

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl.

A61F 2/02 (2006.01)

A61L 27/00 (2006.01)

A61K 35/12 (2006.01)



[12] 发明专利说明书

专利号 ZL 200480013198.1

[45] 授权公告日 2009年9月30日

[11] 授权公告号 CN 100544685C

[22] 申请日 2004.5.12

[21] 申请号 200480013198.1

[30] 优先权

[32] 2003.5.15 [33] JP [31] 138015/2003

[86] 国际申请 PCT/JP2004/006662 2004.5.12

[87] 国际公布 WO2004/100831 日 2004.11.25

[85] 进入国家阶段日期 2005.11.15

[73] 专利权人 学校法人早稻田大学

地址 日本东京

共同专利权人 塞里牧吧有限公司

[72] 发明人 梅津光生 岩崎清隆 尾崎重之

守本祐司 远藤修

[56] 参考文献

US6267786B1 2001.7.31

US5899937A 1999.5.4

US5863296A 1999.1.26

Microwave treatment of xenogeneic cartilage transplants. C. E. Visser et al. Biomaterials, Vol. 10 No. 8. 1989

审查员 沈研研

[74] 专利代理机构 中国国际贸易促进委员会专利
商标事务所

代理人 李华英

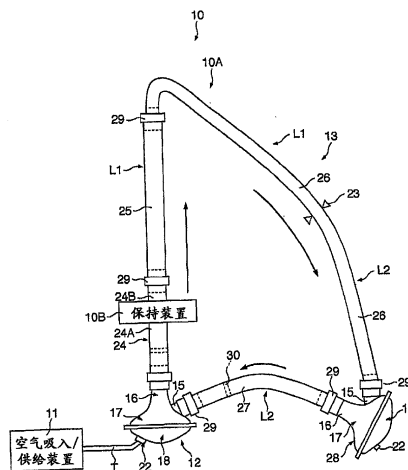
权利要求书 1 页 说明书 21 页 附图 12 页

[54] 发明名称

活体组织处理设备

[57] 摘要

在从动物身体上取出的准备放入人体的诸如心脏瓣膜的活体组织移植中，使用于排除活体组织中的原始细胞的细胞排除溶液的流动状态大体上等于移植物受体活体的流动状态，并且将所述活体组织放入所述液流中，以便将所述活体组织有效浸泡在细胞排除溶液中。在浸泡时，优选将所述活体组织放入细胞排除溶液，同时旋转、用微波辐射。结果，可以将原始细胞均匀并且可靠地从活体组织中排除，以便可以提高在移植之后活体组织的生物兼容性。



1. 一种使用活体组织的细胞排除方法的活体组织处理设备，其中，所述活体组织处理设备包括用于将活体组织保持在细胞排除溶液中的保持装置，所述排除溶液能够以搏动流的状态流动；和用于对保持在所述保持装置中的活体组织施加微波的辐射装置。
2. 如权利要求 1 的活体组织处理设备，其中，提供的所述设备能够使所述保持装置相对辐射装置转动。

活体组织处理设备

技术领域

本发明涉及细胞排除方法，更具体地讲，涉及在移植活体组织时能增强从活体组织中排除细胞的效果的细胞排除方法。

背景技术

当人体的心脏瓣膜不能正常工作时，会导致诸如心脏瓣膜开口缩窄和血液回流的困难，所述心脏瓣膜必须用替代瓣膜更换。作为目前使用的替代瓣膜，可以使用由人工材料制成的机械瓣膜，从诸如猪的动物体内取出的异种生物瓣膜，和由其他人捐献的同种异体生物瓣膜等。这样的瓣膜存在以下问题。尽管机械瓣膜耐用，但受体必须在他的一生中使用抗凝血剂。另一方面，在异种生物瓣膜中，受体没有必要一生使用抗凝血剂；不过长时间发生的钙沉积等问题，导致了瓣膜的功能异常，其结果是必须以大约 15 年的时间间隔用新的替代瓣膜更换损坏的瓣膜。另外，对于同种异体生物瓣膜来说，由于供体的数量有限，不容易获得大量的同种异体生物瓣膜。

其中，异种生物瓣膜是具有应用前景的，因为可以提供足够数量的这样的瓣膜，并且，患者在移植之后没有必要终生使用抗凝血剂。因此，预计异种生物瓣膜比其他替代瓣膜更实用，只需要克服耐用性较差的缺陷即可。

在本文中，已知下列方法能够抑制移植后免疫排斥，并且改善从诸如猪的动物体内取出的异种生物瓣膜的耐用性（例如，参见日本专利号 6-261933）。在该方法中，首先将异种生物瓣膜浸泡在细胞排除溶液中，如胆酸或表面活性剂中，以便排除来自所述动物的细胞，如内皮细胞和成纤维细胞（细胞排除方法）。然后将业已排除了它里面的原始细胞的异种生物瓣膜浸泡在含有自体细胞，如从受体人体（所述异种生

述异种生物瓣膜将要移植到所述人体内)的内皮细胞和成纤维细胞的含有细胞的溶液中,以便将所述自体细胞接种在所述异种生物瓣膜上(细胞接种方法)。

不过,在上述处理方法中,由于从动物体内取出的异种生物瓣膜在所述细胞排除过程和细胞接种过程中不能够有效地处理,所得到的异种生物瓣膜不能获得足够的生物兼容性。换句话说,由于原始细胞或多或少地保持在所述细胞排除过程中,所得到的异种生物瓣膜的生物兼容性由于原始细胞的存在而降低。

在上述场合下,本发明人业已进行了深入的实验研究,其目的是克服上述问题。他们设计了一种提供所述细胞排除溶液的方法,用于以实际上相当于人体血液流动的流速浸泡异种生物瓣膜和/或用微波辐射浸泡在所述细胞排除溶液中的异种生物瓣膜。结果,他们发现通过该方法显著减少了残留原始细胞的数量。

发明内容

本发明是基于上述发现构思的。本发明的一个目的是提供有效排除存在于诸如异种生物瓣膜的活体组织中的原始细胞的方法,以便在移植之后提高活体组织的生物兼容性。

为了达到上述目的,本发明涉及用于在移植活体组织时从预定的活体组织中排除原始细胞的细胞排除方法,包括将所述活体组织浸泡在预定的细胞排除溶液中,其中,所述细胞排除溶液能够以搏动流的状态流动,这是通过对所述细胞排除溶液施加预定的脉冲实现的,并且,将活体组织放入所述搏动流中。通过该方法,所述活体组织中残留原始细胞的数量与常规方法相比能够显著减少,从而提高了在移植之后所述活体组织的生物兼容性。

另外,本发明涉及用于在移植活体组织时从预定的活体组织排除原始细胞的细胞排除方法,包括将活体组织浸泡在细胞排除溶液中,

其中,用微波辐射放入所述细胞排除溶液中的活体组织。上述目的还可以通过该方法实现。

所述(后一种)方法可以与通过对细胞排除溶液施加预定的脉冲以使细胞排除溶液以搏动流的状态流动,并且将活体组织放入所述搏动流的方法同时进行。通过这种方法可以进一步提高排除细胞的效果,并且能够将原始细胞几乎完全从所述活体组织中排除。

微波是在活体组织相对所述微波辐射部位转动时施加的。这样,实际上可以沿旋转圆周方向均匀地对活体组织施加微波,其结果是,实际上可以将细胞均匀地沿旋转圆周方向从活体组织的几乎所有部位除去。

附图的简要说明

图 1 是表示要应用在本发明中的活体组织处理设备的示意性结构的示意图;

图 2 是驱动泵的纵向剖视示意图;

图 3 是构成所述活体组织处理设备的保持装置的示意性正视图;

图 4 是所述保持装置的盖子的分解透视图;

图 5 是所述保持装置的示意性剖视图;

图 6 是图 5 所示结构的右侧分解剖视图;

图 7 是流入口的通道形成部件的示意性分解透视图;

图 8 是图 5 所示结构的左侧分解剖视图;

图 9 是流出口的通道形成部件的示意性分解透视图;

图 10 (A) 是来自图 3 所示结构一部分的示意图,包括所述保持装置;

图 10 (B) 是图 10 (A) 所示相同的结构处在绕支撑轴相对图 10 (A) 所示状态旋转 180°的状态;

图 11 是表示在例 1, 2 中单位面积上残留原始细胞数量的表格,与比较例 1 进行比较;

图 12 是在例 3 中获得的活体组织的放大的显微照相;和

图 13 是在例 4 中获得的活体组织的放大的显微照相。

实施本发明的最佳方式

现在，将结合附图对本发明的实施方案进行说明。

图 1 是表示本发明的活体组织处理设备的示意性结构的示意图。在附图中所示出的活体组织处理设备 10 被用于异种生物瓣膜的活体组织的细胞排除过程和细胞接种过程。细胞排除过程是在从诸如猪的动物体内取出的异种生物瓣膜被移植到人体中之前进行的。细胞排除过程是通过将异种生物瓣膜浸泡在诸如胆酸的细胞排除溶液中，以便排除动物细胞（以下称之为“原始细胞”）进行的，以便仅获得由胶原等组成的基质。另一方面，细胞接种过程是通过将业已除去了其中的原始细胞的异种生物瓣膜浸泡在含有人类受体（所述异种生物瓣膜将要移植到该人体内）的细胞（以下称之为“自体细胞”）的含有细胞的溶液中，以便将自体细胞黏附在所述基质上。

活体组织处理设备 10 包括循环装置 10A，用于使细胞排除溶液和含有细胞的溶液通过预定的回路循环，以及连接在循环装置 10A 上的保持装置 10B，用于保持异种生物瓣膜。注意，如果没有专门说明，细胞排除溶液和含有细胞的溶液被统称为“溶液”。

循环装置 10A 包括已知的空气吸入/供给装置 11，由聚氨酯组成的并且与空气吸入/供给装置 11 连接的驱动泵 12，以及这样安装的循环通道 13，使得从驱动泵 12 中排除的溶液返回驱动泵 12。

