

(12) 特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局

(43) 国際公開日
2016年1月28日(28.01.2016)



(10) 国際公開番号

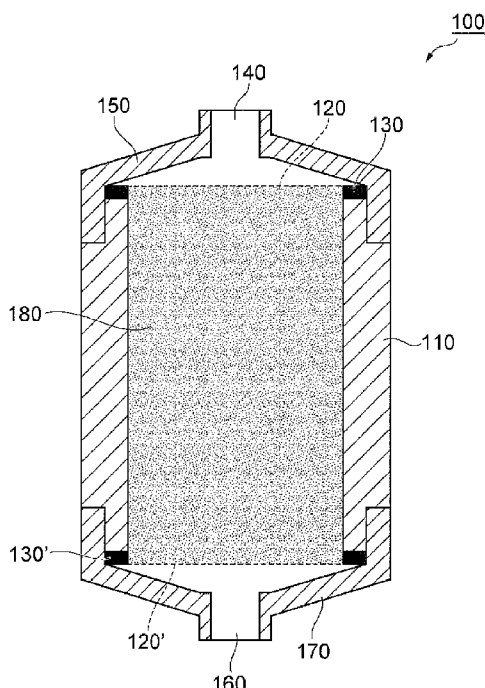
WO 2016/013540 A1

- (51) 国際特許分類:
B01J 20/26 (2006.01) A61M 1/36 (2006.01)
A61M 1/02 (2006.01)
- (21) 国際出願番号: PCT/JP2015/070675
- (22) 国際出願日: 2015年7月21日(21.07.2015)
- (25) 国際出願の言語: 日本語
- (26) 国際公開の言語: 日本語
- (30) 優先権データ:
特願 2014-148771 2014年7月22日(22.07.2014) JP
特願 2014-189364 2014年9月17日(17.09.2014) JP
- (71) 出願人: 旭化成メディカル株式会社(ASAHI KASEI MEDICAL CO., LTD.) [JP/JP]; 〒1018101 東京都千代田区神田神保町一丁目105番地 Tokyo (JP).
- (72) 発明者: 桐山 健太郎(KIRIYAMA, Kentaro); 〒1018101 東京都千代田区神田神保町一丁目105番地 Tokyo (JP). 井上 覚(INOUE, Satoru); 〒1018101 東京都千代田区神田神保町一丁目105番地 Tokyo (JP). 畑中 美博(HATANAKA, Yoshihiro); 〒1018101 東京都千代田区神田神保町一丁目105番地 Tokyo (JP).
- (74) 代理人: 稲葉 良幸, 外(INABA, Yoshiyuki et al.); 〒1066123 東京都港区六本木6-10-1 六本木ヒルズ森タワー23階 TMI 総合法律事務所 Tokyo (JP).
- (81) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の国内保護が可能): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JP, KE, KG, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

[続葉有]

(54) Title: ADSORBENT FOR REMOVING HISTONE AND PURIFICATION DEVICE FOR LIQUID DERIVED FROM LIVING ORGANISM

(54) 発明の名称: ヒストンを除去する吸着材及び生体由来液浄化デバイス



(57) Abstract: Provided is an adsorbent for removing histone from a liquid derived from a living organism, said adsorbent comprising a water-soluble carrier and a biocompatible polymer. The carrier comprises activated carbon, a polyester, a polysulfone or a cationic functional group. Also provided is a purification device for a liquid derived from a living organism, said device being to be used for removing histone from the liquid and comprising a housing that is provided with an inlet and an outlet for the liquid and the aforesaid adsorbent that is housed within the housing. The liquid derived from a living organism passes through the housing of the device and thus histone is removed from the liquid.

(57) 要約: 生体由来液中よりヒストンを除去する吸着材であって、水溶性の担体と、生体適合性ポリマーと、を有する吸着材が提供される。担体は、活性炭、ポリエステル、ポリスルホン、又はカチオン性官能基を備える。また、生体由来液中よりヒストンを除去する為の生体由来液浄化デバイスであって、生体由来液の入口及び出口を備えたハウジングと、ハウジング内に収容された上記吸着材と、を備える生体由来液浄化デバイスが提供される。生体由来液浄化デバイスのハウジング内に生体由来液が流通することにより、生体由来液からヒストンが除去される。



(84) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の広域保護が可能): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), ヨーロッパ (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK,

SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

添付公開書類:

— 国際調査報告 (条約第 21 条(3))

明 細 書

発明の名称：

ヒストンを除去する吸着材及び生体由来液浄化デバイス

技術分野

[0001] 本発明は、生体由来液中のヒストンを吸着する吸着材及びそれを用いた生体由来液浄化デバイスに関する。

背景技術

[0002] 全身性炎症反応症候群（SIRIS）は、感染等が引き金となりサイトカイン等の物質が過剰に放出され全身の炎症状態が亢進した状態と定義され、世界的には1800万人が毎年亡くなっているが、有効な治療法が無い病態である。

[0003] 現在までにSIRISを伴う疾患に対して、過剰に産生された炎症性サイトカインを中和することを目的に抗TNF- α 抗体、IL-1Raなどの臨床試験が試みられてきたが、有効性を証明するには至っていない。

[0004] 単独の炎症性サイトカインをターゲットとした治療の試みが有効な結果を示せてない理由は、SIRISの背景及び症状がさまざまであり、またSIRISを引き起こしているサイトカインは1種類のみではなく、非常に複雑なサイトカインネットワークを形成しているためであると考えられている。

[0005] 従来、血液中よりこれら病因物質を網羅的に除去する血液濾過等の血液浄化療法が注目され、中分子領域のサイトカインを含むタンパク質を除去する技術が提案されている。例えば、濾過・透析による血液浄化療法により、複雑なサイトカインネットワークに関与するメディエータすべてを除去することが試みられている。しかし、多臓器不全に対するサイトカインのモノクローナル抗体投与とは異なった機序による有効性も考えられているが、除去できる量には限界がある。

[0006] そこで、近年これらの炎症性サイトカインを血中から吸着除去することにより、SIRISの治療を行うことを目的とした、炎症性サイトカイン吸着材

に關しての報告がなされている（例えば、特許文献1参照。）。

[0007] さらに最近、S I R Sの病因物質として新たにヒストンが非常に重要であるとの研究結果が開示されている（例えば、非特許文献1、2参照。）。

[0008] このことは、S I R S患者の血中ヒストン濃度が健常人と比較して数十倍～数百倍のレベルにある事、また、炎症モデルマウスがヒストン抗体の投与により回復したことからも検証できる（例えば、非特許文献3参照。）。

[0009] ヒストンは真核生物のクロマチンを構成する主要なタンパクであり、塩基性タンパク質を多く含むため正電荷を帯び、リン酸基由来の負電荷をもつデオキシリボ核酸（DNA）鎖が約二回巻き付き、長いDNA分子を折り畳んで核内に収納する役割をもつ。ヒストンは、H2A、H2B、H3、H4の4種類に分類され、各々2つずつ結合した八量体を形成したヒストン八量体にDNAが巻き付いたものをヌクレオソームと呼ぶ。一方、ヌクレオソーム間のDNA（リンカーDNA）に結合するヒストンはリンカーヒストンと呼ばれ、その代表的なものはヒストンH1と呼ばれる。

