日 平成24年10月17日(2012.10.17)

(24) 登録日 平成24年8月3日(2012.8.3)

(51) Int.Cl.	F I
A 6 1 L 27/00 (2006.01)	A 6 1 L 27/00 V
A 6 1 K 35/38 (2006.01)	A 6 1 K 35/38
C 1 2 N 5/00 (2006.01)	C 1 2 N 5/00

請求項の数 11 (全 16 頁)

(21) 出願番号	特願平10-517831	(73) 特許権者	509097541
(86) (22) 出願日	平成9年8月22日(1997.8.22)		クック バイオテック インコーポレイティド
(65) 公表番号	特表2002-508673 (P2002-508673A)		アメリカ合衆国、47906 インディアナ ウェスト ラファイエット イノベーション プレイス 1425
(43) 公表日	平成14年3月19日(2002.3.19)	(74) 代理人	100083895
(86) 国際出願番号	PCT/US1997/014855		弁理士 伊藤 茂
(87) 国際公開番号	W01998/022158	(74) 代理人	100081053
(87) 国際公開日	平成10年5月28日(1998.5.28)		弁理士 三俣 弘文
審査請求日	平成16年8月16日(2004.8.16)		
審判番号	不服2009-7275 (P2009-7275/J1)		
審判請求日	平成21年4月6日(2009.4.6)		
(31) 優先権主張番号	60/024,542		
(32) 優先日	平成8年8月23日(1996.8.23)		
(33) 優先権主張国	米国 (US)		
(31) 優先権主張番号	60/024,693		
(32) 優先日	平成8年9月6日(1996.9.6)		
(33) 優先権主張国	米国 (US)		

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 グラフト・プロテアーゼとその材料及び方法

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

粘膜下組織供給源体から取出されたコラーゲンを基体とする純粋な基質構成体を具備し、前記純粋の基質構成体が、それ自体を生体に適合可能にする汚染菌濃度を有し、前記純粋の基質構成体が、脈管形成を促進するような生来の生化学特性を維持し、前記純粋の基質構成体が、内毒素を有さないか、グラム当たり5内毒素単位未満の内毒素濃度しか有さないことを特徴とするグラフト・プロテアーゼ。

【請求項2】

前記内毒素濃度が、グラム当たり0.1内毒素単位未満であることを特徴とする請求の範囲1に記載のグラフト・プロテアーゼ。

【請求項3】

粘膜下組織供給源体から取出された純粋なコラーゲンを基体とする基質構成体を具備し、前記純粋の基質構成体が、脈管形成を促進するような生来の生化学特性を維持し、前記純粋の基質構成体が、内毒素を有さないか、グラム当たり5内毒素単位未満の内毒素濃度しか有さないことを特徴とするグラフト・プロテアーゼ。

【請求項4】

粘膜下組織供給源体から取出された純粋なコラーゲンを基体とする基質構成体を具備し、前記純粋の基質構成体の核酸含有率は、ミリグラム当たり2マイクログラム未満であり、前記純粋の基質構成体が、脈管形成を促進するような生来の生化学特性を維持し、前記純粋の基質構成体が、内毒素を有さないか、グラム当たり5内毒素単位未満の内毒素

濃度しか有さないことを特徴とするグラフト・プロテアーゼ。

【請求項 5】

粘膜下組織供給源体からコラーゲンを基体とする基質を得る方法であって、

(A) 前記粘膜下組織供給源体を、有機ペルオキシ化合物または過酸化水素である消毒剤で処理して、消毒された粘膜下組織供給源体を供する手順と、

(B) 前記消毒された粘膜下組織供給源体から、前記コラーゲンを基体とする基質を取出す手順とを有し、

前記コラーゲンを基体とする基質が、脈管形成を促進するような生来の生化学特性を維持し、

前記コラーゲンを基体とする基質が、内毒素を有さないか、グラム当たり 5 内毒素単位未満の内毒素濃度しか有さないことを特徴とする方法。

10

【請求項 6】

該消毒剤が過酢酸である、請求項 5 記載の方法。

【請求項 7】

粘膜下組織供給源体からコラーゲンを基体とする基質を得る方法であって、

(A) 有機ペルオキシ化合物または過酸化水素である消毒剤で処理されている粘膜下組織供給源体を供する手順と、

(B) 前記粘膜下組織供給源体から前記コラーゲンを基体とする基質を取出す手順とを有し、

前記コラーゲンを基体とする基質が、脈管形成を促進するような生来の生化学特性を維持し、

20

前記コラーゲンを基体とする基質が、グラム当たり 5 内毒素単位未満の内毒素濃度しか有さないことを特徴とする方法。

【請求項 8】

該消毒剤が過酢酸である、請求項 7 記載の方法。

【請求項 9】

初めにコラーゲンを含有する構成体及び他の組織を含有する組織供給源体から取出されたコラーゲンを含有する構成体を具備し、

前記コラーゲンを含有する構成体が、脈管形成を促進するような生来の生化学特性を維持し、

30

前記コラーゲンを含有する構成体は、内毒素を有さないか、グラム当たり 5 内毒素単位以下の内毒素濃度しか有さないことを特徴とする構成体。

【請求項 10】

前記内毒素濃度が、グラム当たり 0.1 内毒素単位未満であることを特徴とする請求の範囲 9 に記載の構成体。

【請求項 11】

哺乳類動物の組織供給源体から得られるコラーゲン含有基質であって、

前記基質が、哺乳類動物粘膜下組織及び前記哺乳類動物の組織供給源体からの残留汚染菌を有し、

前記基質が、前記哺乳類動物の組織を消毒する手順と、それに続き前記消毒された哺乳類動物の組織から前記基質を取出す手順とを具備する処理によって、得られ、

40

前記基質が、脈管形成を促進するような生来の生化学特性を維持し、

前記基質が、内毒素を有さないか、グラム当たり 5 内毒素単位未満の内毒素濃度しか有さないことを特徴とするコラーゲン含有基質。

【発明の詳細な説明】

関連出願

本発明は、それぞれ 1996 年 8 月 23 日及び 1996 年 9 月 6 日に出願された米国特許出願第 60/024,542 号及び第 60/024,693 号に基づく優先権を請求する出願であり、それら各米国出願の全体がここに組み入れられる。

技術分野

50

本発明は一般的に医療用構造体に関し、特にグラフト・プロテゼとその材料及び方法に関する。

#### 従来技術

純粋な形態を持ちかつコラーゲンを基体とする材料から取出された移植組織がこれまでも生成されており、刊行物にも開示されている。高引張り強度の粘着フィルムがコラーゲン分子或いはコラーゲンを基体とする材料を使用して生成されている。しかしアルデヒドが一般的にコラーゲン分子を架橋し、高引張り強度を有する膜を生成するために使用されている。これらの種類の材料を有することにより、アルデヒドはその膜から、例えば加水分解して、採取することが可能である。そのような残留分は細胞毒性が有るから、これらの膜は貧弱な移植組織である。

10

他にも、コラーゲン分子が架橋されたアルデヒドに関連する問題を回避しコラーゲンを基体とする移植組織を生成する技術が開発されている。そのような1つの技術が米国特許第5,141,747号に例示されており、この特許では、コラーゲン分子が架橋、即ちそれらのリン・エプシロン・アミノ基で結合され、続いて、結合され且つ好ましくは改変されたコラーゲン分子が変性される。そのようなコラーゲン材料の開示された用途は鼓膜治療用である。そのような膜は良好な物理特性を示し、且つ、次の処理によって滅菌消毒されることが開示されているが、それらは細胞増殖を改造したり生成することは出来ない。即ち、一般に、再生長を促進し且つ損傷又は罹患した組織構成体を治すことは不可能である。