空气吸入/供给装置 11 具有已知结构，能够将空气从驱动泵 12 中吸出，并且将空气输送到驱动泵 12。本文省略了对所述结构的详细说明。

驱动泵 12 是吸水泵，能够通过产生螺旋形涡流来喷射搏动流。更具体地讲，在图 2 中示出的驱动泵 12 采用了业已由本申请人提出的结构（日本专利公开号 2002-167836）。更具体地讲，驱动泵 12 包括中空的上部结构 17，实际上具有锥形外形，它具有流入口 15 和流出口 16，中空的下部结构 18，实际上具有圆顶形外形，它位于上部结构 17 下面，以及柔性膜片 20，它将由结构 17 和 18 形成的空间分隔成两部分，即内部空间 S1 和 S2。在图 2 的右侧示出的流入口 15 是

这样形成的，以便通过上部结构 17 的外周壁拧入，而流出口 16 设置在上部结构 17 的顶部，参见图 2 的上端。

下部结构 18 具有与空气吸入/供给装置 11 连通的排气孔 22。在预定的时间，将压缩空气交替地输送到下方内部空间 S2 和从该空间中排除。在压缩空气输入和排除内部空间 S2 时，膜片 20 发生位移，增加或减少上方内部空间 S1 的体积。结果，从流出口 16 输出的溶液形成搏动流。此时，在上部空间 S1 中产生了螺旋形涡流，如图 2 中的虚线所示出的。在这种状态下，不容易出现静止区。在本发明的实施例中，输送到内部空间 S2 中的空气的压力（正压）被设定为大约 140 mmHg - 260 mmHg，而从内部空间 S2 中吸出的空气的压力（负压）被设定为大约 -30 mmHg 至 -50 mm Hg，不过，上述范围并不局限于这些值。

参见图 1，循环通道 13 是由以下形式的闭合回路形成的，所述溶液从驱动泵 12 的流出口 16 流出并且流入流入口 15 而不接触外界空气。更具体地讲，流体通道 13 包括阻力形成装置 23，它对从流出口 16 中输出的溶液产生流动阻力；与流出口 16 连接的上游管 24；起着强度控制装置作用的控制管 25，它与上游管 24 的下游端连接；与控制管 25 的下游端连接的连接管 26；安装在连接管 26 的下游并且与驱动泵 12 的流入口 15 连接的下游管 27；以及在连接管 26 和下游管 27 之间提供的连接泵 28。注意部件 24 - 28 是通过已知接头 29 连接的。在下面，为了方便起见，循环通道 13 的位于阻力形成装置 23 上游的部分被称作 "上游管 L1"，而位于阻力形成装置 23 下游的部分被称作 "下游管 L2"。

假定是在人体的外周阻力的情况下，阻力形成装置 23 被单独设置在连接管 26 的中间，并且设置了夹紧部件（未示出），用于固定连接管 26。由于连接管 26 是通过阻力形成装置 23 固定的，如果驱动泵 12 脉冲的话，上游管 L1 的最低的血压将不会达到 0 mm Hg。这样，模拟了人体的动脉血流。可以通过控制连接管 26 的紧固程度，将上游管 L1 的平均脉压调节到预定值。在本实施方案中，将平均脉压设定为大约 100 mmHg，它实际上相当于人体的平均脉压。注意，作为阻力形成

装置 23, 除了夹紧部件之外的包括可变孔在内的任何部件都可以使用, 只要它具有与上文所述相同的作用就行。

上游管 24, 连接管 26 和下游管 27 是由氯乙烯制成, 但是并不特别局限于此。正如下文所披露的, 保持装置 10B 设置在上游管 24 的中间。由于异种生物瓣膜放置在保持装置 10B 中, 而止回阀 30 设置在下游管 27 中, 所述溶液可以在不沿图 1 中的箭头所示方向回流的条件下循环。

控制管 25 安装在阻力形成装置 23 的上游, 并且起着控制器的作用, 控制上游管 L1 的脉压的强度。更具体地讲, 控制管 25 是由柔软材料制成的, 如片段状聚氨酯或硅酮, 可以通过改变管壁厚度控制上游管 L1 的脉压强度。注意, 在本实施方案中, 上游管 L1 的脉压强度被设定为, 例如, 100 mmHg (平均脉压) $\pm 20 \text{ mm Hg}$, 以便接近人体脉压。

连接泵 28 是具有与驱动泵 12 相同的结构的搏动流形成泵。使用类似的附图标记表示与驱动泵 12 相应的类似的结构部件, 并且省略所有进一步的说明。注意, 连接泵 28 是沿这样的方向安装的, 使得所述溶液通过流入口 15 流入, 并且通过流出口 16 流出。连接泵 28 的排气孔 22 通向外界。膜片 20 根据溶液流动位移。装入循环装置 10A 中的溶液的量略低于装置 10A 的最大允许装载量, 连接泵 28 的膜片 20 的位移量略小于最大物理允许位移量。因此, 连接泵 28 提供了抑制作用。更具体地讲, 当溶液通过所述连接泵时, 膜片 20 位移, 从而降低血压。因此, 连接泵 28 被安装在阻力形成装置 23 的下游, 并且起着脉压减弱装置的作用, 用于减弱下游管 L2 的溶液的液体压力。在本实施方案中, 通过连接泵 28 的溶液的压力被设定为大约 10 mm Hg , 以便与人体左心房的压力相当。

注意, 连接泵 28 可以安装在控制管 25 和连接管 26 之间。

流过循环装置 10A 的溶液被引入其中的保持装置 10B 将浸泡在溶液中的异种生物瓣膜保留。在本实施方案中, 作为要进行细胞排除过程和细胞接种过程的异种生物瓣膜, 使用了猪主动脉瓣。保持装置 10B

被安装在循环通道 13 的具有接近于人主动脉瓣部分的血流状态的部位。简单地讲,保持装置 10B 与上游管 24 的中间连接。在下面,为了便于说明起见,上游管 24 的位于保持装置 10B 上游的部分被称作入口管 24A,而位于保持装置 10B 下游的部分被称作出口管 24B。注意,保持装置 10B 可自由地与循环通道 13 的任何部位连接,通过适当选择循环通道 13 的部位,它的状态(如压力)接近于通过目标活体组织的血流的状态。

参见图 3,保持装置 10B 包括管状底座 33,它能够被放置在预定的表面 F 上,位于底座 33 上方的主体 35,和位于底座 33 的左右两侧的支撑部件 36, 36, 用于支撑主体 35。

主体 35 包括箱形盖子 38,从正面看它具有六边形形状;用于固定异种生物瓣膜 V 的保持装置 39,它设置在盖子 38 内;具有八边形(从正面看)、用于支撑保持装置 39、并且是沿盖子 38 的内壁安装的构件 40;辐射器 42(辐射装置),它位于盖子 38 后面,用于对保持在保持装置 39 中的异种生物瓣膜 V 施加微波;支撑轴 44, 44 分别从构件 40 的右侧和左侧通过盖子 38 向支撑部件 36, 36 延伸;以及两个管子,即与保持装置 39 相连的导入管 46 和排放管 47。

参见图 4,盖子 38 具有箱形结构,它由纵向分隔的两部分构成,更具体地讲,包括位于正面的前盖 51,和位于背面的后盖 52。前盖 51 和后盖 52 的对接部分是在与支撑轴 44, 44 相交的位置形成的。在所述对接部分的外侧边缘部分,实际上沿所述外侧边缘部分,形成了凸缘平面 54, 54。在凸缘平面 54, 54 上,形成了多个用于螺钉(volts)的通孔 55(未示出)。当凸缘平面 54, 54 面对面地彼此接触,并且用螺钉连接时,前盖 51 和后盖 52 合并成一体。当所述螺钉从所述集成结构上去掉,前盖 51 可以分离,并且与后盖 52 分开。另外,微波辐射口 57 具有向前开的矩形形状,它是在后盖 52 内部的中央周围形成的。辐射口 57 是这样形成的,以便实际上向前对应于由保持装置 39 保留的异种生物瓣膜 V(参见图 3)。通过这种装置,由辐射器 42 向后输送的微波,通过辐射口 57,并且向前施加到位于保持装

置 39 内的异种生物瓣膜 V 上。另外，前盖 51 和后盖 52 具有这样的结构，在从辐射口 57 向保持装置 39 施加微波时能够防止微波向外界泄露。注意，在前盖 51 的前端提供了门板 59。门板 59 是用已知材料制成的，通过它可以看见保持装置 39 的状态，并且通过它可以防止微波向外界泄露。

参见图 5，保持装置 39 包括在附图中沿右向和左向延伸的丙烯酸筒形部件 61，位于筒形部件 61 的右侧末端的流入部分 62，位于它的左侧末端的流出部分 63，和用于将异种生物瓣膜 V 安装在流入部分 62 和流出部分 63 之间的安装空间 64。保持装置 39 中，所述溶液从流入部分 62 流入筒形部件 61，通过安装空间 64，并且从流出部分 63 流到外面，正如下面所披露的。

筒形部件 61 在延伸方向的两端都具有开口。在所述开口末端，设置了流入部分 62 和流出部分 63。将薄铝板 66 粘贴在筒形部件 61 的整个外周表面上，实际上相当于安装空间 64 的中央部位除外。采用这种结构，由辐射器 42 提供的微波（参见图 3）只能通过实际上与安装空间 64 相应的筒形部件 61 的中央周壁部分透射。结果，微波可以集中到中央部分；与此同时，可以避免提高安装空间 64 外侧部分的温度。

参见图 5 和 6，流入部分 62 包括末端部件 68，它与筒形部件 61 的外周表面接合，以及位于末端部件 68 内的通道形成部件 69。

末端部件 68 被制成容器形式，如图 6 所示，在它底部的左侧具有孔。更具体地讲，末端部件 68 具有位于附图右侧的下盘 71，和在下盘 71 的周向边缘连续形成的侧壁 72，并且实际上垂直延伸到（朝向图 6 的左侧）下盘 71。下盘 71 在接近中心部分具有通孔 73。侧壁 72 具有在开口一侧的内部周向形成的螺纹 74。螺纹 74 与在筒形部件 61 的外周上形成的螺纹 75 接合。