[0010] これらヒストンについては、カチオン性であることが知られており、実際、特許文献2、3に開示されている様に、硫酸化セルロースやヒドロキシアパタイト等の塩基性吸着材による除去ターゲットタンパク質の一つである。

先行技術文献

特許文献

[0011] 特許文献1：特表2013-523772号公報

特許文献2：特開2007-92034号公報

特許文献3：特開平8-71412号公報

非特許文献

[0012] 非特許文献1：Xu J1, Zhang X, Pelayo R, Monestier M, Ammolio CT, Semeraro F, Taylor FB, Esmon NL, Lupu F, Esmon CT, 「Extracellular histones are major mediators of death in sepsis」

、Nature Medicine、2009年11月、15、1318-1321、1

非特許文献2：射場敏明、村井美和、長岡功、田部陽子、「敗血症におけるneutrophil extracellular traps (NETs)、damage-associated molecular patterns (DAMPs)、そして細胞死」、日救急医学会誌、2013年、24、827-36

非特許文献3：伊藤隆史、丸山征郎、科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書「敗血症の新規メディエーター“細胞外Histone”のダイナミズムの解析」

発明の概要

発明が解決しようとする課題

[0013] このように、ヒストンは本来生体に必要な機能を有するものであるが、敗血症のような病態においては細胞外に過剰に放出されて病態悪化を引き起こし、生体を死に至らしめる物質である。しかし、ヒストンは真核生物のクロマチンを構成する主要なタンパクであり、DNA分子を折り畳んで核内に収納する非常に重要な役割をもっており、細胞内で生体に必要な機能を有することを考えると、ヒストン活性を阻害する薬剤の投与は、生体に重大な副作用を引き起こす懸念がある。したがって、生体に好ましくない細胞外のヒストンを、選択的に体内から除去する手段が望まれる。そこで、体外循環によるヒストン除去が考えられるが、生体適合性が良好な状態で、つまり、血栓生成が起きることなく、ヒストンを効率的に除去することが難しいという課題がある。

[0014] 例えば、特許文献2に記載の吸着材に利用されている硫酸化セルロースに関しては、その強いアニオン性のために、第Ⅺ因子が活性化され、血液凝固カスケードが活性化され、血栓形成を惹起することが考えられる。また、特許文献3に記載の吸着材に利用されているヒドロキシアパタイトに関しては、強いタンパク質吸着性が知られており、血中の有用なタンパク質まで

吸着除去してしまうことが考えられ、血栓形成を惹起してしまうことが考えられる。いうまでもなく、血液浄化用途に用いられる医療材料には、生体適合性の一つとして抗血栓性が必須であるが、このように、特許文献2，3記載の吸着材は、抗血栓性において、血液浄化用途には不適であり、生体適合性を有していないと考えられる。

課題を解決するための手段

[0015] そこで本発明者らは、生体由来液中のヒストンを選択的に吸着除去し、生体適合性に優れた、血液浄化療法用デバイスを提供する為に鋭意検討を行った。その結果、ヒストン吸着材が生体適合性ポリマーを有すると、血球の付着を抑制し、血栓を生成することなく、ヒストンを生体適合性よく除去できることが明らかとなった。このようなヒストン吸着材を有する血液浄化療法用デバイスは、ヒストンを原因とするSIRS等の治療に使用できる。また、このようなヒストン吸着材を生体由来液と接触させることにより、生体由来液中のヒストンがヒストン吸着材に生体適合性良く吸着され、生体由来液からヒストンを除去することができ、生体に好ましくない細胞外のヒストンを除去することができる。

[0016] すなわち、本発明は、以下の(1)～(15)に示すとおりのヒストン吸着材及び生体由来液浄化デバイスである。

(1) 生体由来液中よりヒストンを除去する吸着材であって、水不溶性の担体と、生体適合性ポリマーと、を備え、担体が、活性炭、ポリエステル、ポリスルホン、又はカチオン性官能基を備える担体のいずれかである吸着材。

(2) 生体適合性ポリマーが、カチオン性官能基を備える、(1)に記載の吸着材。

(3) 担体の形状が、粒子状、不織布状、又は中空糸膜状である、(1)又は(2)のいずれかに記載の吸着材。

(4) 担体が、カチオン性官能基と、ポリエチレンテレフタレート又はスチレンジビニルベンゼン系共重合体のいずれかと、を備える、(1)に記載

の吸着材。

(5) カチオン性官能基がアミノ基である、(4)に記載の吸着材。

(6) アミノ基が第4級アンモニウム基である、(5)に記載の吸着材。

(7) 生体適合性ポリマーが親水性ポリマーである、(1)～(6)のいずれかに記載の吸着材。

(8) 親水性ポリマーがヒドロキシエチルメタクリレート系重合体である、(7)に記載の吸着材。

(9) 生体適合性ポリマーがジメチルアミノエチルメタクリレートを10モル%以上含むポリマーである、(1)～(7)のいずれかに記載の吸着材。

(10) ヒストンがヒストンH3である、(1)～(9)のいずれかに記載の吸着材。

(11) 生体由来液中よりヒストンを除去する生体由来液浄化デバイスであって、体液入口、出口を備えたハウジングと、ハウジング内に収容された(1)～(10)のいずれかに記載の吸着材と、を備え、ハウジング内に生体由来液が流通されることにより、生体由来液からヒストンが除去される、生体由来液浄化デバイス。

(12) 生体由来液が体液である、(11)に記載の生体由来液浄化デバイス。

(13) 体液が血液である、(12)に記載の生体由来液浄化デバイス。

(14) (11)～(13)のいずれかに記載のデバイスを用いて生体由来液からヒストンを除去するヒストン除去方法。

(15) (11)～(13)のいずれかに記載のデバイスを用いて、血液あるいは血漿を通過させ、血液あるいは血漿中からヒストン含有量を減量させ、全身性炎症反応症候群を治療する治療方法。

発明の効果

[0017] 本発明によれば、血栓の生成を抑制可能であり、ヒストンを除去できるヒストン吸着材及び生体由来液浄化デバイスが提供される。

図面の簡単な説明

[0018] [図1]デバイスの一実施形態を示す断面図である。

[図2]デバイスの別の実施形態を示す断面図である。

発明を実施するための形態

[0019] 以下、本発明の好適な実施の形態（以下において、「本実施形態」という。）について詳細に説明する。なお以下の示す本実施形態は、この発明の技術的思想を具体化するための装置や方法を例示するものであって、この発明の技術的思想は構成部材の組み合わせ等を下記のものに特定するものではない。この発明の技術的思想は、特許請求の範囲において種々の変更を加えることができる。