一般に外科技術の研究者は多年に渡って損傷又は罹患した組織構成体例えば血管や筋、靭帯、腱等を置換或いは治療するための移植組織及びグラフトとして使用するための新規な技術及び材料を開発する事に携わっている。今日では、例えば整形外科医において断裂した十字形靭帯に対する置換体として使用するために、自原的又は同種異系の起始部の膝蓋腱を採取することは珍しいことではない。そのような技術に関する外科的手法は公知である。更に、外科医にとって、生理的構成体を再構成或いは置換するためにプラスチック材料、金属材料及びセラミック材料或いはそれらの何れかから形成された移植可能なプロテゼを使用することは常識になっている。それらの使用が広範になっているにも拘わらず、まだ外科移植されたプロテゼはthe患者に多くの付随して起こるリスクを与えている。

20

研究者例えばヘルニヤ損傷及び関節脱臼損傷に関与する研究者はまた、そのような機能組織構成体及び他の結合組織の双方或いは一方として満足に働く高分子即ちプラスチック材料を開発することを企てている。長期間の結合組織置換に適切である丈夫で永続性のあるプラスチック材料を供することは困難であることが見出されている。プラスチック材料を包囲する組織は細菌で冒される可能性が有り、そのような感染症を治療する難しさが移植組織即ちプロテゼの機能不全につながることが多い。

30

上述の如く、種々のコラーゲンを基体とする材料もまた上記組織置換体に使用されて来ているが、しかしこれらの材料は何れも必要な引張り強度を示さず、或いはまた感染症及び他の免疫反応や被包に問題が有り、或いはそれらに抗生物質や増殖因子等が装荷されている可能性が有るときに他の問題が有った。例えば、米国特許第4,956,178号は哺乳類動物の腸管から得られる粘膜下組織コラーゲン基質を開示しているが、しかしコラーゲン基質に抗生物質が装荷されることが開示されている。関連特許の米国特許第5,372,821号には、粘膜下組織コラーゲン基質が従来技術、例えばアルデヒドなめし処理や、プロピレン・オキシド、ガンマ放射線及び過酢酸によって滅菌消毒することが可能であることが開示されている。滅菌処置に先立って先ず粘膜下組織層が周囲の組織から剥離されることを除き、具体的な処理手順は何も開示されていない。

40

従って、改良された純粋の形態のコラーゲンを基体とする基質をその組織供給源体から採取する必要がある。また組織供給源体からのそのような基質の容易な採取を高める処理を行い、そのような改良された純粋な生成物を生じる必要がある。本発明はそのようなニーズに向けられている。

#### 発明の概要

50

本発明の1つの好ましい実施例によれば、粘膜下組織供給源体から取出された純粋なコラーゲンを基体とする基質構成体で純粋の構成体を生体に適合可能に為す汚染菌濃度を有するものを包含するグラフト・プロテアーゼが供される。

本発明の他の好ましい実施例によれば、粘膜下組織供給源体から取出された純粋なコラーゲンを基体とする基質構成体で純粋の構成体がグラム当たり12内毒素単位未満の内毒素濃度を有するものを包含するグラフト・プロテアーゼが供される。

本発明の他の好ましい実施例によれば、粘膜下組織供給源体から取出された純粋なコラーゲンを基体とする基質構成体で純粋の構成体がミリグラム当たり2マイクログラム未満の核酸含有率を有するものを包含するグラフト・プロテアーゼが供される。

本発明の他の好ましい実施例によれば、粘膜下組織供給源体から取出された純粋なコラーゲンを基体とする基質構成体で純粋の構成体がグラム当たり500溶菌斑形成単位未満のウイルス濃度を有するものを包含するグラフト・プロテアーゼが供される。

本発明はまた、粘膜下組織供給源体から取出された純粋なコラーゲンを基体とする基質構成体で純粋の構成体がキログラム当たり100,000PPM未満の処理剤濃度を有するものを包含するグラフト・プロテアーゼを供する。

本発明の更に他の実施例は粘膜下組織供給源体からコラーゲンを基体とする基質を採取するための方法に関する。本方法は、粘膜下組織供給源体を消毒剤で処理し、消毒された粘膜下組織供給源体を供する手順及び消毒された粘膜下組織供給源体からコラーゲンを基体とする基質を取出す手順を包含する。

本発明の他の好ましい実施例によれば、粘膜下組織供給源体からコラーゲンを基体とする基質を採取するための方法は、消毒剤で処理された粘膜下組織供給源体を供する手順及び粘膜下組織供給源体からコラーゲンを基体とする基質を取出す手順を包含する。

本発明はまた、最初にその構成体及び他の組織を含有する組織供給源体から取出されたコラーゲンを含有する構成体でそれがグラム当たり12内毒素単位以下の内毒素濃度を有するものを包含する構成体に関する。

本発明によれば、また哺乳類動物の組織供給源体から採取された、哺乳類動物粘膜下組織を包含し、且つ哺乳類動物の組織供給源体を消毒する手順及びその結果消毒された哺乳類動物の組織供給源体から続いてその構成体を取出す手順を包含する処理によって採取可能な純粋のコラーゲン含有基質が供される。

好適な態様では、本発明は動物の消化管或いは呼吸管、尿管、生殖腺から取出された純粋の形態の粘膜下組織コラーゲン基質で、それらが実質的に零か或いは基本的に発熱物質を含まないバイオバードン・レベルを有するものを供する。好適なコラーゲン基質は人又は動物の患者の体内に細胞毒性反応や感染、移植組織の拒絶反応、或いは多数の患者に他の何らかの有害な作用を引き起こすこと無く、移植することが可能である。本発明の幾つかの態様による好適な移植可能なコラーゲン基体は主として粘膜下組織を含有するが、この例のコラーゲン基質はまたそれが取出された元の供給源体に依存する一部の層の薄層筋粘膜、筋粘膜、層組織密集層及び/或いは他のそのような材料を含有することが出来る。

更に本発明によれば、動物或いは人の消化管や呼吸管、尿管或いは生殖腺から取出される浄化され剥離された粘膜下組織コラーゲン基質が供され、この純粋の粘膜下組織コラーゲン基質は剥離された粘膜下組織コラーゲン基質を採取するために消毒された粘膜下組織供給源体を剥離することによって生成される。例えば、動物の消化管或いは呼吸管、尿管、生殖腺から採取された、処理されておらず、剥離もされていない粘膜下組織供給源体を処理する手順及びそれに続いて粘膜下組織コラーゲン基質をその付着組織から剥離する手順を具備する処理によって有益な基質を得ることが出来る。好適なコラーゲン基質は、実質的に零のバイオバードン・レベルを有し、且つ人又は動物の患者の体内に細胞毒性反応や感染、移植組織の拒絶反応、或いは多数の患者に他の何らかの有害な作用を引き起こすこと無く移植することが可能である。

更に本発明によれば、消毒された粘膜下組織供給源体を剥離し、剥離された粘膜下組織コラーゲン基質を得る手順を具備し、実質的に無菌状態の極めて純粋な剥離された粘膜下組織コラーゲン基質を得る方法が供される。好適な方法は動物或いは人の消化管や呼吸管、

10

20

30

40

50

尿管或いは生殖腺から採取された、剥離されていない粘膜下組織供給源体を消毒剤で処理する手順と、それに続き粘膜下組織をその粘膜下組織に付着したその粘膜下組織の他の供給源体組織から剥離する手順とを具備する。