参见图 5-7，通道形成部件 69 包括具有与锥体类似形状的中空的锥形管 77，以及要插入锥形管 77 的插入管 78。

锥形管 77 包括靠近安装空间 64 定位的柱形顶部 79，裙缘形部分 80 从顶部 79 逐渐向外扩张到图 6 的右侧，并且在附图中从中间开始

沿右和左的方向线性延伸,凸缘形边缘部分 81 在图 6 中的裙缘形部分 80 的右侧末端连续地形成,并且内部空间 83 在部分 79-81 中形成,并且在图 6 中的右侧和左侧与外界连通。注意,在下面的解释通道形成部件 69 的部分,如果没有特别说明,术语"前缘侧"表示锥形管 77 靠近顶部 79 的一侧,而术语"后缘侧"表示锥形管 77 靠近边缘部分 81 的一侧。

在顶部 79 的外周表面上,沿所述圆周形成了止动槽 85。当包括主动脉瓣的猪血管组织 B 的末端部分(作为异种生物瓣膜 V)被放置在止动槽 85 上,并且用结合部件(未示出)固定时,参见图 5,可以限制将血管组织 B 从顶部 79 上取出。

在裙缘形部分 80 上,将边缘部分 81 的外径设定为等于筒形部件 61 的内径,以便边缘部分 81 正好接合在筒形部件 61 内。

边缘部分 81 被制成环形形式。将边缘部分 81 的外径设定成等于末端部件 68 的侧壁 72 的内径。采用这种结构,边缘部分 81 可正好结合在末端部件 68 内。在边缘部分 81 的内侧周向表面上,形成了螺纹 87。

参见图 6,内部空间 83 具有位于右侧末端的开口部分。内部空间 83 包括底部空间 89,插入管 78 的顶部通过开口部分将插入其中。主通道 91 与底部空间 89 连通,并且朝向在前缘侧形成的开口部分 90 延伸,并且在主通道 91 周围提供了四个侧面通道 92,与底部空间 89 连通。底部空间 89 具有内部空间,它的形状与插入管 78 的顶部一致,可正好接合在插入管 78 上。主通道 91 被制成锥形孔形式,它的内径从顶部 79 开始向内缩小,不过,并不局限于此。参见图 7,在裙缘形部分 80 的倾斜的表面上形成了侧面通道 92。更具体地讲,四个侧面通道 92 是沿裙缘形部分 80 的圆周方向以相等的间隔排列的。应当指出的是,在本实施方案中,将侧面通道 92 的开口部分的总面积设定为等于主通道 91 的面积。

参见图 6,插入管 78 包括在前缘侧具有球形外形的球形部分 94,外径比球形部分 94 的外径更小的筒形部分 95,并且通过阶梯形部分

连续地形成到球形部分 94。外部筒形部分 96 接合在筒形部分 95 的外周表面周围,以便可以相互转动,环形轴环部分 97 连续地设置在外部筒形部分 96 的后缘侧,并且其外径小于末端部件 68 的通孔 73 的内径,内部空间 99 形成在球形部分 94 和筒形部分 95 中。在外部筒形部分 96 的外周表面上,形成了螺纹 101。螺纹 101 与在边缘部分 81 的内部形成的螺纹 87 接合。通过这种结构,插入管 78 可以与锥形管 77 连接。

内部空间 99 包括底部通道 103,溶液可通过它流动,顶部孔 104 与底部通道 103 连通,并且在球形部分 94 的前缘侧开放,以及四个侧孔 105 形成在顶部孔 104 周围,并且与底部通道 103 连通。当插入管 78 的前缘侧结合到锥形管 77 的内部空间 83 中时,顶部孔 104 稳定地与主通道 91 连通。侧孔 105 实际上是在球形部分 94 的表面上沿圆周方向以相等的间隔分布的。当插入管 78 结合到锥形管 77 中时,侧孔 105 可旋转地改变位置,从能够完全与所有侧面通道 92 连通的最大连通位置改变成与所有侧面通道 92 的联系完全切断的关闭位置,这一过程是通过管 78 和 77 的相互转动实现的。因此,插入管 78 通过改变它的位置控制流量,从流出所有侧面通道 92 的溶液的总流量等于流出主通道 91 的总流量的位置,改变到流出所有侧面通道 92 的溶液的总流量实际上为零的位置。在这种意义上,插入管 78 起着类似于可变节流阀的作用,由它控制从侧面通道 92 中流出的溶液的流量。

参见图 5, 8 和 9,流出部分 63 的形状部分不同于流入部分 62 的形状;不过,具有大体上相同的结构部件,并且以实际上类似的方式起作用。

因此,在流出部分 63 上使用了类似的附图标记,以便表示与流入部分 62 相应的流出部分 63 的相同或等同的结构部件,并且省略或简化了对所有技术的解释。仅对与流入部分 62 的不同之处作补充说明。

流出部分 63 的末端部件 68 被制成类似螺母的形式。实际上,在末端部件 68 的中央,提供了螺纹孔 107,以便在图 8 中沿左右方向延伸。

流出部分 63 的锥形管 77 与流入部分 62 的形状不同,边缘部分

81 连续地形成到裙缘形部分 80。具体地讲，边缘部分 81 被制成类似螺纹杆形式，其外径小于裙缘形部分 80 的最大外径。边缘部分 81 的外周部分与末端部件 68 的螺纹孔 107 接合。锥形管 77 具有导向槽 109，用于在这里插入热传感器（未示出）。导向槽 109 设置在内部空间 83 外面。槽 109 包括第一导向槽 109A，它从边缘部分 81 的后缘侧延伸到裙缘形部分 80 的倾斜的表面，以及第二导向槽 109B，它是在第一导向槽 109A 的中央分支的，并且向主通道 91 延伸。注意，导向槽 109A 和 109B 中的两个或任一个可以省去。

流出部分 63 的插入管 78 在它的整体形状上与流入部分 62 不同。在插入管 78 上，筒形部分 95 向前缘侧延伸，取代球形部分 94。顶部孔 104 设置在筒形部分 95 的前缘侧。四个侧孔 105 以实际上相等的间隔沿圆周方向设置在筒形部分 95 的前缘侧的外周表面。

注意，在图 5，6 和 8 中的阻挡部件是用于密封的 O 形环。

参见图 3，构件 40 支撑着保持装置 39，以便在它里面转动。更具体地讲，插入管 78，78 实际上从末端部件 68，68 的中央向外突出，它们通过管螺母 111，111 连接在旋转管 112，112 上。旋转管 112，112 通过轴承（未示出）各自连接在构件 40 的一部分上，并且突出到构件 40 外面。保持装置 39 接合在构件 40 内，以便旋转管 112，112 可以如图 3 所示以 45° 的角度倾斜地延伸。保持装置 39 可以绕旋转管 112，112 转动（自转）。在构件 40 的外表面上，并且靠近旋转管 112 位于流出部分 63（图 3 的右上面）突出一侧的部位，提供具有马达和齿轮等的自转驱动装置 114。保持装置 39 通过启动自转驱动装置 114 在构件 40 内转动。另外，旋转管 112，112 分别与导入管 46 和排放管 47 连接，通过固定在靠近构件 40 安装的结构上的旋转接头 115 连接。作为旋转接头 115，使用了已知的接头，它能够连接两种类型的管型部件（旋转管 112，112 和管 46，47），同时允许相互转动和相互连接。通过所述接头，即使旋转管 112，112 是通过操作自转驱动装置 114 转动的，旋转力也不会传递到每一个管 46 和 47 上。

辐射器 42 是用磁电管（未示出）作为微波来源的已知装置。本文

省略了对该装置的详细说明。

支撑轴 44 是中空的管,并且将导入管 46 和排放管 47 的末端部分纳入其中。更具体地讲,在每一个支撑轴 44,44 的外周表面的位于支撑部件 36,36 内部和附近的位置上形成了掏槽孔 117。将从旋转管 112,112 上延伸的管 46 和 47 插入掏槽孔 117。

支撑部件 36 包括安装在内侧的第一支撑部分 120,用于可旋转地支撑支撑轴 44,44,和安装在第一支撑部分 120 外侧的接头支撑部分 122,用于支撑旋转接头 121,该接头的结构与上述旋转接头 115 的结构相同。由支撑部件 36 支撑的旋转接头 121(图 3 中的左侧)与插入支撑轴 44 的左侧的排放管 47 和出口管 24B 相互可旋转地连接。另一方面,通过支撑部件 36 支撑的旋转接头 121(图 3 中的右侧)与插入支撑轴 44 右侧的导入管 46 和入口管 24A 可相互旋转地连接。另外,在支撑部件 36 上(图 3 中的右侧)提供了具有马达和齿轮等的旋转驱动装置 124。可以通过操纵旋转驱动装置 124 转动支撑轴 44,44。如上文所述,当支撑轴 44,44 转动时,构件 40 和保持装置 39 同时绕支撑轴 44,44 转动(旋转)。插入支撑轴 44 的导入管 46 和排放管 47 各自被设计成在旋转期间不会与底座 33 相互干扰。更具体地讲,它们具有适当的长度,并且被安装成通过底座 33 和支撑轴 44 之间的空间。参见图 10,当支撑轴 44 从图 10(A)所示状态旋转 180°(半周)时,构件 40 被转动。结果,保持装置 39 的上/下和右/左的位置关系颠倒了,参见图 10(B)。更具体地讲,保持装置 39 不仅可以通过自转驱动装置 114 自转,而且还可以通过旋转驱动装置 124 旋转。当保持装置 39 旋转时,血管组织 B 的上/下和右/左的位置关系颠倒了。注意图 3 中的附图标记 125 表示旋转驱动装置 124 的开关。注意,可以提供冷却装置,用于冷却导入管 46 的外周,以便防止溶液温度提高。

下面将说明将异种生物瓣膜 V 放入按上述方法制造的保持装置 10B 中的过程,以及保持装置 10B 在设定时间内的功能。

首先,在图 3 所示状态下,旋转管 112 从旋转接头 115 中释放出来。然后,通过转动将管螺母 111 松开,并且从保持装置 39 中取出,

以便将保持装置 39 从旋转管 112, 112 中取出。然后, 取出末端部件 68, 68, 并且将流入部分 62 和流出部分 63 从筒形部件 61 中取出。然后, 在保持流入部分 62 的顶部 79, 79 和流出部分 63 的顶部 79 可以彼此相对的条件, 参见图 5, 将包括主动脉瓣 V 的猪血管组织 B 的两端分别插入顶部 79, 79, 然后通过结合部件 (未示出) 分别固定在止动槽 85, 85 上。血管组织 B 被设定为这样的方向, 使得溶液可以通过主动脉瓣 V (导向阀) 从图 5 的右侧流向左侧。然后, 通过血管组织 B 连接的流入部分 62 和流出部分 63 再次返回筒形部件 61, 并且末端部件 68, 68 与筒形部件 61 连接, 并且保持装置 39 接合在旋转管 112, 112 中, 参见图 3。这样, 就完成了血管组织 B 的装配。