[0020] 本実施形態に係る吸着材は、生体由来液中よりヒストンを除去する吸着材であって、水不溶性の担体と、生体適合性ポリマーと、を備える。吸着材の担体は、活性炭、ポリエステル、又はポリスルホンから本質的になるか、あるいはカチオン性官能基を備える。また、本実施形態に係る生体由来液浄化デバイスは、生体由来液中よりヒストンを除去する為の生体由来液浄化デバイスであって、生体由来液の入口及び出口を備えたハウジングと、ハウジング内に收容された、生体由来液中よりヒストンを除去する上記の吸着材と、を備え、ハウジング内に生体由来液が流通することにより、生体由来液からヒストンを除去する、生体由来液浄化デバイスである。

[0021] （水不溶性の担体）

本実施形態に係る吸着材が備える担体は、水に不溶性である。担体が水に不溶性であることにより、吸着材が血液に接触した際に担体が血液中へ溶出することを防止することができる。本実施形態において、「水不溶性」とは、24時間乾燥させた乾燥状態の吸着材を24時間、純水に浸漬させ、その後、取り出して、60℃で24時間乾燥した後の重量減が10.0wt%以下であることをいう。

[0022] （担体の材料）

水に不溶性の担体の材料としては、活性炭系（単に、「活性炭」ともいう

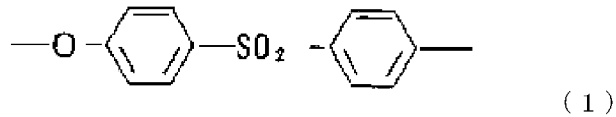
。）、ポリエステル系（単に、「ポリエステル」ともいう。）、及びポリスルホン系（単に、「ポリスルホン」ともいう。）が使用可能である。活性炭系、ポリエステル系、及びポリスルホン系を用いると、工業製品の生産性等に優れる傾向にある。

[0023] また、担体がカチオン性官能基で修飾されている場合、担体の材料としては、活性炭、スチレンジビニルベンゼン系、ポリアミド系、ポリエステル系、ポリウレタン系、ポリスルホン系、ポリスチレン系、ポリエチレン系、ポリプロピレン系、セルロース系、セルロースアセテート系、ポリ（メタ）アクリレート系、セルロース系、セルロースアセテート系、ポリアクリルニトリル系、ポリメタクリル酸メチル系、エチレンビニルアルコール共重合体などのビニル化合物の重合体、セルロース系ゲル、デキストラン系ゲル、アガロース系ゲル、ポリアクリルアミド系ゲル、及び多孔質ガラス等、多孔性構造をとりうる公知の重合体であって、水不溶性であればいずれも用いることができる。これらのうち、活性炭系、ポリエチレンテレフタレート（PET）等のポリエステル系、ポリスルホン系、及びスチレンジビニルベンゼン系（単に、「スチレンジビニルベンゼン」ともいう。）を用いると、工業製品の生産性等に優れる傾向にある。

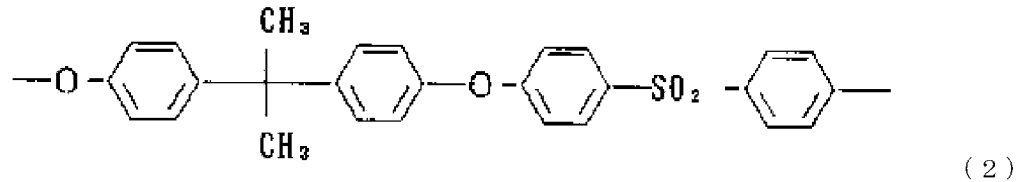
[0024] ここでポリエステル系とは、多価カルボン酸（ジカルボン酸）とポリアルコール（ジオール）との重縮合体のことであり、例えば、PET、ポリブチレンテレフタレート（PBT）、ポリトリメチレンテレフタレート、ポリエチレンナフタレート、ポリブチレンナフタレート等が挙げられるが、工業製品の生産性等から、PET、PBTが特に好ましい。

[0025] ポリスルホン系とは、下記化学式（1）で表わされる繰り返しユニットを含む構造によって特徴づけられるポリアリールエーテルスルホンポリマーのことをいう。例えば、下記化学式（1）で表わされる繰り返しユニットからなるポリマー、及び下記化学式（2）で表わされる繰り返しユニットからなるポリマーがポリスルホン系として挙げられる。

[化1]

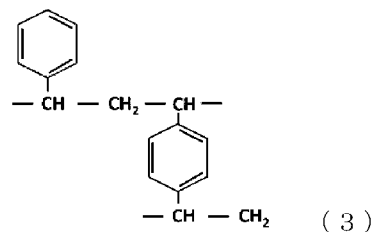


[化2]

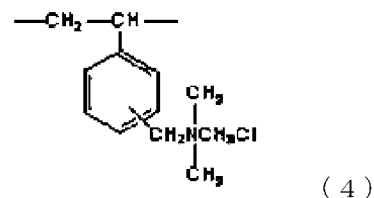


[0026] スチレンジビニルベンゼン系とは、スチレンとジビニルベンゼンを混合し、共重合させることで得られる共重合体であり、ジビニルベンゼンにより架橋されたスチレン骨格を有するスチレンジビニルベンゼンコポリマーである。例えば、下記化学式（３）、（４）で表される繰り返しユニットからなるポリマー等が、スチレンジビニルベンゼン系として挙げられる。

[化3]



[化4]



[0027] （担体の形状）

担体の形状は特に限定されず、粒子状、中空糸状、不織布状、繊維状、シート状、及びスポンジ状のいずれでもよい。粒子状の担体は、生体由来液との接触表面積が良好な傾向にある。

[0028] 粒子状の担体の材料としては、上記の担体を全て用いることができるが、活性炭、及びスチレンジビニルベンゼン系ビーズが、細孔径や表面積の制御

をしやすく、また、医療用具とする際の耐滅菌性等の安全性を確保しやすい傾向にある。

[0029] 不織布状の担体の材料としては、上記の担体を全て用いることができるが、PET不織布、及びPBT不織布が、医療用具とする際の耐滅菌性等の安全性を確保しやすく、また、工業製品としての生産性等がよい傾向にある。

[0030] 中空糸状の担体の材料としては、上記の担体を全て用いることができるが、ポリスルホン系、エチレンビニルアルコール共重合体、及びポリメタクリル酸メチル系の重合体が、医療用具とする際の耐滅菌性等の安全性を確保しやすく、また、工業製品としての生産性等がよい傾向にある。

[0031] 粒子状の担体は、その比表面積と生体由来液の流通性を考慮すると、平均粒径 $50 \sim 1500 \mu\text{m}$ のものが好ましく、全血を通過させる用途の場合、 $100 \sim 1000 \mu\text{m}$ のものが更に好ましい。ここで、粒径とは、顕微鏡で観察した場合の担体の輪郭上の任意の2点を結ぶ直線のうち最も長い直線の長さをいう。また、平均粒径とは、無作為に選択した100個の粒子状担体の粒径の算術平均値をいう。

[0032] 十分なヒストン吸着性能を確保する観点で、粒子担体の表面積は $1 \text{ m}^2/\text{g}$ 以上が好ましく、 $5 \text{ m}^2/\text{g}$ 以上が特に好ましい。担体の表面積は、後述するように、吸着材からコートポリマーを除去した後で測定することができる。