更に本発明によれば、動物の消化管や呼吸管、尿管或いは生殖腺から取出された、実質的に零のバイオバードンを有し、実質的に表面屑を含有せず、例えば筋組織や、粘膜層、脂質或いは細胞屑を実質的に包含しない、極めて純粋な粘膜下組織コラーゲン基質が供される。好適なコラーゲン基質は、人又は動物の患者の体内に細胞毒性反応や感染、移植組織の拒絶反応、或いは多数の患者に他の何らかの有害な作用を引き起こすこと無く移植することが可能である。

更に本発明によれば、動物の消化管や呼吸管、尿管或いは生殖腺から取出され、粘膜下組織が増殖因子を含有する実質的に無菌状態で剥離され、剥離された粘膜下組織供給源体を溶剤、例えば水でリンスし、続いて消毒剤、好ましくは約 1.5 ~ 約 10 の pH の過酸で処置し、更に続いて粘膜下組織を付着組織から剥離することによって、極めて純粋な粘膜下組織が供される。その過酸は 7 以上の pH で緩衝される。そのようにして生成されたコラーゲン基質は実質的に高含有量の 1 以上の増殖因子を有することが望ましい。

更に本発明によれば、基本的に発熱物質を含まない粘膜下組織コラーゲン基質を包含するグラフト組織構成体が供される。更にそのような構成体は、グラム当たり約 1 内毒素単位 (EU/g) 以下の発熱物質含有率を有する粘膜下組織コラーゲン基質を包含することが好ましい。

更に本発明によれば、上述のような極めて純粋な粘膜下組織は、人又は動物の患者の体内への移植に際して活発な生体内血管形成を実証する。

本発明は純粋の、移植可能な組織構成体、そのような純粋の、移植可能な組織構成体を生成するための処理、及び損傷又は罹患した組織構成体の再生長及び治療を促進するそれらの用途に関する。特に、本発明は移植可能組織として使用するのに適する純粋の形態の粘膜下組織コラーゲン基質、及びそのような純粋の形態のこのコラーゲンを基体とする移植可能組織を生成する方法に関する。

本発明のこれらの態様及び他の態様は、当業技術者には以下に述べる記載を検討することによって明らかになる。

#### 【図面の簡単な説明】

図 1 は本発明による管状グラフト・プロテアーゼ組織の斜視図である。

#### 詳細な説明

本発明の原理の理解を容易にするために、本発明の若干の好適な実施例に言及し、且つ、特定の専門語が本発明を説明するために使用される。それにも拘わらず、本発明の範囲を限定する意図で無く、更にここに述べられている本発明が考察される原理の変更、改良及び応用が、本発明が関わる当業技術者に普通に発想されるものであることが理解されるであろう。

本明細書の説明では、多数の専門用語が使用される。本明細書及び請求の範囲の明確且つ首尾一貫した理解を供するために、次の定義が与えられる。

バイオバードン：生きている微生物の数を言い、これはコロニー形成単位 (CFU) で記録され、所定の量の材料で確認される。例証とする微生物には細菌、真菌及びそれらの胚種が包含される。

消毒：或る材料のバイオバードンの低減を言う。

無菌：或る材料の所定の断片に 1 CFU の生きている微生物を有する可能性が 100 万分の 1 以下であるようなバイオバードンを有する状態を言う。

発熱物質：宿主細胞中に導入された後、発熱反応を引き起こす物質を言う。

内毒素：グラム陰性細菌の細胞壁の一部である特定の発熱物質を言う。内毒素は細菌及び汚染した材料から煩雑に発散される。

浄化 (純粋化)：或る材料を処理し、その材料に伴って発生する 1 以上の汚染菌、例えばそれと共にその材料が事実上発生させる汚染菌及び材料上に発生する微生物の一方又は双方の成分を除去することを言う。例えば、汚染菌は、毒性や感染性、発熱性、刺激可能性

10

20

30

40

50

、反応性、溶血活力、発癌性及び免疫性の何れかを引き起こすことが知られているそれらのものであることができる。

生体適合性：或る材料が " International Standards Organization ( ISO ) Standard No. 10993 " や " U.S. Pharmacopeia ( USP ) 23, the U.S. Food and Drug Administration ( FDA ) blue book memorandum No. G95-1, entitled " Use of International Standard ISO-10993, Biological Evaluation of Medical Devices Part-1: Evaluation and Testing " の何れか又は双方に記載されている生体適合性検査に合格するための能力を言う。代表的には、これらの検査は或る材料の毒性や感染性、発熱性、刺激可能性、反応性、溶血活力、発癌性及び免疫性又は何れかに関する効力検定を行う。生体に適合可能な構成体又は材料は大多数の患者に採用されたときには逆の反応を起こさない。更に、生体適合性はプリオンや界面活性剤、オリゴヌクレオチドのような汚染菌及びその他の生体適合性発効剤又は汚染菌によって影響され得ることが考察される。

10

汚染物質：或る材料に或いはその内部に付着した望ましくない物質を言う。これには、バイオバードンや内毒素、殺菌剤のような処理剤、血液、血液成分、ウイルス、DNA、RNA、胚種、不要な組織層の断片、細胞屑及び粘膜が含まれるが、これらに限定されるものではない。

粘膜下組織：動物の消化管、呼吸管、尿管及び生殖腺の殆どの部分で粘膜の下部に生じるコラーゲンを含有する結合組織層を言う。

上記で明らかな如く、本発明は一般的には純粹の、コラーゲンを基体とする基質構成体を包含するグラフト・プロテアーゼ及びその材料、並びにそれらを採用する方法及びそれらを使用する方法を供する。本発明の有益なグラフト・プロテアーゼは、例えば人或いは他の哺乳類動物の組織、例えば豚や牛又は羊の組織を包含する粘膜下組織供給源体から得られる。

20

動物の組織での場合のように、粘膜下組織は一般的には、人或いは動物が感染症又は病気を持たないことを前提として、その自然状態において無菌である。これは、粘膜下組織が動物の消化管、呼吸管、尿管及び生殖腺内の内部組織層であるから特にそうである。従って、一般的には粘膜下組織は細菌及び腸管の上皮のような他の細胞屑に曝されない。本発明の1つの特徴は、剥離の前に供給源体組織を粘膜下組織に対して消毒することにより、粘膜下組織層の無菌状態を、特にもし剥離処理が無菌状態の下で行われる場合には、維持若しくは実質的に維持することが出来ることを見出したことである。

30

特に、粘膜下組織供給源体の消毒に続いて、例えば被膜筋及び被膜粘膜から粘膜下組織を剥離し、粘膜下組織を包含する純粹の基質を採用することによって、粘膜下組織が細菌やその他の汚染菌に曝されるのを極小化することが見出された。その結果、そのことによって、必要に応じ、単離した粘膜下組織基質が消毒剤又は滅菌剤に曝されるのを極小化し、粘膜下組織の生来の生化学特性及び粘膜下組織の多くの有益な効果を実質的に維持することが可能になる。

本発明による粘膜下組織移植可能コラーゲン基質は、上述したように、動物の消化管や呼吸管、尿管或いは生殖腺から採取することが出来る。好ましくは、コラーゲンを基体とする、従って大部分がコラーゲンである粘膜下組織が哺乳類動物の消化管から取出され、とりわけ好ましくは、豚の腸管から取出される。最も好ましい無傷の小腸の供給源体はおおよそ450ポンド以上重い成熟した成体の豚から採取される。健康な、病気に罹っていない動物から採取された腸は、その腸の内腔内に含有されている大腸菌のような様々な微生物だけでなく、腸管内に血管及び血液供給源を含有する。従って、粘膜下組織を剥離する前に無傷の腸を消毒することにより、これらの汚染菌が実質的に除去され、現在存在する何らかの他の微生物有機物や発熱物質或いはその他の病原菌と同様に血液及び血液成分からも実質的に拘束されない好適な移植可能粘膜下組織が供される。実質的には、本発明が何らかの理論によって限定されることを意図するものではないことは言うまでもないが、この処置は粘膜下組織の生来の無菌状態を実質的に維持すると思われる。