在细胞排除过程中, 通过旋转管 112 将细胞排除溶液从导入管 46 输送到流入部分 62 的插入管 78。此时, 流入部分 62 和流出部分 63 的插入管 78, 78 被设定在侧孔 105 和锥形管 77 的侧面通道 92 处于完全连通状态的位置, 参见图 5。通过这种结构, 输送给流入部分 62 的细胞排除溶液通过流入部分 62 的顶部孔 104 和主通道 91 进入血管组织 B, 通过主动脉瓣 V, 并且进入流出部分 63 的主通道 91。同时, 相同量的溶液流过侧孔 105 和流入部分 62 的子通道 92, 通过筒形部件 61 的内部空间, 并且进入流出部分 63 的侧面通道 92, 以便绕过血管组织 B。细胞排除溶液通过流出部分 63 的主通道 91 和侧面通道 92, 并且从流出部分 63 的插入管 78 中流出, 通过旋转管 112 排放到排放管 47 中, 参见图 3。因此, 在流入部分 62 和流出部分 63 上的主通道 91 和顶部孔 104 构成了通过管状活体组织 (血管组织 B) 相互连通的第一通道, 而在流入部分 62 和流出部分 63 中的每一个上提供的侧面通道 92 和侧孔 105 构成了通过在活体组织 (血管组织 B) 的外侧形成的迂回径路相互连通的第二流体通道。

在实施上述细胞排除过程时, 操作辐射器 42 和自转驱动装置 114。保持装置 39 是自转的, 同时向保持在保持装置 39 中的血管组织 B 施加微波。通过这种操作, 可以在血管组织 B 的整个圆周方向上均匀地实施细胞排除作业。所述细胞排除作业优选是在检查血管组织 B 内和

外的溶液温度的条件下进行的，通过使用插入第一和第二导向槽 109A, 109B 的热传感器（未示出）（参见图 5）来完成。在这种场合下，细胞排除溶液实际上能够以相同的流速在血管组织 B 的内部和外部流动，以便在它们之间不存在温差。可以通过插入第一和第二导向槽 109A 和 109B 的热传感器（未示出）检查它们之间的温差。注意，当内部和外部的温度达到人体温度（例如，37°C）时，辐射器 42 自动停止辐射微波。反之，当温度低于体温时，它自动地开始辐射微波。该实施方案的辐射器 42 可以施加频率为 2.45 GHz，功率为大约 0-1200 W 的微波。注意，所述温度传感器可以通过设置在排放管 47 中间的孔导入第一通道。

另一方面，在实施细胞接种过程中，停止了通过辐射器 42 施加微波和保持装置 39 的自转。通过转动并且松开轴环部分 97，以及将筒形部分 95 从图 5 所示状态旋转 to 侧孔 105（参见图 5 等）和侧面通道 92 之间的联系完全切断的状态来改变插入管 78，78 在保持装置 39 内的位置。然后，将含有细胞的溶液输送到流入部分 62 的插入管 78。含有细胞的溶液然后通过流入部分 62 的顶部孔 104 和主通道 91 到达血管组织 B，通过主动脉瓣 V，流入流出部分 63 的主通道 91，并且随后从流出部分 63 的插入管 78 中排除。在此操作期间，插入管 78，78 被放置在侧面通道之间的联系被切断状态的位置。因此，含有细胞的溶液不会流到血管组织 B 外面，与上面提到的细胞排除过程的情况不同。

在实施细胞接种过程中，启动了如图 3 所示的旋转驱动装置 124。保持装置 39 与构件 40 一起绕支撑轴 44，44 旋转，其结果是保持装置 39 沿图 10 所示方向旋转成颠倒状态。由于保持装置 39 旋转，含有细胞的溶液的自体细胞可以均匀地附着在血管组织 B 上，而没有重力效应。

下面将结合图 1 等说明通过使用活体组织处理设备 10 排除和接种细胞的方法。

首先，将包括主动脉瓣 V 的血管组织 B 从诸如猪的动物体内取

出。按上述方法将血管组织 B 放入保持装置 10B。将细胞排除溶液注入活体组织处理设备 10，然后循环。作为细胞排除溶液，使用了诸如脱氧胆酸（胆酸），十二烷基硫酸钠（SDS），或 Triton X-100 的表面活性剂。此时，细胞排除溶液在活体组织处理设备 10 中循环，同时按上述方法保持所述溶液的状态接近于人体流动状态，

在按压开关（未示出）时，图 1 所示的吸入/供给装置 11 被启动。然后，细胞排除溶液通过驱动泵 12 的脉动通过循环通道 13 循环。更具体地讲，从驱动泵 12 中喷出的细胞排除溶液以实际上相当于人体常见大动脉压力的压力流过上游管 L1，通过设置在上游管 L1 中间的保持装置 10B，并且到达阻力形成装置 23，以便产生相当于人体外周阻力的阻力。从阻力形成装置 23 流出的细胞排除溶液通过连接泵 28，并且以实际上相当于左心房的压力的大约 10 mm Hg 的压力流入驱动泵 12。

此时，在保持装置 10B 上，细胞排除溶液流过保持在保持装置 39 中的血管组织 B 内部和外部，其流动状态相当于流过人体大动脉的血流的状态；与此同时，对按上述方法通过保持装置 39 的自转转动的血管组织 B 施加微波。这样，将各种类型的原始细胞（内皮细胞，成纤维细胞，平滑肌细胞）从取自动物的血管组织 B 中排除。结果，留下了仅由胶原组成的基质。在本实施方案中，微波被设定为频率为 2.45 GHz，功率为大约 100 W - 500 W，不过并不局限于这种条件。不过，微波功率可以在预定范围内改变，只要微波不会对血管组织 B 产生任何变性（对人体有害），并且产生预定的细胞排除效果就行。另外，可以使用频率不同的电磁波和声波。再者，细胞排除溶液的流动即使不与血液流动类似也是可行的。换句话说，搏动流也是可以接受的。

在细胞排除溶液从活体组织处理设备 10 中排除之后，将生理盐水注入活体组织处理设备 10。在装置 10 通过循环生理盐水洗涤之后，将生理盐水从活体组织处理设备 10 中排除。然后，将诸如纤连蛋白的黏合剂直接注入保持装置 39 的第一通道，以便关闭流入部分 62 和流出部分 63 的开口端。这样，将业已排除了细胞并且保持在保持装置

39 中的血管组织 B 在所述黏结剂中浸泡预定的时间。然后，将黏结剂从保持装置 39 中排除，并且将含有细胞的溶液注入保持装置 39。含有细胞的溶液是通过以下方法制备的：采集受体的自体细胞（内皮细胞，成纤维细胞和/或平滑肌细胞），培养预定的时间，并且添加到预定的培养液中。作为培养液，任何培养液都可以使用，只要它可用于细胞接种过程就行。这种培养液的例子包括 M199（培养基 199，由 Life Technologies 公司生产）。与黏结剂的情况相同，将业已排除了细胞的血管组织 B 在含有细胞的溶液浸泡预定的时间，然后启动循环装置 10A，以便使含有细胞的溶液在活体组织处理设备 10 循环，其流动状态与人体的血液流动相当。这样，将业已排除了细胞的血管组织 B 放入以相当于通过人类大动脉的血液流动状态流动的含有细胞的溶液中，将自体细胞接种到血管组织 B 中。在通过循环装置 10A 产生搏动流之前，启动旋转驱动装置 124（参见图 3）。这样，浸泡在含有细胞的溶液的血管组织 B 以颠倒的方式旋转，以便将含有细胞的溶液均匀地结合在血管组织 B 的实际上的整个区域，而没有重力效应的影响。注意，这种旋转作业可以在产生含有细胞的溶液的搏动流期间连续地进行。

根据这样一种实施方案，可以显著提高细胞排除效果和细胞接种效果。与此同时，细胞排除过程和细胞接种过程可以按一定的操作顺序进行，同时将血管组织 B 保持在保持装置 39 中。与移植相关的异种生物瓣膜的处理可以在短时间内简单地进行。另外，由于这种系列操作可以在一个密封的通道中进行，异种生物瓣膜可以保持清洁，同时防止污染。

然后，本发明人进行了实验，以便验证基于本发明的细胞排除效果和细胞接种效果。

(1) 细胞排除效果实验

[例 1]

在例 1 中，将 37°C 的胆酸用作细胞排除溶液。将胆酸注入循环装

置 10A, 并且让它流动, 以便相当于人类大动脉中的血液流动 (搏动流)。让包括主动脉瓣的猪血管组织在所述液流中单独待 24 小时。此时, 循环装置 10A 在以下条件下工作: 平均流速: 5 L/分钟, 驱动泵 12 的搏动速度 (搅打速率): 70 次/分钟, 胆酸的平均液压: 大约 90 mmHg, 而液体的最大压力和最小压力可以分别相当于典型人体的最大和最小脉压。在处理之后, 在显微镜下观察血管组织, 并且通过照相机拍摄放大的图像。对保留在血管组织中的原始细胞 (内皮细胞和成纤维细胞) 进行计数, 以便获得单位面积 (1 mm^2) 的平均原始细胞数量。

结果, 参见图 11, 单位面积上保留了大约 850 个原始细胞。

[例 2]

在例 2 中, 除了例 1 的条件之外, 对血管组织施加预定的微波, 同时通过保持装置 10B 旋转。在这里使用了频率为 2.45 GHz 的微波, 并且在以下三种不同条件下通过改变功率和辐射时间施加: 100 W 的功率 8 小时, 500W 的功率 12 小时, 和 500 W 的功率 24 小时。在所有场合下, 血管组织以自转的方式每分钟旋转 4 次。以与例 1 相同的方式对保留在血管组织中的原始细胞进行计数, 并且获得了单位面积 (1 mm^2) 的平均细胞数量。