[0033] 吸着材の表面積は、液体窒素温度（77 K）における窒素吸着等温線を測定した後に、BET（JIS Z 8830；気体吸着による粉体（固体）の比表面積測定方法）解析法を用いて算出した表面積を指す。窒素吸着等温線の測定法には、セル内に充填した窒素ガスの圧力低下により担体へ吸着した窒素の量を算出する容量法、担体の重量変化を測定する重量法の2種があるが、どちらを用いて測定してもよい。なお、表面積を測定することができる方法であれば、全て用いることができる。

[0034] 中空糸状の担体を用いる場合には、中空糸内部に血液を流す観点から、中空糸の内径は $10 \sim 1000 \mu\text{m}$ が好ましく、 $100 \sim 300 \mu\text{m}$ が更に好ましい。

- [0035] ここで中空糸内径とは、フィルター担体を構成する中空糸から一部をサンプリングし、電子顕微鏡で観察した写真より測定した平均直径である。
- [0036] 担体が、不織布又は織布の場合、その平均繊維直径は $0.3\mu\text{m}\sim 10\mu\text{m}$ とすることができ、 $0.3\mu\text{m}\sim 3\mu\text{m}$ であることが好ましく、 $0.5\mu\text{m}\sim 1.8\mu\text{m}$ であることが更に好ましい。平均繊維直径が $0.3\mu\text{m}$ 以上である場合、血液を濾過する際の圧力損失が適度となり、また赤血球が溶血しにくくなる傾向にある。
- [0037] ここで平均繊維直径とは、フィルター担体を構成する不織布又は織布から一部をサンプリングし、電子顕微鏡で観察した写真より測定した平均直径である。
- [0038] これらの担体を例示すると、粒子状の担体の例としては、ダイヤイオン（三菱化学（株）社製）、旭化成マイクロキャリア（旭化成（株）社製）、CM-セルロファイン（登録商標）CH（排除限界タンパク質分子量：約 3×10^6 、生化学工業（株）販売）などのセルロース系担体、特公平1-44725号公報記載の全多孔質活性化ゲルや、CM-トヨパール（登録商標）650C（排除限界タンパク質分子量： 5×10^6 、東ソー（株）製）などのポリビニルアルコール系担体、CM-トリスアクリルM（CM-*Trisacryl M*）〔排除限界タンパク質分子量： 1×10^7 、スウェーデン国ファルマシア-*LKB*（*Pharmacia-LKB*）社製〕などのポリアクリルアミド系担体、セファロースCL-4B（*Sephacrose CL-4B*）〔排除限界タンパク質分子量： 2×10^7 、スウェーデン国ファルマシア-*LKB*（*Pharmacia-LKB*）社製〕などのアガロース系担体などの有機質担体、及びCPG-10-1000〔排除限界タンパク質分子量： 1×10^8 、平均細孔径： 100nm 、米国エレクトロ-ニュークレオニクス（*Electro-nucleonics*）社製〕などの多孔性ガラスなどの無機質担体が挙げられる。
- [0039] 中空糸状の担体の例としては、APS（旭化成メディカル株式会社製）、KF-C（旭化成メディカル株式会社製）、トレライトNV（東レ株式会社

製)、YHF((株)ユアサメンブレンシステム社製)、及びステラポアー(三菱レイヨンアクア・ソリューションズ株式会社製)などが挙げられる。

[0040] 不織布状の担体の例としては、セパセル(旭化成メディカル株式会社製)、ベンリーゼ(旭化成せんい株式会社製)、エルタス(旭化成せんい株式会社製)、マイクロウェーブ(旭化成せんい株式会社製)、アクスター(東レ株式会社製)、クラレックス((株)クラレ社製)、デルポア(三晶株式会社製)、及びシャイファイン(東洋紡績株式会社製)などが挙げられる。

[0041] (生体適合性ポリマー)

血液浄化用途に用いる吸着材は、血液との接触を避けることができないため、極力、血液中の無用な反応を惹起してしまわないように、吸着材表面に生体適合性を有することが好ましく、吸着材が生体適合性ポリマーの被覆層を有することが好ましい。ここでいう生体適合性とは、例えば、血液が吸着材を異物として認識しない状態を意味する。吸着材の表面が生体適合性であると、例えば、血小板や白血球の付着などが抑制され、血栓が生成しづらいという効果を得られる。

[0042] 本実施態様の吸着材は、担体と生体適合性ポリマーとを有する。本実施形態における「生体適合性ポリマー」とは、吸着材の担体表面に存在することで、吸着材の生体適合性が向上するポリマーのことをいう。より具体的には、生体適合性ポリマーを吸着材の担体に物理的にコーティングしたり、化学的に結合させたりすることによって、生体適合性ポリマーを付与する前の担体に比べ、担体の抗血栓性が向上するポリマーのことをいう。

[0043] 吸着材に含まれるポリマーの少なくとも一部が生体適合性ポリマーであるかどうかは、以下の手順によって評価できる。

[0044] 1) ポリマーが物理的にコーティングされている場合

吸着材の抗血栓性を測定した後、含まれるポリマーをジメチルスルホキシド等の適切な溶媒へ溶解させる。吸着材からポリマーを除去し、得られた担体を60℃の乾燥機中で1時間以上乾燥させた後、デシケーター内に1時間以上放置する。その後、吸着材からポリマーを除去した担体の抗血栓性を測

定する。吸着材の抗血栓性と担体の抗血栓性を比較したとき、

吸着材の抗血栓性>吸着材からポリマーを除去した担体の抗血栓性となる場合、吸着材に含まれるポリマーは、生体適合性ポリマーである。なお、抗血栓性の測定は、後述するように、吸着材表面を肉眼あるいは走査型電子顕微鏡により観察し、吸着材表面に付着した血小板付着数を直接カウントする、あるいは、吸着材表面に付着した血球のLDH活性を測定する方法等により、評価することができる。抗血栓性を測定できるいずれかの方法によって、担体よりも吸着材の抗血栓性が向上していると評価できる場合、当該吸着材に含まれるポリマーは生体適合性ポリマーである。

[0045] また、吸着材に含まれるポリマーをジメチルスルホキシド等の適切な溶媒へ溶解後、プロトン核磁気共鳴 ($^1\text{H-NMR}$) 測定等を行い、吸着材に含まれるポリマーを同定した時、同定されたポリマーが後に例示する生体適合性ポリマーに該当するポリマーである場合、生体適合性ポリマーと判別することもできる。ポリマーを同定する方法は $^1\text{H-NMR}$ に限定されず、公知の同定方法を全て用いることができる。

[0046] 2) ポリマーが化学的に結合されている場合

吸着材の抗血栓性を測定した後、例えば、強酸及び／又は強アルカリに吸着材を一定時間浸漬させ、ポリマーを除去する。生体適合性ポリマーが吸着材表面から除去されたかどうかは、処理の前後で接触角を測定したり、X線光電子分光 (XPS) 等の表面解析等を行ったりしったりすることで確認することができる。その後、上述の方法を用いて、抗血栓性を評価し、