40

また、本発明によるコラーゲン基質は該基質の生来の生化学特性及びその移植の有効性に悪影響を与える可能性が有る何らかの抗生物質や抗ウイルス性薬剤或いは抗菌型薬剤に実

50

質的に拘束されないことが望ましい。従来、そのような組織材料を処理する1つの方法に、例えば米国特許第4,956,178号に開示されているような、剥離された組織を生理食塩水中でリンスし、それを殺菌剤に浸す方法がある。そのような技術は本発明の分離された粘膜下組織で選択的に実施することが可能であるが、本発明による好ましい処理ではコラーゲン基質の生化学特性に悪影響を与えるだけでなく、必ずしも患者の組織中に導入することが出来ない殺菌剤等を使用することは回避している。

上述の如く、極めて純粋な形態の移植可能な粘膜下組織コラーゲン基質を、例えば粘膜下組織供給源体を剥離することにより、粘膜下組織層を包含する純粋のコラーゲン基質を取出す前に、先ず粘膜下組織供給源体を消毒することによって得ることが出来る。また、この処理によって、その結果得られた粘膜下組織層は、この粘膜下組織層からそこに付着した組織を取出すのが極めて容易であること及び独特の低汚染菌特性を包含する幾つかの処理上の利点及び改善された諸特性が得られる。

本発明の処理は、好ましくは、先ず粘膜下組織供給源体を溶剤、適切には水で1回以上リンスする手順を包含する。このリンスする手順に続き、消毒剤で処置される。この消毒剤は望ましくは酸化剤である。好適な消毒剤はペルオキシ化合物であり、中でも好ましくは有機ペルオキシ化合物であり、更に好ましくは過酸である。そのような消毒剤は望ましくは液体媒体中で、好ましくは約1.5~約10のpHを持つ溶液中で、最も好ましくは約2~約6のpHを持つ溶液中で使用される。本発明の方法では、消毒剤は一般的に特質の回復ここに記述されているような、好ましくは基本的に零のバイオバードンか或いは基本的に発熱物質に拘束されない状態を示す純粋の粘膜下組織基質を供する条件下で或る期間使用される。このことについては、本発明の望ましい処理には、少なくとも5分間、代表的には約5分~約40時間の範囲の期間、更に代表的には約0.5時間~約5時間の範囲の期間、組織供給源体を消毒剤を含有する液体媒体中に例えば投入或いはシャワーすることによって液浸する手順が包含される。

好適なペルオキシ消毒剤は過酸化水素である。過酸化水素の濃度は容積比で約0.05%~30%の範囲である。より好ましい過酸化水素の濃度は容積比で約1%~10%であり、最も好ましい濃度は容積比で約2%~5%である。その溶液は約5~9のpHに緩衝することが出来るが、より好ましいpHは、約6~7.5である。これらの濃度は水又は容積比が約2%~30%のアルコールの水溶液で希釈することが出来る。最も好ましいアルコールはエタノールである。その溶液温度は約15~50で変化する。より好ましい溶液温度は約20~40である。最も好ましい溶液温度は約32~37である。その曝し時間は約10分~400分である。好ましい曝し時間は約120分~240分である。最も好ましい曝し時間は約180分~210分である。

好適な有機過酸化物消毒剤は過プロピオン酸である。過プロピオン酸の濃度は容積比で約0.1%~10%で変動する。より好ましい過プロピオン酸の濃度は容積比で約0.1%~1.0%であり、最も好ましい濃度は容積比で約0.2%~0.5%である。過プロピオン酸のこれらの濃度は水又は容積比が約2%~30%のアルコールの水溶液で希釈することが出来る。最も好ましいアルコールはエタノールである。粘膜下組織供給源体を有機過酸化物溶液に約15分~約40時間の範囲の期間、更に代表的には約0.5時間~約8時間の範囲の期間、曝すことができる。他にも" Peroxygen Compounds ", S. Block, in Disinfection, Sterilization and Preservation, S. Block Editor, 4th Edition, Philadelphia, Lea & Febiger, pp. 167-181, 1991及び" Disinfection with peroxygens ", M.G.C. Baldry and J.A.L. Fraser, in Industrial Biocides, K. Payne, Editor, New York, John Wiley and Sons, pp. 91-116, 1988に記載されているようなペルオキシ消毒剤が使用に好適である。

もう一つの酸化消毒剤は、ジグルコン酸形態を持つクロルヘキシン(1,6-ジ(4-クロロフェノール・ジグアナイド)ヘキサン)である。クロルヘキシン・ジグルコナートの濃度は重量比で約0.1%~15%で変動する。より好ましいクロルヘキシン・ジグルコナートの濃度は重量比で約0.1%~2%であり、最も好ましい濃度は重量比で約0.2%~5%である。その溶液は約5~8のpHに緩衝することが出来るが、そうでなくともよい

10

20

30

40

50

。より好ましいpHは、約5.5～7である。これらの濃度は水又は重量比が約2%～20%のアルコールの水溶液で希釈することが出来る。最も好ましいアルコールは約2%～30%の濃度のエタノールである。その溶液温度は約15～50の範囲である。その曝し時間は約10分～400分に変動する。より好ましい曝し時間は約30分～60分である。他にも"Chlorhexidine", G. W. Denton, in Disinfection, Sterilization and Preservation, S. Block, Editor, 4th Edition, Philadelphia Lea & Febiger, pp. 274-289, 1991"に記載されているようなクロリン剤がある。

好適な予備処理では、過酸その他の消毒剤を、好ましくはアルコールが1個～約6個の炭素原子を持ち、且つ該アルコールが概ね容積比で溶液の約1%～約30%を占めることが出来る希釈水溶性アルコール溶液中に溶解することが出来る。本発明で使用するためのより好ましいアルコールはエタノール、プロパノール及びブタノールから成るグループから選択される。エタノールはこれらの目的にもっとも好適なアルコールである。

過酸が消毒で使用されるとき、該過酸は過酢酸、過プロピオン酸及び過安息香酸から成るグループから選択されることが好ましい。過酢酸は最も好適な消毒剤である。過酢酸は容積比で約2%～約10%のアルコール溶液で希釈することが好ましい。過酢酸の濃度は例えば容積比で約1.0%～約0.5%で変動する。過酢酸の最も好ましい濃度は容積比で約0.1%～約0.3%である。過酸化水素もまた消毒剤として使用可能である。それに代わり、或いは、更に加えて、例えば小腸からの粘膜下組織供給源体が、コラーゲン基質中に実質的な架橋を採用すること無く消毒するために使用すること出来る過酸のような他の消毒剤の作用とは異なり、そのような架橋を採用する能力が有ることが知られている。更に、粘膜下組織供給源体は、消毒の目的で放射線、例えばガンマ放射線で処理することが出来る。