结果, 在以 100 W 的功率施加 8 小时的微波时, 在单位面积上保留了大约 380 个原始细胞。另一方面, 在以 500 W 的功率施加 12 小时和 24 小时的微波的条件下, 没有观察到保留的原始细胞。另外, 原始组织中所包含的蛋白实际上被排除了。在所有场合下, 胶原和弹性蛋白实际上不受影响。

[比较例 1]

作为例 1 和 2 的比较例进行了一项实验。将在例 1 所使用的血管组织浸泡在胆酸中, 在容器中静置 24 小时。对血管组织中保留的原始细胞进行计数, 以便以与例 1 相同的方式获得单位面积 (1 mm^2) 的平

均原始细胞数量。

结果，参见图 11，单位面积上保留了大约 970 个原始细胞。

在进行细胞排除过程之前的起始条件下，在用于例 1 和 2 和比较例 1 中的血管组织中单位面积 (1 mm^2) 存在 1880 个原始细胞。

根据以上结果，很显然，在例 1 和例 2 中排除的原始细胞的数量明显大于在比较例 1 中排除的原始细胞的数量。因此，验证了高的细胞排除效果。具体地讲，在比较血管组织被简单地浸泡在胆酸的搏动流中的场合（例 1）与除了浸泡处理之外额外实施微波辐射的场合相比时，在后一种情况下细胞排除效果更好。当微波频率从 100 W 到 500 W 时，原始细胞不能保留下来。注意，尽管这里省略了详细说明，上面所提到的微波可施加在浸泡在胆酸中的血管组织上，允许它保留静止不动。这种情况的细胞排除效果好于比较例 1 的效果。

(2) 细胞接种效果的实验

[例 3]

在例 3 中，在细胞排除过程之后，用生理盐水洗涤血管组织大约 1 小时，并且在纤连蛋白中浸泡 4 小时。与此同时，从要移植的受体的活体中取出自体细胞（内皮细胞），以便制备含有细胞的溶液。这里所使用的含有细胞的溶液是通过以下方法制备的：在含有 M199 的培养平板上培养所采集的自体细胞 5 天，用胰蛋白酶排除培养平板上培养的自体细胞，并且添加到 M199 中。所述细胞在补充了 FBS（胎牛血清 IWK-500，由 Iwaki 生产），抗生素（青霉素/链霉素混合溶液），和 FGF-2（由 Peppo Tech Ec Ltd. 生产）的 M199 中培养。

然后，将血管组织在含有细胞的溶液中浸泡大约 4 小时，同时上下转动血管组织。在细胞接种过程之后，在显微镜下观察血管组织，并且用照相机拍摄血管组织的放大图像。观察接种在血管组织中的自体细胞（内皮细胞）的状态。

结果，发现自体细胞被接种到实际上整个血管组织中，参见图 12。实际上，在血管组织的单位面积 (1 mm^2) 上平均结合了大约 850 个自

体细胞。在血管组织的单位面积 (1 mm^2) 上由自体细胞所占据的面积的比例 (粒度) 平均为大约 18%。

[例 4]

在例 4 中, 在以与例 3 相同的步骤处理血管组织之后, 让含有细胞的溶液在与例 1 相同的流动条件下在循环装置 10A 中循环。

更具体地讲, 在血管组织浸泡在含有细胞的溶液中保持静止不动大约 48 小时之后, 将它上下旋转大约 4 小时。然后, 让含有细胞的溶液流动, 以便相当于人体大动脉中的血液流动。将血管组织单独留在所述液流中一小时。然后, 用与例 3 相同的方式观察接种在血管组织中的自体细胞的状态。

结果, 发现自体细胞实际上被均匀地接种在血管组织的所有部位, 并且自体细胞沿含有细胞的溶液的流动方向排列, 参见图 13。另外, 与例 3 相比, 细胞密度提高了, 这是因为自体细胞的增殖。在本实施例中, 结合在单位面积 (1 mm^2) 的血管组织上的自体细胞的数量平均为大约 2170。在单位面积 (1 mm^2) 的血管组织上由自体细胞所占据的面积的比例 (密度) 平均为大约 63%。

[例 5]

例 5 是按照与例 4 相同的方式实施的, 所不同的是, 保持血管组织在含有细胞的溶液中静止不动的步骤和上下转动血管组织的步骤是按相反的顺序进行的。更具体地讲, 在本实施例中, 浸泡在含有细胞的溶液中的血管组织上下转动大约 4 小时, 然后在静止状态下将血管组织浸泡在含有细胞的溶液中 48 小时。然后, 让所述含有细胞的溶液流动, 以便相当于大动脉中的人体血液流动, 并且让血管组织单独留在所述液流中一小时。其他条件与例 4 相同。然后, 按照与例 4 相同的方法观察接种在血管组织中的自体细胞的状态。

结果, 自体细胞以与例 4 相同的方式增殖并且增加密度。除此之外, 与例 4 相比, 自体细胞更均匀地接种在所有部位。

[例 6]

例 6 是以与例 5 相同的方式进行的，所不同的是，将血管组织留在按照与例 5 相同的条件制备的含有细胞的溶液的液流中的时间被设定为 48 小时。

结果，接种的细胞增殖并且覆盖血管组织的实际上整个表面。

[例 7]

例 7 是以与例 6 相同的方式进行的，所不同的是，改变了含有细胞的溶液的流动条件。更具体地讲，将含有细胞的溶液的平均流速设定为 2 L/分钟，将含有细胞的溶液的平均液体压力设定为大约 20 mmHg。

结果，实际上获得了与例 6 相同的效果。换句话说，如果采用本发明的细胞接种方法的话，即使含有细胞的溶液的流动条件根据受体（要移植的患者）的血液流动状态和心脏瓣膜定位而改变，接种在血管组织中的自体细胞也可以增殖并且覆盖它的几乎整个表面。因此，一般来说，可以制备生物瓣膜，以便满足从成年人到儿童的心脏瓣膜的条件，这些人在体内的血液循环量不同，并且它们的血压也不同。

[比较例 2]

作为例 3-7 的比较例进行了一项实验。使血管组织单独留在溶液中，而不上下转动，以便与例 3 进行比较，并且按照与例 3 相同的方式观察接种到血管组织中的自体细胞的状态。

结果，接种了自体细胞，但是非均匀地分布在血管组织中。因此，接种在血管组织中的自体细胞的数量与例 3-7 相比显著减少了。

根据上述结果，在例 3-7 中与所述组织结合的自体细胞数量显著大于比较例 2 中的数量。就是说，获得了高的细胞接种效果。具体地讲，当血管组织浸泡在含有细胞的溶液的搏动流中时，改善了细胞的定向。另外，激活了细胞，并且改善了细胞的功能，其结果是可以接

种更大数量的细胞。

本发明可应用于其他活体组织的细胞排除过程，正如在本实施方案中所披露的，它的血液与含有主动脉瓣的血管组织以外的组织接触。另外，本发明可用于处理同种异体生物瓣膜，而不是异种生物瓣膜。

在本发明的细胞排除方法中，在本实施方案中所披露的活体组织处理设备 10 中实际上不是必须使用的。可以使用各种设备和装置，只要它们能排除细胞就行。换句话说，任何装置都可以使用，只要它能在细胞排除过程中提供溶液的预定的搏动流用于浸泡活体组织和/或它可以对活体组织施加微波就行。