吸着材の抗血栓性>吸着材からポリマーを除去した担体の抗血栓性が成り立つ場合、吸着材に含まれるポリマーは、生体適合性ポリマーである。

[0047] なお、ポリマーの組成は、XPS、飛行時間型質量分析計 (TOF-SIMS) 等の結果を総合的に判断する事により推定することができるが、測定方法はこれに限定されるものではない。

[0048] また、本実施形態に係るヒストン吸着材においては、生体適合性ポリマー

を付与した後にヒストン吸着能を有しておればよく、本実施形態に係る吸着体は、元来ヒストン吸着能を持たない担体に、生体適合性ポリマーを付与することによってヒストン吸着能を発現するようにしたものも含む。

[0049] 生体適合性ポリマーを含む吸着材を製造する方法は、担体表面に生体適合性ポリマーを付与する方法などの公知技術を利用可能である。

[0050] 生体適合性ポリマーの例としては、ポリアルキレングリコール鎖を有する単量体、重合体又はグラフト共重合体、エチレンービニルアルコール、ポリエステル、ポリー２－メトキシエチルアクリレート（p-MEA）、並びにポリー２－メタクリロイルオキシエチルホスホリルコリン（PMP-C）、ポリビニルピロリドン（PVP）が挙げられる。この中で、重合体中にヒドロキシル基を有していることが、特に血小板の過剰な捕捉を防止できるため好ましく、ポリヒドロキシエチルメタクリレート（p-HEMA）などのHEMA系親水性ポリマーが特に好ましい。HEMA系とは、ポリマー成分中にHEMAを含むポリマーを指し、その他の成分は、任意の成分も用いることができる。例えば、生体適合性ポリマーが、塩基性含窒素部分を含むモノマー単位として、ジメチルアミノエチルメタクリレートを10モル%以上含むと、ヒストン除去率が高くなる傾向にある。また、ヒストン等を吸着する観点から、生体適合性ポリマーはカチオン性の官能基を有することが好ましい。カチオン性の官能基については、後述する。

[0051] （生体適合性ポリマー量）

吸着材に含まれるポリマーの量は、以下の手順により算出される。

生体適合性ポリマーを担持させる前の担体を60℃に設定した乾燥機中で1時間以上乾燥させた後、デシケーター内に1時間以上放置した後に重量を測定し、これをAとする。また、生体適合性ポリマーを担持させた担体を同様に60℃の乾燥機中で1時間以上乾燥させた後、デシケーター内に1時間以上放置した後に重量を測定し、これをBとする。AとBの単位はグラムである。ポリマー量は以下の算出式により算出される。

$$\text{ポリマー量 (mg/g 担体)} = (B - A) \times 1000 / A$$

[0052] また、ポリマーの量は、以下の手順によっても算出できる。

吸着材を 60℃ に設定した乾燥機中で 1 時間以上乾燥させた後、デシケーター内に 1 時間以上放置した後に重量を測定し、これを C とする。また、生体適合性ポリマーをジメチルスルホキシド等の適切な溶媒へ溶解後、同様に 60℃ の乾燥機中で 1 時間以上乾燥させた後、デシケーター内に 1 時間以上放置した後に重量を測定し、これを D とする。C と D の単位はグラムである。ポリマー量は以下の算出式により算出される。

$$\text{ポリマー量 (mg / g 担体)} = (C - D) \times 1000 / D$$

[0053] 多成分を含む生体適合性ポリマーに含まれる各モノマー単位のモル比は、コーティングポリマーをジメチルスルホキシド等の適切な溶媒へ溶解後、¹H-NMR 測定を行い、得られた ¹H-NMR のピークの比から算出できる。

[0054] (抗血栓性)

抗血栓性は、吸着材表面を肉眼あるいは、走査型電子顕微鏡 (SEM) により観察し、吸着材表面に付着した血小板付着数を直接カウントする、あるいは画像解析で定量化することによって調べることができる。

[0055] SEM 観察を行う場合には、以下の手順によって、抗血栓性の評価を行うことができる。まず、健常人の血液を、ペリスタポンプを用いて、生理食塩水にて充填させた状態の吸着材を含むデバイスに一定時間循環させる。その後吸着材を含むデバイス内部の血液を生理食塩水で洗浄後、デバイスを解体し、内部の吸着材を取り出す。取り出した吸着材を、凍結乾燥させた後、イオンスプッターによる蒸着を行うことで得られた SEM サンプルを観察し、抗血栓性の評価を行うことができる。

[0056] あるいは、抗血栓性は、血小板の吸着材表面への付着量を指標として測定することができ、例えば、*in vitro* で PRP (多血小板血漿) と材料を一定時間接触させた後の吸着材に付着した血小板を界面活性剤で処理し、血小板内乳酸脱水素酵素 (LDH) 活性を測定することにより求められる。これは、材料付着血小板数と LDH 活性の間に強い相関があるため、付着した血小板数を LDH 活性により測定できる。また、全血を用いた抗血栓性の

評価においては、全血と吸着材を一定時間接触させた後、生理食塩水あるいはPBS等バッファーで洗浄することによって、赤血球成分を除去し、材料表面に残った赤血球以外の成分（主に血小板と白血球成分）を界面活性剤で処理することによって、溶出してくるLDH活性を測定し、吸着材の抗血栓性を測定することができる。

[0057] 具体的には、以下の方法により行う。

不織布、粒子状の吸着材の評価の場合は、

- 1) 吸着材量をそろえたミニモジュールを複数作製する。ここで、「ミニモジュール」とは、少ない血液量で吸着材の評価をするために、実製品の1/200等のスケールで作成された、小スケールのモジュールを言い、例えば、内径9mmの2.5mL容量のラボラトリーカラム（モビテック）に吸着材を充填し作成した吸着材充填カラム等を用いることができる。
- 2) 該ミニモジュールに生理食塩水を通液して洗浄する。
- 3) 該ミニモジュールにヘパリンを加えたヒト血液を通液した後、生理食塩水で洗浄する。
- 4) 洗浄後のミニモジュールから吸着材を取り出し、界面活性化剤であるTriton-X100溶液中で血小板からLDHを溶出させる。
- 5) LDHが、 β -Nicotinamide adenine dinucleotide reduced form (β -NADH) の存在下でピルビン酸を基質とするとき乳酸を生成するので、この際のNADHの減少速度を吸光度変化から測定し、LDH活性を算出し血小板数に換算する。本方法では、この減少幅が大きいほどLDH活性が高い、すなわち吸着材表面への血球（主に血小板と白血球）の付着量が多いことを意味するものとして評価する。

[0058] 中空糸状の吸着材の評価の場合は、

- 1) 膜内表面積をそろえたミニモジュールを複数作製する。ここで、「ミニモジュール」とは、中空糸の吸着材を、有効長15cm、膜内表面の面積が50mm²となるように両端をエポキシ接着剤で接着し、作成したカラム等を