消毒処理には次のような変形例を包含する。

1. 腸は、溶液対腸の比が重量比で10:1の、0.2%過酢酸、5%エタノールの溶液で処理される。溶液は2.6のpHを有する。溶液と腸とは2時間強く掻き雑ぜられる。
2. 腸は、溶液対腸の比が重量比で5:1の、1%過酢酸、25%エタノールの溶液で処理される。溶液は2のpHを有する。溶液と腸とは1時間強く掻き雑ぜられる。
3. 腸は、溶液対腸の比が重量比で5:1の、1%過酢酸、15%エタノール及び10%過酸化水素の溶液で処理される。溶液と腸とは1時間強く掻き雑ぜられる。
4. 無傷の小腸が高純度純水で15分づつ4回リンスされる。該腸が続いて1.5 MRADのMRD電子ビーム放射線に掛けられる。
5. 無傷の小腸が高純度純水で15分づつ4回リンスされる。コンベヤ・ベルトに沿って、腸にこの腸を消毒する高輝度パルス光を照射される。

上述の処置に続いて、粘膜下組織層がその供給源体、例えば無傷の腸や牛の子宮等から剥離される。この消毒後剥離手順を続けることにより、粘膜下組織層を付着組織から、例えば少なくとも付着器官膜筋組織から分離することが、消毒の前に粘膜下組織層を剥離する場合に比べて容易になる。更に、その結果得られた、最も好適な形態での粘膜下組織層は優れた微細組織構造を示し、最初に粘膜下組織層をその供給源体から剥離し、続いてその組織層を消毒する場合に比べて、その表面に付着した組織及び屑が少ないことが見出された。更に、より均一な粘膜下組織をこの処理から得ることが出来、且つ、各分離処理作業から同等又は類似の物理特性及び生化学的特性を有する粘膜下組織をより堅実に得ることが出来る。更に重要なことには、この処理により極めて純粋な実質的に無菌の粘膜下組織が得られる。

粘膜下組織供給源体の剥離は、実質的に無菌の即ち菌が最低量に処理された粘膜下組織を生成するために、好ましくは消毒された又は無菌のケーシング・マシンを使用することによって実行される。適切なケーシング・マシンは、"AB Stridhs Maskiner, Gotoborg, Sweden"から市販されている"Model 3-U-400 Stridhs Universal Machine for Hog Casin g"である。従って、その測定されたバイオバードン・レベルは最低レベル又は実質的に零である。勿論、粘膜下組織供給源体を剥離するための、例えば、手での剥離を包含する

10

20

30

40

50



他の手段を、本発明から逸脱すること無く使用することが可能である。

また、本発明によるより好ましい処理は、粘膜下組織コラーゲン基質に含有される汚染菌を除去又は顕著に低減するだけでなく、物理特性及び機械的特性、例えば食違い多孔性（即ち、粘膜下組織層の一方の側が他の側より大きな多孔性を持つ特性）の実質的な劣化を示さない組織を生成することが見出された。また、より好ましい処理は、結局この移植組織の有効度に悪影響を与える粘膜下組織コラーゲン基質の食違い多孔性に悪影響を与えないことが見出された。例えば、組織を必ずしもコラーゲン基質の多孔性即ち生来の構造を断裂する架橋剤又は材料で処理する必要は無い。更に、過酸化水素が使用されるときは、基質は、全体としてより高い酸素含有量だけでなくより大きな多孔性を有する。

これは、汚染菌、例えば内毒素や発熱物質等の不存在を確実にすることに役立つ。

また、本発明の、例えば粘膜下組織を包含するコラーゲンを基体とする基質は、有益な形態において、活発な血管形成、即ち組織の基質の中での血管の内部成長を誘発する能力を実証する。このことに関しては、本発明のこれらの好適な基質はそれら基質がそれと共に当然に生じる、例えばグリコサミノグリカンや糖蛋白質、増殖因子例えば "Transforming Growth Factor- $\alpha$ " や "Transforming Growth Factor- $\alpha$ "、"Fibroblast Growth Factor 2 (basic)" の1つ又はそれ以上含む、有益な成分を含有する。

本発明の好適なコラーゲンを基体とする基質、好ましくは基質を含有する粘膜下組織はまた、下記のテーブル1に記載の低汚染菌濃度、即ち、各汚染菌濃度が個別に或いは他の開示された汚染菌濃度の幾つか又は全てとの何らかの組み合わせで取得される低汚染菌濃度を特徴とする。テーブル1中の各略語は次のとおりである。即ち、CFG/gはグラム当たりのコロニー形成単位を表し、PFU/gはグラム当たりの溶菌斑形成単位を表し、 $\mu$ g/mgはミリグラム当たりのマイクログラムを表し、ppm/kgはキログラム当たりのPPM (parts per million) 量を表す。

表 1

	第1レベル	第2レベル	第3レベル
内毒素	< 12 EU/g	< 10 EU/g	< 5 EU/g
バイオバードン	< 2 CFU/g	< 1 CFU/g	< 0.5 CFU/g
菌類濃度	< 2 CFU/g	< 1 CFU/g	< 0.5 CFU/g
核酸含有率	< 10 $\mu$ g/mg	< 5 $\mu$ g/mg	< 2 $\mu$ g/mg
ウイルス濃度	< 500 PFU/g	< 50 PFU/g	< 5 PFU/g
処理剤濃度	< 100,000 ppm/kg	< 1,000 ppm/kg	< 100 ppm/kg

本発明の更に多くの好適なコラーゲンを基体とする基質でさえも、1 EU/g未満の内毒素濃度を含有し、且つ最も好ましくは0.5 EU/g未満の内毒素濃度を含有する。

本発明による純粋のコラーゲンを基体とする基質は幾つかの方法で処理することが出来、体外及び体内の双方に有用なコラーゲン基質を供する。例えば、粘膜下組織は脈管用途、例えば米国特許第2,127,903号及び4,902,508号に一般的に記載されているような用途に有用な組織グラフトを供するように構成することが出来る。図1を参照して、脈管移植で使用する為の、受容体の血管の径に近い径Dを持つ、概ね管状のグラフト・プロテーゼ構成体11がコラーゲンを基体とする基質12か或いはそれを含んで形成される。1つの方法では、これは粘膜下組織の管状のセグメント又はシートを操作して受容体の血管の径とほぼ同等の径Dを持つ円筒を形成し、長軸方向継ぎ目13を縫合するか、接着或いはその他の固定を行って内腔14を有する適切な寸法の管状の脈管グラフトを形成することによって達成することが出来る。例証の下準備手順で、グラフトが、移植されるべき導管の径とほぼ等しい外径を有する無菌のロッド又はマンドレルを覆って形成される。例えば、ロッドが生来の管状形を保持する粘膜下組織のセグメントの内腔内へ導入される。続いて過剰

な組織が集結され、所望の内腔径が、グラフトの長手方向に沿い、例えば2本の連続的な縫合線又は1本の断続縫合線を使用して縫合するか、或いは組織固定技術として知られている他の技術によって達成される。或いは、本発明の粘膜下組織のシートをロッドの回りに巻き付けて重なり合った継ぎ合わせを形成し、縫合するか接着剤接合或いは別の方法で固定して管状のグラフト構成体を供することが出来る。好適な形態ではグラフトの内腔内面を粘膜下組織の粘膜側によって形成することが出来る。

本発明の粘膜下組織は、低有孔指数、高コンプライアンス及び高破裂強度を包含する脈管用途の組織グラフト材料に極めて好適な機械的特性を有する。この好適な組織グラフト材料は、手術時出血を防止するのに十分に低く、しかもなお新規開発された脈管の血管がグラフト材料を貫いて広がり、新生内膜及び内腔面に栄養分を与えるのを可能にするのに十分に高い有孔度のものであることが当業技術者には認められるであろう。