正如上文所披露的，根据本发明，存在于诸如异种生物瓣膜的活体组织中的原始细胞可以排除，并且在移植之后活体组织的生物兼容性可以提高。

工业实用性

本发明可用于将从包括人在内的动物体内取出的生物瓣膜处理成能够移植到人体中的状态。

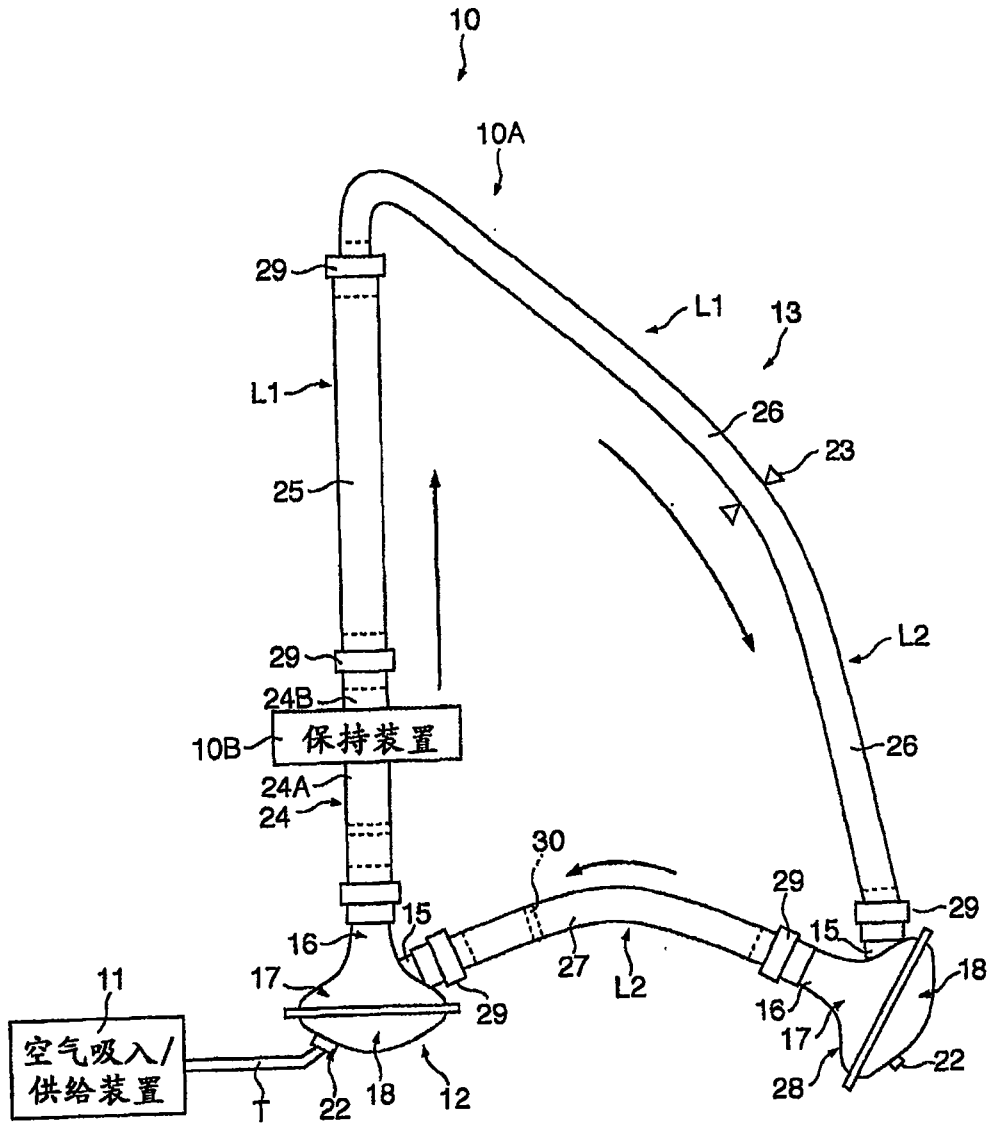


图1

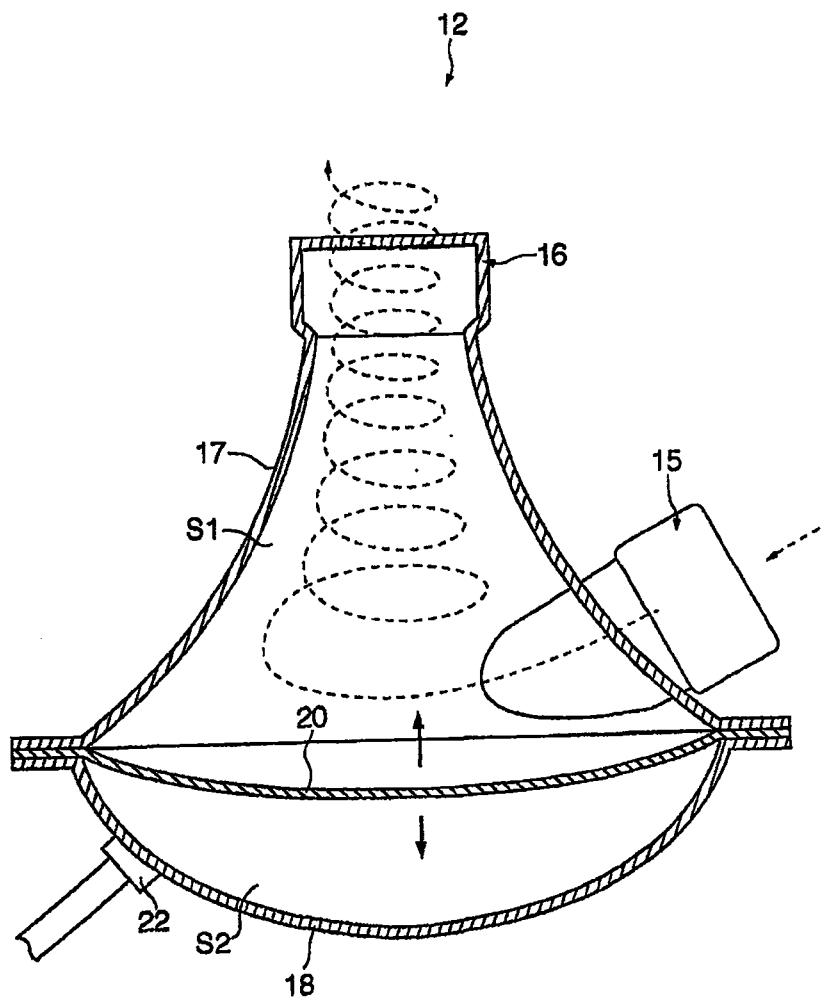


图 2

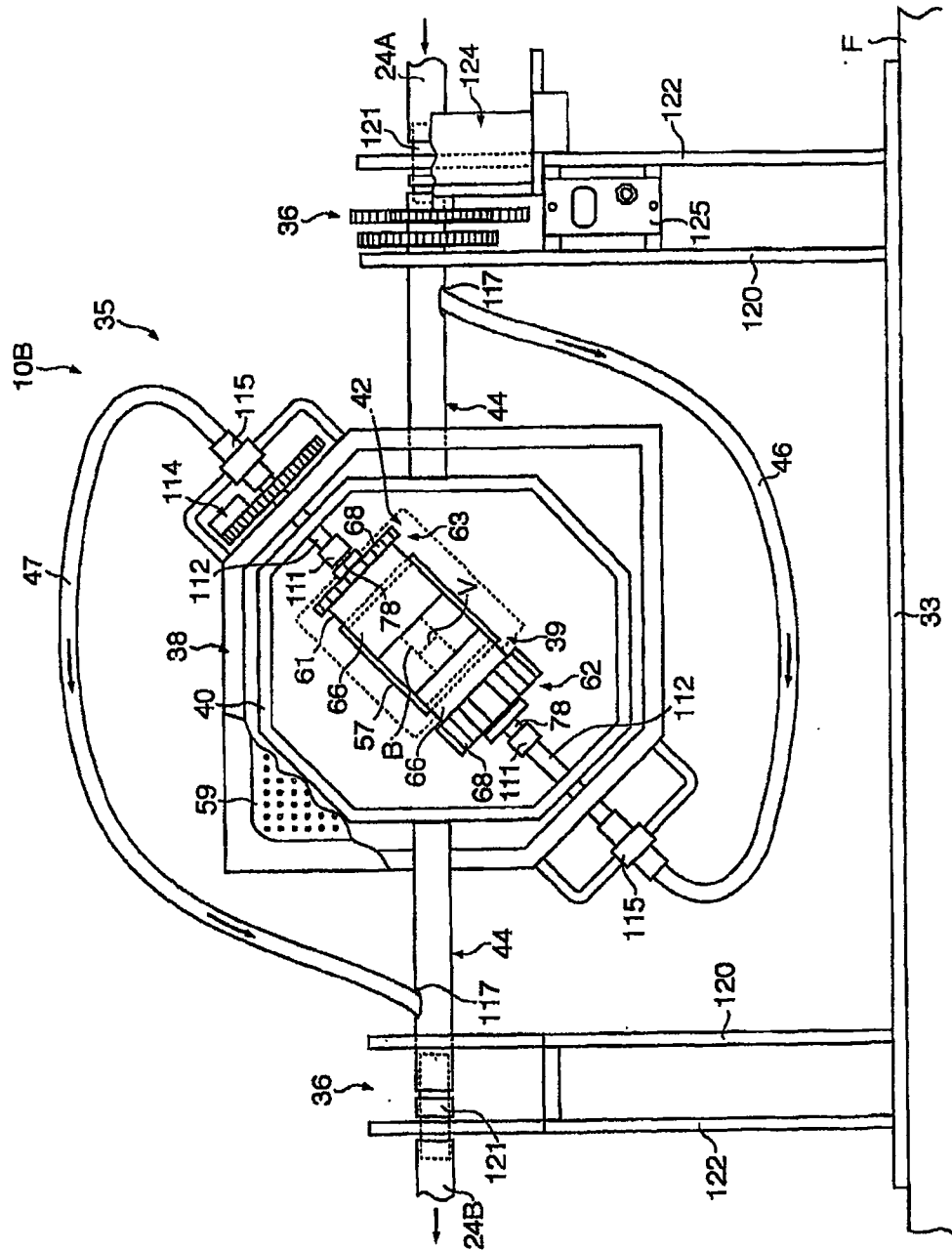