用いることができる。

2) 該ミニモジュールに生理食塩水を通液して洗浄する。

3) 該ミニモジュールにヘパリンを加えたヒト血液を通液した後、生理食塩水で洗浄する。

4) 洗浄後のミニモジュールから中空糸状の吸着材を取り出し、界面活性剤であるTriton-X100溶液中で血小板からLDHを溶出させる。

5) LDHが、 β -Nicotinamide adenine dinucleotide reduced form (β -NADH) の存在下でピルビン酸を基質とするとき乳酸を生成するので、この際のNADHの減少速度を吸光度変化から測定し、LDH活性を算出し血小板数に換算する。本方法では、この減少幅が大きいほどLDH活性が高い、すなわち吸着材表面への血球（主に血小板と白血球）の付着量が多いことを意味するものとして評価する。

[0059] (カチオン性の官能基)

ヒストンはカチオン性であり、従来、アニオン性吸着材による分離精製ターゲットタンパク質の一つと考えられている。しかし、本発明者らは、カチオン性の材料にヒストンが吸着されることを見出した。そのため、吸着材はカチオン性の官能基を表面に有するのが好ましい。例えば、担体の材料がカチオン性の官能基を有していてもよいし、生体適合性ポリマーがカチオン性の官能基を有していてもよい。担体表面に導入されるカチオン性の官能基としては、1級アミノ基、2級アミノ基、3級アミノ基、イミノ基、4級アンモニウム基などの官能基が挙げられるが、好ましくは、4級アンモニウム基が用いられる。なお、2級アミノ基、3級アミノ基、及び4級アミノ基は、それぞれ、モノアルキル置換アミノ基、ジアルキル置換アミノ基、及びトリアルキル置換アミノ基ともいう。また、上記のカチオン性の官能基を含むポリマーを担体にコートすることによって吸着材表面にカチオン性を付与してもよい。生体適合性ポリマーをコートした担体に、さらにカチオン性官能基を導入するためのポリマーをコートしてもよいし、カチオン性官能基を導入

するためのポリマーをコートした担体に、さらに生体適合性ポリマーをコートしてもよい。ただし、段階的にコートした場合、２段階目のコート時に、１段階のコートポリマーが溶出してしまうことが考えられるため、生体適合性とカチオン性官能基の両性質を有するポリマーをコートすることが好ましい。

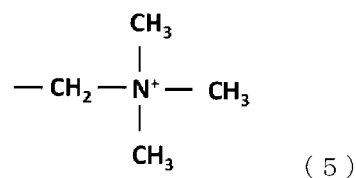
[0060] (アミノ基)

アミノ基としては、例えば、アミノヘキサン、モノメチルアミノヘキサン、アミノオクタン、アミノドデカン、アミノジフェニルメタン、１－（３－アミノプロピル）イミダゾール、３－アミノ－１－プロペン、アミノピリジン、アミノベンゼンスルホン酸、トリス（２－アミノエチル）アミン、ジメチルアミン又はジアミノエタン、ジエチレントリアミン、トリエチレンテトラミン、テトラエチレンペンタミン、ジプロピレントリアミン、ポリエチレンイミン、Ｎ－メチル－２，２’－ジアミノジエチルアミン、Ｎ－アセチルエチレンジアミン、及び１，２－ビス（２－アミノエトキシエタン）等の化合物由来のアミノ基が挙げられるが、アミノ基であれば全て用いることができる。

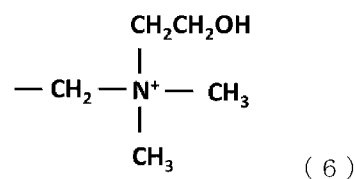
[0061] (第４級アンモニウム基)

第４級アンモニウム基とは、 NR_4^+ と表される正電荷を持った置換基であり、例えば、下記化学式（５）、（６）で表される基等が挙げられる。

[化５]



[化６]



[0062] (交換容量及びゼータ電位)

上記カチオン性の強度を示す指標の一つとして、交換容量が用いられる。カチオン性の官能基を有する吸着材の交換容量は、高い吸着性能を得る観点で、水不溶性担体 1 mL 当たり 0.05 meq 以上が好ましく、0.5 meq 以上がより好ましい。また、カチオン性の評価指標としてゼータ電位も好適に用いることができ、ゼータ電位を評価指標とする場合は 0 mV 以上であればよい。

[0063] 交換容量は以下の手順で測定することができる。まず、吸着材を計量し、それを脱塩水でろ過管に移し、このろ過管に 1 mol/L-NaOH、脱塩水を順次流し、樹脂を再生、洗浄し、次いで、5%NaClを流し、流出液を 200 mL メスフラスコに受け定容とする。これを、メチルレッド・メチレンブルー混合指示薬を用いて 0.1 mol/L-HCl で滴定することにより求めることができるが、測定方法はこれに限定されるものではない。

[0064] 吸着材の表面のゼータ電位の測定方法は、例えば、流動電位測定法により測定することができ、流動電位測定法とは、一对の流動電位測定電極間に粉体や繊維等の固体試料を充填し、その充填層に流動液を透過させたときに電極間に発生する電位差すなわち流動電位を測定することによりゼータ電位を求める方法であるが、測定方法はこれに限定されるものではない。

[0065] (ヒストン)

ヒストンとは、生体由来液中に存在する DNA 結合タンパクであり、ヒストン H1、ヒストン H2A、ヒストン H2B、ヒストン H3、ヒストン H4 が挙げられるが、SIRS 等の治療を目的とする場合は、生体由来液中からヒストン H3 及びヒストン H4 が除去されることが好ましい。

[0066] (生体由来液)

生体由来液は、生体に由来する液体ないし生体由来成分を含む液体を全て包含し、具体的には血液、血漿、血清、及び腹水などの体液や、細胞培養液などを含む。

[0067] 生体由来液と、本発明の吸着材との接触は、種々の形態が考えられる。例えば、本発明の吸着材が充填された血液バッグに採血した患者血液又は腹水

を入れ、この中で患者血液中、腹水中のヒストンを吸着する方法、本発明の吸着材を充填したデバイスに血液を循環させる方法、などが挙げられる。血液は、全血でなくとも、血漿を分離した後、血漿を処理してもよい。処理された血液は患者に戻されるか、必要に応じて血液バッグ中などに保存することもできる。

[0068] また、細胞培養液の場合は、例えば、本発明の吸着材が充填されたバッグに採取した培養液を入れ、この中で培養液中のヒストンを吸着する方法、本発明の吸着材を充填したデバイスに培養液を循環させる方法、などが挙げられる。培養液は、細胞を分離した後、細胞培養液上澄みを処理してもよい。処理された培養液は、再度細胞培養に用いることもできる。

[0069] (デバイス)

図1は、デバイスの一実施形態を示す断面図である。デバイス100は、例えば血液体外循環回路に接続するモジュールである。円筒110の一端開口部に、内側にフィルター120を張ったパッキン130を介して入口ポート140を有するキャップ150をネジ嵌合し、円筒110の他端開口部に内側にフィルター120'を張ったパッキン130'を介して出口ポート160を有するキャップ170をネジ嵌合して容器を形成している。さらに、フィルター120及び120'の間隙に吸着材を充填保持させて、ヒストン吸着材層180を形成している。