10

本発明の粘膜下組織はまた、例えば米国特許第5,275,826号に記載されているような技術を使用して処理し、流動化された構成体を供することが出来る。この点に関しては、粘膜下組織の溶液或いは懸濁液は、粘膜下組織をプロテアーゼ(例えば、トリプシン又はペプシン)で、組織を可溶化し、実質的に均質な溶液を形成するのに十分な時間、粉碎又は柔らかく分解或いはそれらの双方を行うことにより、準備することが出来る。粘膜下組織出発材料は、望ましくは引き裂きやカッティング、磨り潰し或いは剪断等によって粉碎される。何個かの粘膜下組織が分散している懸濁液を高速混合機での処理に掛け、必要に応じて遠心分離機に掛け、余分の上澄み廃液を流し出すことによっても良好な結果が得られるものの、粘膜下組織を凍結状態又は凍結乾燥状態で磨り潰すことが有益である。粉碎された粘膜下組織を乾燥、例えば凍結乾燥して、粉末を形成することが出来る。その後、必要に応じて、その粉末を水和し、即ち、水と混合するか生理食塩水及び任意の他の薬理的に許容される添加剤を緩衝し、例えば、25°Cで約300,000cpsに対し約2の粘度を有する流動性グラフト組織構成体を形成することが出来る。高い粘度のグラフト構成体はゲル状又はペースト状の粘稠度を有することが出来る。

20

本発明の流動化された粘膜下組織は、最も代表的には損傷又は罹患した組織欠陥を補正するために治療或いは増殖を必要とする組織例えば骨組織又は軟組織に対する注入可能な異種間グラフトとしての用途が有る。本発明の流動化された粘膜下組織構成体はまた、例えば美容外科処置又は外傷治療外科処置で使用するための、シール(縫合)された小袋に形成された1シート以上の粘膜下組織を含有する移植組織構成体に対する充填剤として使用するのが有益である。

30

1つの例証の下準備では、上記のようにして準備された粘膜下組織に例えばカッティングによって小ピースに縮小され、平底ステンレス・スチール容器に詰められる。その容器に液体窒素を導入して試料を凍結させ、続いて試料が凍結状態にある間に粉碎され、粗い粘膜下組織粉末を形成する。そのような処理は、例えば凍結試料の上部に置かれた円筒型黄銅インゴットを持つ手動アーバ・プレスで実行することができる。そのインゴットは試料とプレスのアーバとの間のインタフェースとして働く。液体窒素は周期的に粘膜下組織試料に加えられ、それらを凍結状態に保持することが出来る。

粘膜下組織試料を粉碎するために他の方法を使用し、本発明により使用することができる粘膜下組織粉末を生成することが出来る。例えば、粘膜下組織試料を凍結乾燥し、続いて手動アーバ・プレス又は他の磨り潰し手段を使用して磨り潰すことが出来る。或いは、粘膜下組織を高剪断力混合機で処理し、脱水及び乾燥され次第粘膜下組織粉末を生成することが出来る。

40

プレチルド乳鉢及び乳棒を使用して粘膜下組織粉末を更に磨り潰すことにより、一様なより細かく割られた生成物を作ることが出来る。更に液体窒素が最終磨り潰し中に固体凍結粒子を維持するために必要なときに使用される。その粉末は、例えば緩衝処理された生理食塩水を用いて容易に水和され、所望の粘度の本発明の流動化された組織グラフト材料を生成することが出来る。

別の好適な流動化された材料を準備するために、粘膜下組織粉末をワイヤ・メッシュを通して篩分けし、寄せ集め、蛋白質分解して実質的に均質な溶液を形成することが出来る。

50

例えば、その粉末を、室温で48時間に渡って、1mg/mlのペプシン(Sigma Chemical Co., St. Louis Mo製)及び0.1Mの酢酸で分解し、HCIでpH2.5に調整することが出来る。この処理の後、反応媒体を水酸化ナトリウムで中和し、その消化活動を不活性化することが出来る。その可溶化された粘膜下組織を続いてその溶液を塩沈殿によって濃縮し、更に浄化及び凍結乾燥の何れか又は双方を行って分離し、プロテアーゼで可溶化された腸粘膜下組織を粉末状態にすることが出来る。

本発明の流動化された粘膜下組織組成は、組織の置換や増殖及び治療の何れか又は全てに広範な用途が有る。これら流動化された粘膜下組織構成体は、実在する傷の範囲内で生来の結合組織又は骨の再生を誘発するために使用することができる。有効量の流動化された粘膜下組織構成体を、治療が必要な組織欠陥又は傷の局部に注入することにより、容易に粘膜下組織のバイオトロピック特性の利点を享受することが出来る。

10

また、例えば米国特許第2,127,903号や"International Publication No. WO 96/32146, dated 17 October 1996, publishing International Application No. PCT/US96/04271, filed 5 April 1996"に記載されているような技術を使用して、2個以上の本発明の粘膜下組織セグメントを組み合わせることにより、広い表面領域を持つ構成体を形成することが可能である。従って、多数の粘膜下組織条片を例えばそれら条片の重なり合った部分を脱水状態で圧縮することによって、互いに融合し、目的の構成体を形成するために用いられる個々の条片の何れか1つの平坦面の表面面積より広い表面面積を持つ全体が平坦な構成体を形成することが出来る。

本発明の粘膜下組織はまた、他の自然物から得られたグラフト材料又は合成グラフト材料に応用されている技術を使用して、整形外科用軟組織用途、例えば腱治療又は靭帯治療に有用なグラフト組織構成体を準備するために使用することが出来る。例えば概ね米国特許第2,127,903号及び5,281,422号に記載されているような治療技術を本発明の粘膜下組織を使用して着手することが出来る。

20

腱置換体用途及び靭帯置換体用途では、粘膜下組織のセグメントを長軸方向に引張ることによって下準備することが出来る。例えば、粘膜下組織セグメントを、そのセグメントの長軸に負荷をその組織セグメントの約10%~20%の伸びを可能にするのに十分な長期間に渡って印加すること、例えばそのセグメントから重りを懸架することによって調整することが出来る。そのグラフト材料はまた、横方向に引張ることによっても下準備することが出来る。続いて、その粘膜下組織セグメントを、それ単独でまたは他のセグメントと

30

組み合わせ、様々な形状に形成し、靭帯又は腱の置換体として役立てるか、或いは捻挫又は切断された腱又は靭帯の代わりに代用するか添え当て補強することが出来る。そのような結合組織グラフト用途では、セグメントを、少なくとも対向端部及び対向側部の一方又は双方が多層のグラフト材料を持つように形成されている状態の単層又は多層構成を持ち、骨、腱、靭帯、軟骨及び筋のような生理的構成体への固着の補強を供するように構成することが望ましい。靭帯置換体用途では、両端が、代表的には例えば膝関節の場合のように関節でつながっている第1及び第2の骨にそれぞれ固着される。腱置換体用途では、グラフト構成体の第1端が骨に固着され、第2端が筋に固着される。

上記のように、結合組織用途では、例えば骨格に固着されるべきグラフト構成体の端部を、グラフトが固着部位で断裂するのを低減するように、形成し、操作し又は形作ることが有益である。これらの目的で、粘膜下組織グラフト材料を折りたたむか又は部分的に裏返して、例えばスパイク付きワッシャ又はステーブルで締めるための多数の組織層を供することが出来る。或いは、粘膜下組織セグメントをそれ自体の上に折返し両端部を接合して例えば第1の骨に固着されるべき第1の結合部を供し、且つ中間部の屈曲部が前記第1の骨に関して関節でつながれている第2の骨に固着されるべき第2の結合部を供するようにすることが出来る。