图 3

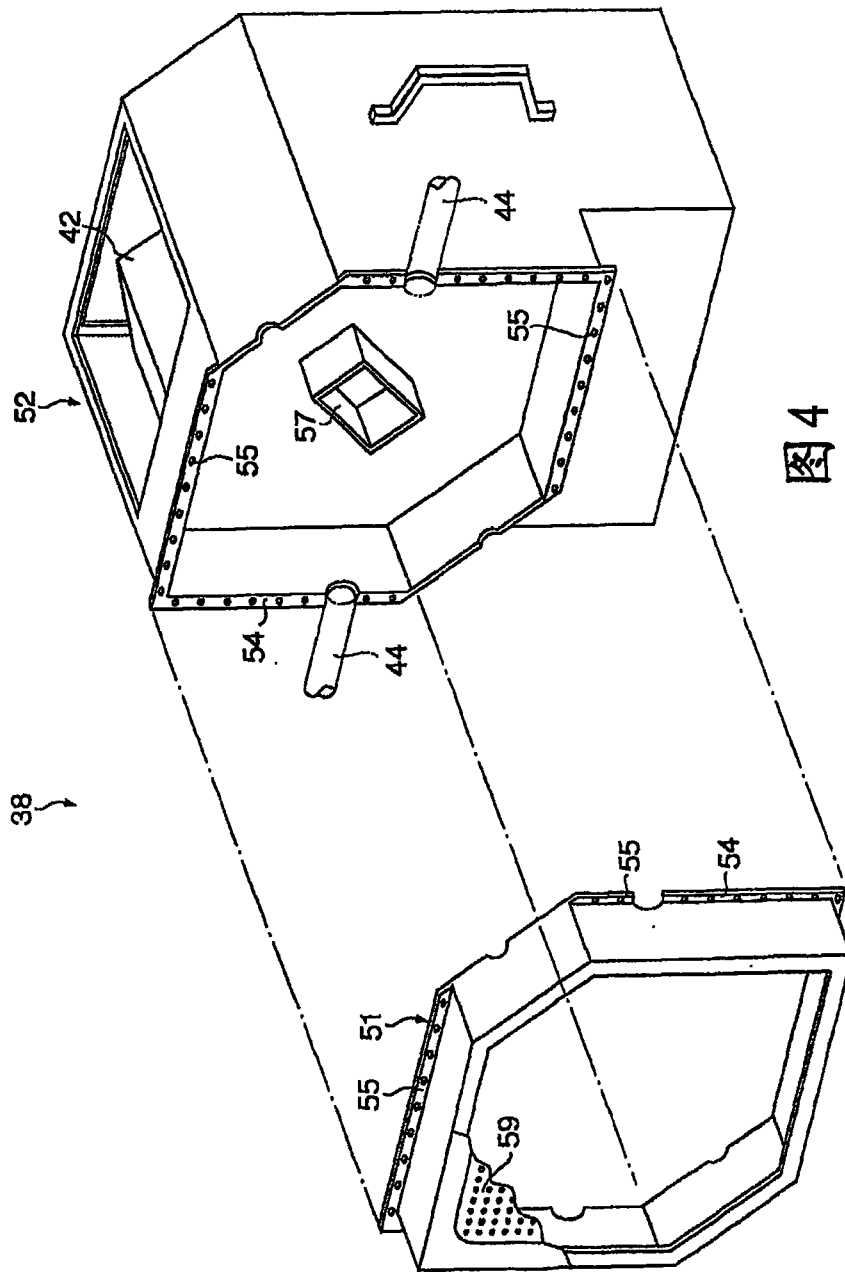


图4

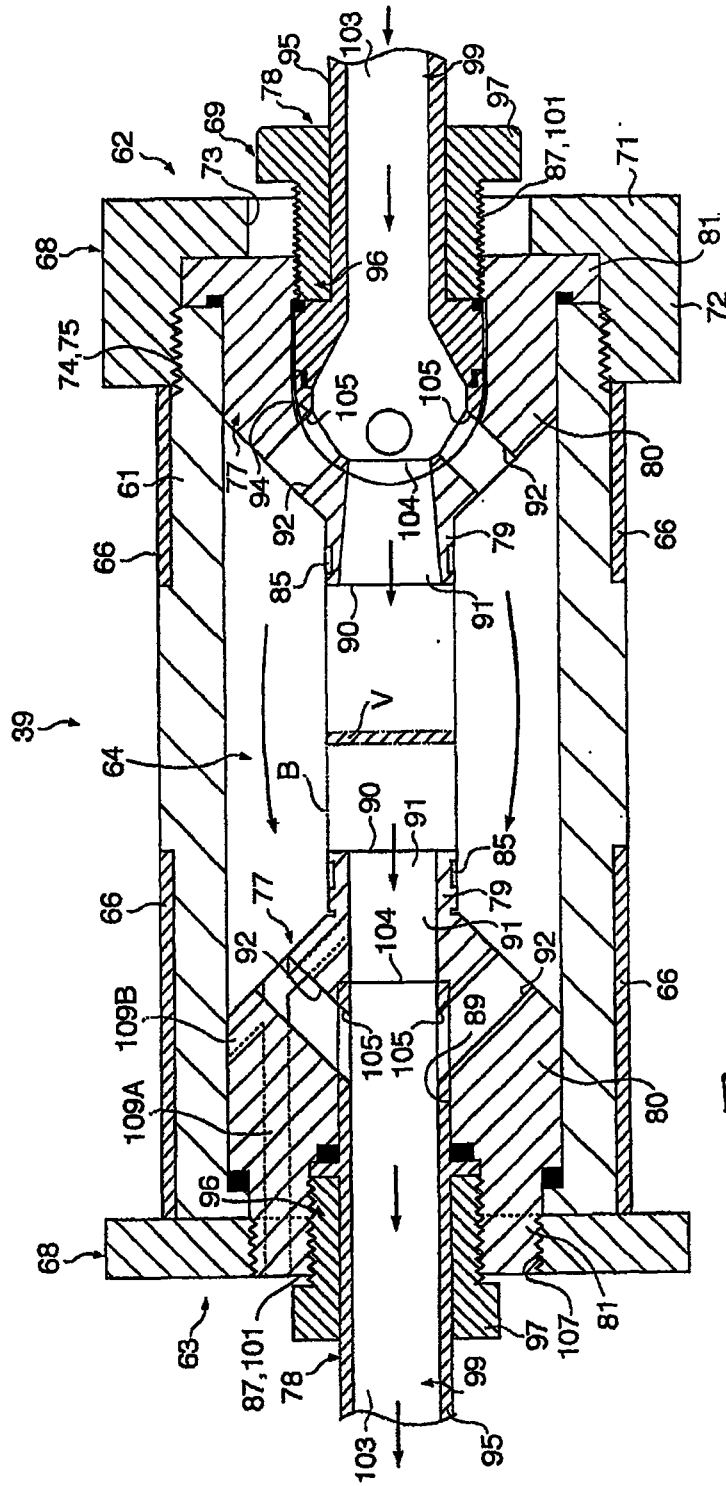


图5

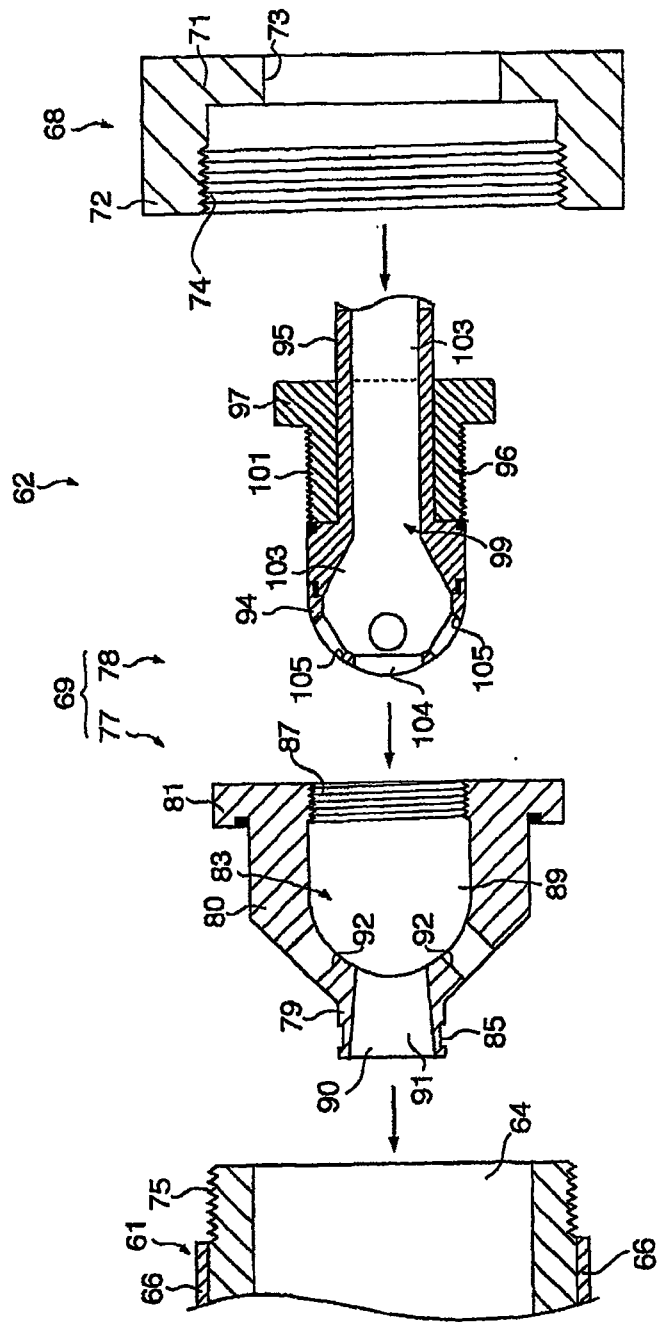


图6

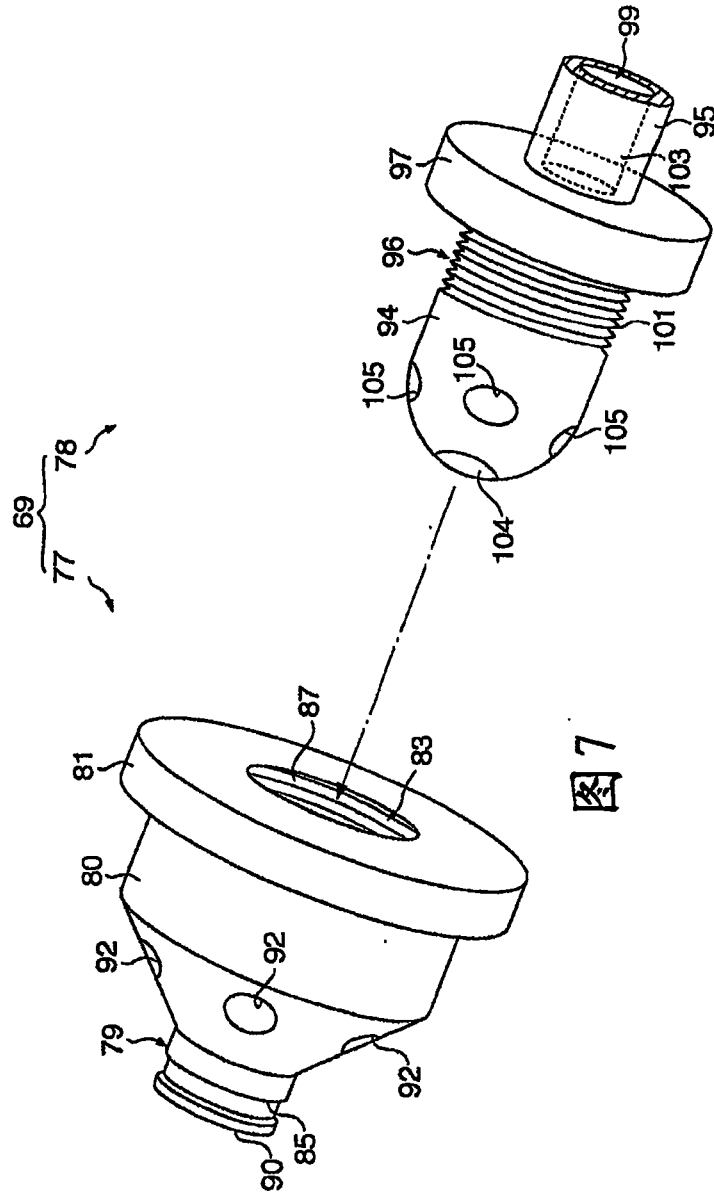
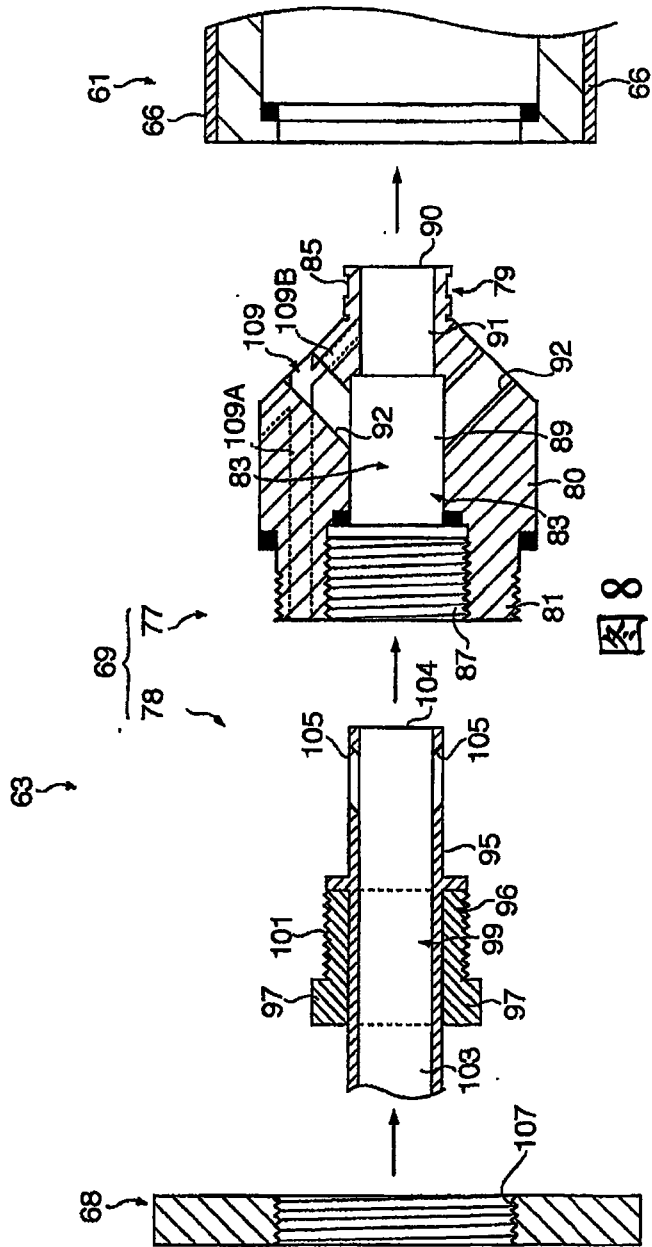