[0070] ヒストン吸着材層180には、上記の本実施形態に係る吸着材を単独で充填してもよく、他の吸着材を混合又は積層してもよい。他の吸着材としては、例えばサイトカイン等の他の悪性物質の吸着材や、幅広い吸着能を有する吸着材等を用いることができる。これにより吸着材の相乗効果による広範な臨床効果が期待できる。ヒストン吸着担体層180の容積は、5 mL～3000 mLとすることができるが、ヒストン吸着容量と血液の体外循環の際の体外血液量の観点から、50 mL～1000 mLが好ましく、100 mL～500 mLがより好ましい。

[0071] 血液体外循環回路に接続するモジュールは、血液体外循環回路に、治療対

象の生体由来液と接触するように配置され、全身炎症性疾患治療用途等で利用可能である。

[0072] 図2は、デバイスの別の実施形態を示す断面図である。デバイス200は、例えば血液体外循環回路に接続するモジュールである。円筒210の両端に、中空糸状の吸着材220がポッティング剤230によって保持されている。中空糸状の吸着材220の両端面は、開口している。入口ポート240を有するキャップ250及び出口ポート260を有するキャップ250'を円筒210に嵌合し、中空糸状の吸着材220を充填保持させている。また、円筒210の側面には、透析液導入口270と透析液導出口280が具備されている。

[0073] 血液体外循環による血液浄化法に使用する際には、治療対象の体内から導出させた血液を入口ポート240から導入させ、中空糸状の吸着材220を通過させ、出口ポート260を通して、治療対象の体内へと戻すことで、血液体外循環による血液浄化法を行うことができる。その際に、透析液導入口270から透析液を導入させ、透析液導出口280から透析液を導出して、デバイス200内の透析液を循環させることによって、血液体外循環中に透析を行うことができる。また、この透析液の循環は行わなくてもよく、透析液導入口270、透析液導出口280を開放してもよい。この場合、血液の濾過が行われる。また、透析液導入口270と透析液導出口280を栓等で塞ぐことによって、血液の濾過を抑制して血液体外循環による血液浄化法を行うこともできる。

[0074] 上記の本実施態様に係る吸着材及びデバイスは、ヒストンが介在する疾患において、全身炎症を抑制又は治療するために有効に使用することができる。具体的な疾患名としては、敗血症、敗血症性ショック、播種性血管内凝固症候群(DIC)、毒素ショック症候群、虚血再還流障害、成人呼吸促進症候群(ARDS)、パジェット病、骨粗鬆症、多発性骨髄腫、急性及び慢性骨髄性白血病、膵臓β細胞破壊、炎症性腸疾患、乾癬、クローン病、潰瘍性大腸炎、アナフィラキシー、接触性皮膚炎、喘息、筋変性症、悪液質、ライ

ター症候群、Ⅰ型及びⅡ型糖尿病、骨吸収症、移植片対宿主反応、アテローム性動脈硬化、脳外傷、多発性硬化症、大脳マラリア、発熱、並びに感染による筋肉痛等が挙げられる。

[0075] (治療方法)

本実施形態に係る吸着材及び生体由来液浄化デバイスを用いた治療方法としては、例えば、本発明の生体由来液浄化デバイスと患者とを血液回路で接続し、患者から取り出した血液を本発明の生体由来液浄化デバイスに通過させ、血液中よりヒストン含有量を減量させ、これを患者に戻すことにより、全身性炎症反応症候群を治療することができる。

[0076] また、患者から体外に取り出した血液を血漿分離膜により、血球成分と血漿成分に分離した後、分離した血漿を本発明の生体由来液浄化デバイスに通過させ、血漿中よりヒストン含有量を減量させ、これを患者に戻すことにより、全身性炎症反応症候群を治療することができる。

[0077] 上記の本実施態様に係る吸着材及びデバイスは、他の体液処理方法や医療機器と併用しても構わない。他の体液処理方法や医療機器としては、例えば、持続緩徐式血液濾過（CRRT）、血漿交換、腹膜透析、血漿分離機、ヘモフィルター、人工心肺、ECMOが挙げられる。

[0078] また、上記の本実施態様に係る吸着材及びデバイスは、ヒストンを含む生体由来液を通過させ、デバイス出口より排出された、ヒストン含有量を減量した生体由来液を取得する処理方法に好適に用いることができる。

[0079] 本実施態様に係るヒストン吸着材を、生体由来液等と一定時間接触させる時、処理前後のヒストンの吸着率は以下の式により算出される。

$$\text{ヒストン吸着率 (\%)} = (C_0 - C) / C_0 \times 100$$

C_0 : 処理前溶液中のヒストン濃度

C : 処理後溶液中のヒストン濃度

[0080] 本実施態様に係る吸着材によるヒストン吸着率を評価するために、生体由来液等と接触させる方法としては、健常ボランティアから採血した血液に、大腸菌（*Escherichia coli*）由来のリポポリサッカライド

(L P S) を添加し、振とう機を用いて振とうさせ、遠心機を用いて遠心し、上清を血漿サンプルとして取得し、取得した血漿サンプルと、吸着材をポリプロピレン (P P) 製のチューブ内で混合し、振とう機を用いて振とうさせる方法が挙げられる。

[0081] また、健常ボランティアから採血した血液に、E. coli 由来のリポポリサッカライドを添加し、振とう機を用いて振とうさせた血液を、吸着材を内径 9 mm の 2.5 mL 容量のラボラトリーカラム (モビテック) に充填し作成した吸着材充填カラムに、シリンジポンプを用いて通液させる方法が挙げられる。

[0082] さらに、製品と同じスケールのフルモジュールと接触させる方法としては、健常ボランティアから採血した血液に、E. coli 由来のリポポリサッカライドを添加し、振とう機を用いて振とうさせた血液を、吸着材を充填した図 1 のようなデバイスに、ペリスタポンプを用いて循環させる方法などが挙げられる。この際、使用する血液量を少なくするために、デバイスを含めた循環回路全体の容量を少容量化することが好ましい。

[0083] 以下、実施例を挙げて具体的に説明するが、本発明は何らこれに限定されるものではない。

<実施例 1>

(吸着材作製及び評価)

スチレンジビニルベンゼン系共重合体を含む、トリメチルアンモニウム基を有する強塩基性陰イオン交換樹脂 (ダイヤイオン; 三菱化学株式会社製) に限外ろ過 (U F) 水を加え、95℃に加熱し、22時間以上熱水洗浄を行った。次に、ポリマー濃度が0.75%になるようにエタノールに溶解した、生体適合性ポリマーとしてのp-H E M A のコート液を、強塩基性陰イオン交換樹脂に4時間浸漬させ、一次コーティングを行った。その後、70℃で一晩熱風乾燥を行い、120℃で2時間熱風加熱架橋を行った。送風冷却した一次コーティング強塩基性陰イオン交換樹脂に、一次コーティングと同様の手順で、p-H E M A コート液の二次コーティングを行った。二次コー