40

例えば、粘膜下組織グラフトの端部の一方が例えば大腿骨内の髓道を通して引張られてその大腿骨に固着されるように適合され、端部の他方が頸骨内の髓道を通して引張られてその頸骨に固着されるように適合されて生来の十字形靭帯の置換体を供し、緊張状態でそれら髓道間に配置されるように適合されているセグメントが靭帯機能、即ち通常の靭帯によ

50

って供される筋張及び姿勢機能を供するようにすることが出来る。

整形外科用途で使用されるグラフトは代表的には外科設備内に緊張状態で配置されるので、2個以上のセグメントを組合わせて多層重ねグラフト構成体を含有することが好ましい。従って、本発明の別の目的は、2個以上の粘膜下組織セグメントがそれらの端部がともに接合され、それら接合された端部及び側部の一方或いは双方が骨や腱、靭帯或いは他の生理的構成体に固着されるように適合されている、そのようなグラフトを供することにある。二重セグメントを供するための1つの方法は、1つの管状セグメントを他のセグメントの部内で引張るようにされ、それらの接合された端部を例えば骨、腱又は靭帯に固着することが出来る。これら二重セグメントは筋肉の張力による捻挫に対する増強された引張り強度及び粘膜下組織復元性 (retela submucosatance) を供する。他の形態では、多数の粘膜下組織セグメント又は条片を、靭帯や腱の治療で有効に働く、網状交錯配列例えば菱状又はサッシュコード状の網状交錯配列或いは隣接するループと相互に結合された多数のループを包含する網目構成に配列することが出来る。

10

本発明の粘膜下組織はまた、骨折した骨の両片を結合し且つ体内で適切な方向に保持するための結合組織として使用するための整形外科用グラフトを供するために使用され、その組織セグメントは骨折した骨のセグメントを取巻く骨折包みとして働き且つその骨に固着されるように形成される。

更にまた、整形外科用途では、本発明の粘膜下組織を、例えば米国特許第5,641,518号に記載されている一般的技術を用いて骨組織を治療するために使用することが出来る。このようにして粉末状態の粘膜下組織を損傷又は罹患した骨部を治療するため、その中へ移植することが出来る。その粘膜下組織粉末は単独又は1つ以上の生理学的に適合するミネラルや増殖因子、抗生物質、化学療法剤、抗原、抗体、酵素及びホルモンのような付加的な生体活性物質とともに使用することが出来る。好ましくは粉末状態移植材は所定の3次元形状に圧縮され、骨部に移植され、内生的な組織を持つグラフトの置換中は実質的にその形状を保持する。

20

本発明の粘膜下組織はまた、例証的には、対象細胞、例えば内皮細胞や線維母生成細胞、胎児皮膚細胞、骨肉腫細胞及び腺癌細胞のような真核細胞の増殖を支持する栄養素と組合わせて、シート状、ペースト状或いはゲル状の細胞増殖基体として使用することが出来る。好適な形態では、粘膜下組織基体組成は、人の細胞を包含する哺乳類動物の細胞の無性芽増殖及び分裂の一方又は双方を支持する。

30

本発明の粘膜下組織はまた、形質変化された細胞を生成するための構成体内のコラーゲン基質として働くことが出来る (例えば、" International Publication No. WO 96/25179 dated 22 August 1996, publishing International Application No. PCT/US96/02136 filed 16 February 1996 " 及び " International Publication No. WO 95/22611 dated 24 August 1995, publishing International Application No. PCT/US96/02251 filed 21 February 1995 " を参照されたい)。細胞形質転換のためのそのような構成体は、一般的に本発明の浄化粘膜下組織を、例えば、体外又は体内の目的細胞が遺伝子工学的に転換されるようになる核酸塩基配列を含有する遺伝子組み換えベクター (例えばプラスミド) と組合わせて流動状態又はペースト状で包含する。形質変換を目的とする細胞は、例えば骨始原細胞を包含することが出来る。

40

本発明の粘膜下組織はまた、" Ann. Plast. Surg., 1995, 35:3740380; and J. Surg. Res., 1996, 60:107-114 " に記載されている技術と類似の技術を用いて、例えばヘルニアのような腹壁の傷の治療を包含する、腹腔の治療に使用することが出来る。そのような用途では、本発明の好適な粘膜下組織グラフトは改造された組織の順調な器質化、脈管新生及び整合性を促進する。皮膚科用途では、本発明の粘膜下組織は、この技術分野及び文献 (例えば、" Annals of Plastic Surgery 1995, 35:381388 " を参照されたい) で知られている一般的移植技術を用いて、一部又は全厚みの傷の治療及び皮膚増殖で使用することが出来る。更に、火傷治療の領域では、培養表皮グラフト (好ましくは培養表皮自家移植片即ちCEA) が転植される皮膚置換体を供することが一般的に知られている。そのような培養グラフトは代表的には皮膚置換体に表皮角質生成細胞及び線維母生成細胞の一方又は

50

双方の転植を包含していた。本発明によれば、浄化粘膜下組織を、例えばシート状の皮膚置換体及びCEAとして従って粘膜下組織に転植された状態で使用することが出来る。

本発明のこの態様を実施する1つの方法では、例えば表皮角質生成細胞シートを粘膜下組織の粘膜側に接種又は転植することによって、表皮角質生成細胞を転植することが出来る。また、線維母生成細胞を粘膜下組織の粘膜側及びその反対側（腹腔側）の一方又は双方に転植することも出来る。

本発明の粘膜下組織はまた、泌尿生殖科用途でのグラフト組織で使用することも出来る。例えば、一般的に米国特許第5,645,860号、“Urology, 1995, 46:396-400”及び“J. urology, 1996, 155:2098”に記載されている技術に相応する技術を用いて、粘膜下組織を膀胱治療で使用し、膀胱再生のための足場を供することが出来る。流動化された形態では、本発明の粘膜下組織はまた内視鏡導入手順でベシキュレラル（vesicureteral）の逆流を補正するために使用することが出来る。そのような用途では、粘膜下組織注入を、例えば患者の輸尿管オリフィスの下方領域で行い、注入場所に順調な筋増殖及びコラーゲン形成を誘発することが出来る。

他の領域では、本発明の粘膜下組織を用いて形成されたグラフト組織構成体を、神経科用途、例えば損傷処置や腫瘍切除処置又は減圧処置による傷を治療するために硬膜置換体を必要とする技術で使用することが出来る。

本発明とその特徴及び利点に対する理解を更に容易にするために、以下の特別な実施例が供される。これらの特別な実施例は本発明の例証であって限定するものではない。

#### 実施例 1

成熟した成体の豚の30フィートの無傷の腸を水でリンスする。続いてこの材料を、0.2%容積比過酢酸の5%容積比エタノール水溶液中で2時間攪拌処理する。続いて粘膜下組織層を消毒されたケーシング・マシンで無傷の腸から剥離する。剥離された粘膜下組織を滅菌水で4回リンスし、内毒素、微生物有機物及び発熱物質のような不純物や汚染菌を調べる。その結果得られた組織は基本的に零レベルのバイオバードンを持つことが見出された。無傷の腸から容易且つ堅実に分離された粘膜下組織層はその表面に最低量の組織屑を持つことが見出された。

#### 実施例 2

豚の無傷の腸の10フィートの断片を水で洗浄する。リンスした後、粘膜下組織腸管コラーゲン供給源体材料のこの断片を、0.2%容積比過酢酸の5%容積比エタノール水溶液中で2.5時間攪拌処理する。過酢酸で処理された後、粘膜下組織層を無傷の腸から剥離する。続いて、その結果得られた粘膜下組織を滅菌水で4回リンスする。そのバイオバードンは基本的に零レベルであることが見出された。