图 7



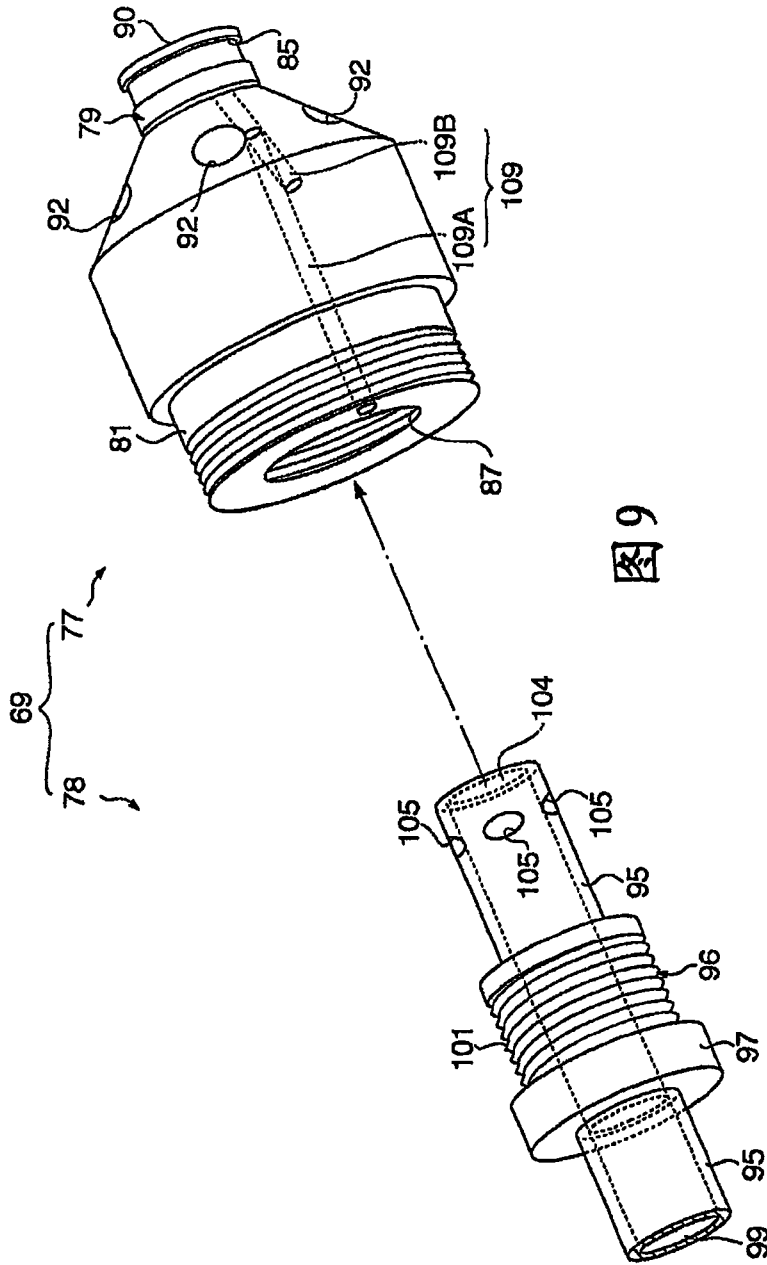
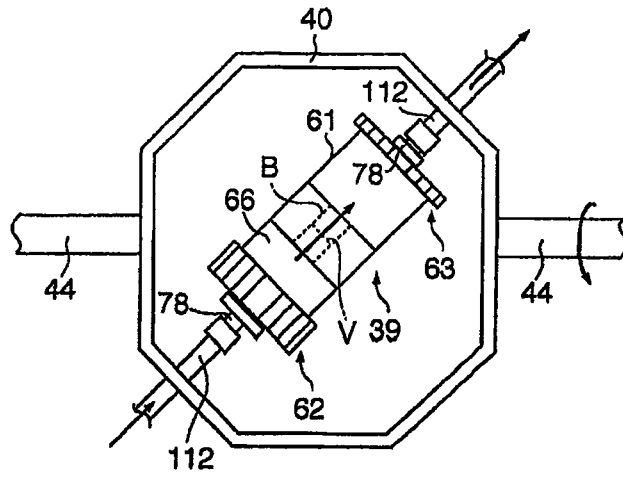


图9

(A)



(B)

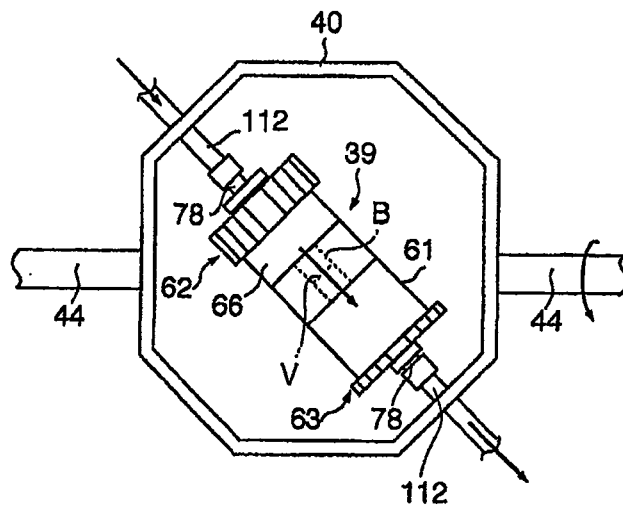


图10

	条件	单位面积上残余 细胞数 (个数/mm ²)
实施例1		850
实施例2	100W 8小时	380
	500W 12小时	0
	500W 24小时	0
比较 实施例1		970
	未处理	1880

图11

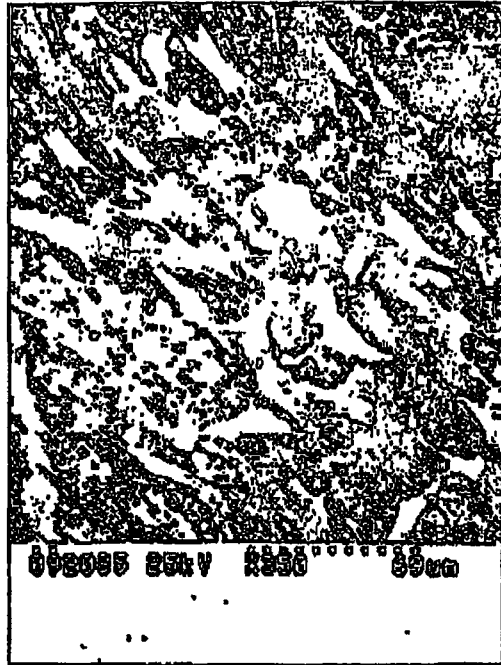


图12

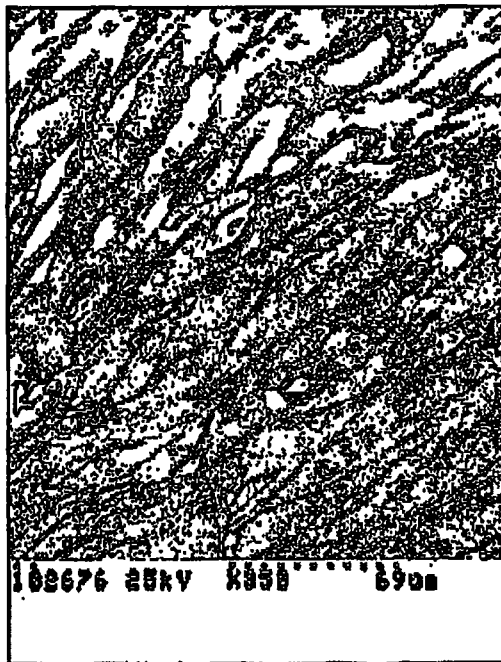


图13