#### 実施例 3

その粘膜下組織腸管コラーゲン材料の小片をラットに皮下移植した。72時間で、顕著な血管形成が観測された。

#### 実施例 4

小腸の2個の断片を別々の方法で処理する。第1の断片を水道水でリンスし、0.2%容積比の過酢酸を有し、pHがほぼ2.6の5%容積比エタノール水溶液中で5時間消毒し、粘膜下組織を剥離し、純粋の水でリンスし、2個の標本に分け、急速冷凍する。第2の断片を水道水でリンスし、粘膜下組織を剥離し、米国特許第4,902,508号に記載されているように10%硫酸ネオマイシン溶液中に20分間置き、純粋の水でリンスし、2個の標本に分け、急速冷凍する。4個の上記処理された標本のバイオバードン・レベルと内毒素濃度とを調べる。第1の2個の標本は各々0.1CFU/g未満のバイオバードン・レベル及び0.1EU/g未満の内毒素濃度を有する。第2の2個の標本はそれぞれ1.7CFU/gと2.7CFU/gのバイオバードン・レベル及び23.9EU/gと15.7EU/gの内毒素濃度を有する。

#### 実施例 5

小腸の3個の断片を別々の方法で処理する。第1の断片を水道水でリンスし、0.2%容積比の過酢酸を有し、pHが約2.6の5%容積比エタノール水溶液中で2時間消毒し、

粘膜下組織を剥離し、純粋の水でリンスし、急速冷凍する。第2の断片を水道水でリンスし、粘膜下組織を剥離し、純粋の水でリンスし、米国特許第5,460,962号の実施例1(pH 7.2に緩衝された過酢酸の0.1%容積比水溶液中で40時間処理)による方法により消毒し、急速冷凍する。第3の断片を水道水でリンスし、粘膜下組織を剥離し、純粋の水でリンスし、米国特許第5,460,962号の実施例2(pH 7.2に緩衝された0.1%容積比過酢酸の高濃度食塩溶液中で処理)による方法により消毒し、急速冷凍する。3個の標本の全ての内毒素を調べた。内毒素濃度は、第1標本が0.14 EU/g未満、第2標本が2.4 EU/g超、第3標本が2.8 EU/g超であった。

#### 実施例 6

豚の小腸の2つの断片を $7 \times 10^6$ 溶菌斑形成単位(PFU)のウイルスに感染させた。両方とも、溶液対材料比が9:1の重量比の0.18%容積比過酢酸、4.8%エタノール水溶液に曝した。この溶液に第1の標本を5分間液浸し、第2の標本を2時間液浸した。5分間処理された材料は、その材料の1グラム当たり400 PFUを示した。2時間処理された材料は、その材料の1グラム当たり0 PFUを示した。

10

#### 実施例 7

ここで述べたように準備された浄化粘膜下組織を調べ、その核酸含有量を判定した。各々5mgの重量の4個の標本を、"DNA/RNA Isolation Kit by Amersham Lifescience Inc., Arlington Heights, Illinois"に詳述されているような、DNA/RNA抽出を行った。核酸計量を、260 nm及び280 nmでの溶液光学濃度の分光光度定量によって実行した。平均核酸含有量は材料の1ミリグラム当たり $1.9 \pm 0.2 \mu\text{g}$ であった。

20

米国特許第4,902,508号に記載されているようにして準備された小腸粘膜下組織を調べ、その核酸含有量を判定した。各々5mgの重量の4個の標本を、"DNA/RNA Isolation Kit by Amersham"に詳述されているような、DNA/RNA抽出を行った。核酸計量を、260 nm及び280 nmの溶液光学濃度の分光光度定量によって実行した。平均核酸含有量は材料の1ミリグラム当たり $2.4 \pm 0.2 \mu\text{g}$ であった。

#### 実施例 8

本明細書で述べた方法によって準備された粘膜下組織の断片を、"standard ISO 10993"に記載された生体適合性検査のため、第三者的な検査試験所(NamSA, Inc., Northwood, Ohio)に送った。それらの標本は、"USP Acute Systemic Toxicity"、"USP Intracutaneous Toxicity"、"Cytotoxicity"、"LAL Endotoxin, material-mediated Pyrogenicity"、"Direct Contact Hemolysis"及び"Primary Skin Irritation"の各検査を受けた。それらの標本は全ての検査に合格し、その材料が生体に適合可能であることを示した。

30

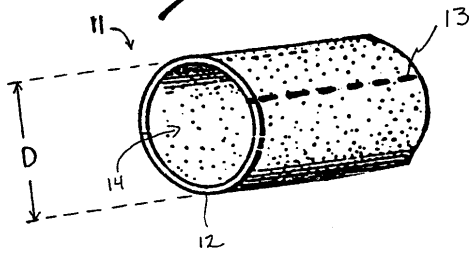
上記処理手順の変形は本発明の範囲内のものであることを意味していることが十分認められるであろう。例えば、粘膜下組織の供給源体組織、例えば胃や無傷の腸、牛の子宮等を部分的に剥離し、消毒剤又は滅菌消毒剤で処理した後、粘膜下組織を完全に剥離する。実例として、無傷の腸の付着腸間膜層及び漿膜層の一方又は双方を、消毒剤で処置する前に取出し、続いて粘膜下組織から残留している付着組織を剥離するのが有益である。これらの手順に続いて、別途の消毒手順、例えば酵素による浄化及び核酸除去を行うことが出来るが、そうでなくともよい。或いは、被膜筋及び被膜粘膜から剥離された粘膜下組織供給源体を、最低限、消毒剤又は他のそのような薬剤で処理し、続いて完全に消毒処置を行い所望の汚染菌濃度を達成することが出来る。そのような変形及び改変は全てここに記述されている処理の一部であり、本発明の範囲内のものであると考えられる。

40

また、ここに引用された刊行物は関連分野の業務に携わる人達に所有されている技術を示し、そのような刊行物は個々に参照に供され完全に記述している如くに、個々の刊行物の全体がここでの説明のための参照に供される。

【図 1】

*Fig. 1.*



## フロントページの続き

(73)特許権者 511152957

クック メディカル テクノロジーズ エルエルシー  
COOK MEDICAL TECHNOLOGIES LLC  
アメリカ合衆国 47404 インディアナ州, ブルーミントン, ノース ダニエルズ ウェ  
イ 750

(74)代理人 100083895

弁理士 伊藤 茂

(72)発明者 クック ウィリアム エー.

アメリカ合衆国, 47401 インディアナ ブルーミントン ワイリー ストリート 1208

(72)発明者 ハイルス マイケル シー.

アメリカ合衆国, 47905 インディアナ イースト ラファイエット 900 サウス 43  
26

(72)発明者 コズマ トーマス ジー.

アメリカ合衆国, 47906 インディアナ ウェスト ラファイエット コートハウス ドライ  
ブ 3118 アpartment 2シー

(72)発明者 パテル ウメシュ エッチ.

アメリカ合衆国, 47906 インディアナ ウェスト ラファイエット キングスウッド ロー  
ド サウス1135

## 合議体

審判長 横尾 俊一

審判官 平井 裕彰

審判官 穴吹 智子

(56)参考文献 国際公開第95/18529(WO, A1)

国際公開第96/24365(WO, A1)

国際公開第95/22301(WO, A1)

特表平6-510927(JP, A)

特開平1-111008(JP, A)

特開平3-162848(JP, A)

特開平4-246359(JP, A)

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

A61L27/00-27/60

CA(STN)