ティングした強塩基性陰イオン交換樹脂を、送風冷却し、吸着材Aとした。

[0084] (血漿ヒストンH3吸着試験)

健常ボランティアから採血した血液に、*Escherichia coli* 0127:B8由来のリポポリサッカライド(LPS)(Sigma-Aldrich社製)を $0.1\mu\text{g}/\text{ml}$ 濃度になるように添加し、振とう機を用いて24時間、 39°C で振とうさせた。その後、遠心機を用いて2000gで10分間遠心し、上清を血漿サンプルとして取得した。取得した血漿サンプル3mlと、吸着材A 0.5mlをポリプロピレン(PP)製のチューブ内で混合し、振とう機を用いて1時間、 39°C で振とうさせた。振とうさせた後のPP製チューブを、遠心機を用いて2000gで1分間遠心し、上清を担体接触後血漿サンプルとして取得した。

[0085] (ヒストンH3除去性能評価)

取得した担体接触後血漿サンプルを用いて、吸着材AのヒストンH3吸着率を算出した。ヒストンH3吸着率(%)をA、吸着材処理前ヒストンH3濃度を C_0 、吸着材処理後ヒストンH3濃度を C_A として、ヒストンH3吸着率算出式を以下に示す。以下の実施例2から9及び比較例1から3においても、同一のヒストンH3吸着率算出式を用いた。ヒストンH3の濃度は、EpiQuik(登録商標) Total Histone H3 Quantification Kit(EPIGENTEK社製)を用いて測定した。結果を表1に示す。

[数1]

$$A = \frac{C_0 - C_A}{C_0} \times 100$$

[0086] (抗血栓性の測定)

抗血栓性は、血球の吸着担体表面への付着量を指標とした。具体的には、終濃度が $1\text{IU}/\text{ml}$ になるようにヘパリンを添加して得た健常人の血液を、生理食塩水にて湿潤させた状態の樹脂0.5mlに添加し 37°C で30分間放置し、その後、吸着材を分離し、生理食塩水で洗浄後、肉眼観察を行った。結果を表1に示す。

[0087] <実施例 2>

(生体適合性ポリマーの合成)

重合溶媒としてエタノールを用い、窒素雰囲気下、78℃で攪拌を行いながら、重合性モノマーとジアゾ系開始剤を溶解したエタノール溶液を滴下して、重合を行った。各重合性モノマーの仕込みは、疎水性重合性モノマーとしてメチルメタクリレート（以下、「MMA」と略す）25モル%、塩基性含窒素部分を含む重合性モノマーとしてジメチルアミノエチルメタクリレート（以下、「DM」と略す）13モル%、プロトン性中性親水性部分を含むモノマーとして2-ヒドロキシエチルメタアクリレート（以下、「HEMA」と略す）62モル%であった。重合液を過剰の水にて精製し、減圧乾燥し、合成ポリマーAとした。

(吸着材作製及び評価)

強塩基性陰イオン交換樹脂（ダイヤイオン；三菱化学株式会社製）にUF水を加え、95℃に加熱し、22時間以上熱水洗浄を行った。次に、上記合成ポリマーAコート液を、強塩基性陰イオン交換樹脂に4時間浸漬させ、一次コーティングを行った。その後、70℃で一晩熱風乾燥を行い、120℃で2時間熱風加熱架橋を行った。送風冷却した一次コーティング強塩基性陰イオン交換樹脂に、一次コーティングと同様の手順で、合成ポリマーAコート液の二次コーティングを行った。二次コーティングした強塩基性陰イオン交換樹脂を、送風冷却し、吸着材Bとした。この吸着材Bを用いて、実施例1と同様の吸着実験を行った結果を表1に示す。

[0088] <実施例 3>

(生体適合性ポリマーの合成)

各重合モノマーの仕込み比をDM3モル%、HEMA97モル%として実施例2と同様の条件で重合、精製、乾燥し、合成ポリマーBを得た。

(吸着材作製及び評価)

強塩基性陰イオン交換樹脂（ダイヤイオン；三菱化学株式会社製）にUF水を加え、95℃に加熱し、22時間以上熱水洗浄を行った。次に、上記合

成ポリマーBコート液を、強塩基性陰イオン交換樹脂に4時間浸漬させ、一次コーティングを行った。その後、70℃で一晩熱風乾燥を行い、120℃で2時間熱風加熱架橋を行った。送風冷却した一次コーティング強塩基性陰イオン交換樹脂に、一次コーティングと同様の手順で、合成ポリマーBコート液の二次コーティングを行った。二次コーティングした強塩基性陰イオン交換樹脂を、送風冷却し、吸着材Cとした。この吸着材Cを用いて、実施例1と同様の吸着実験を行った結果を表1に示す。

[0089] <実施例4>

(吸着材作製及び評価)

ビーズ状活性炭（株式会社クレハ社製）に0.1N塩酸で洗浄を行い、UF水でさらに洗浄を行った後、60-65℃の温水で40時間以上の洗浄を行った。次に、ポリマー濃度が0.75%になるようにエタノールに溶解したp-HEMAコート液を、ビーズ状活性炭に4時間浸漬させ、一次コーティングを行った。その後、70℃で一晩熱風乾燥を行い、120℃で2時間熱風加熱架橋を行った。送風冷却した一次コーティングビーズ状活性炭に、一次コーティングと同様の手順で、p-HEMAコート液の二次コーティングを行った。二次コーティングしたビーズ状活性炭を、送風冷却し、吸着材Dとした。この吸着材Dを用いて、実施例1と同様の吸着実験を行った結果を表1に示す。

[0090] <実施例5>

(吸着材作製及び評価)

ビーズ状活性炭（株式会社クレハ社製）に0.1N塩酸で洗浄を行い、UF水でさらに洗浄を行った後、60-65℃の温水で40時間以上の洗浄を行った。次に、上記合成ポリマーAコート液を、ビーズ状活性炭に4時間浸漬させ、一次コーティングを行った。その後、70℃で一晩熱風乾燥を行い、120℃で2時間熱風加熱架橋を行った。送風冷却した一次コーティングビーズ状活性炭に、一次コーティングと同様の手順で、合成ポリマーAコート液の二次コーティングを行った。二次コーティングしたビーズ状活性炭を

、送風冷却し、吸着材Eとした。この吸着材Eを用いて、実施例1と同様の吸着実験を行った結果を表1に示す。

[0091] <実施例6>

(吸着材作製及び評価)

ビーズ状活性炭(株式会社クレハ社製)に0.1N塩酸で洗浄を行い、UF水でさらに洗浄を行った後、60-65℃の温水で40時間以上の洗浄を行った。次に、上記合成ポリマーBコート液を、ビーズ状活性炭に4時間浸漬させ、一次コーティングを行った。その後、70℃で一晩熱風乾燥を行い、120℃で2時間熱風加熱架橋を行った。送風冷却した一次コーティングビーズ状活性炭に、一次コーティングと同様の手順で、合成ポリマーBコート液の二次コーティングを行った。二次コーティングしたビーズ状活性炭を、送風冷却し、吸着材Fとした。この吸着材Fを用いて、実施例1と同様の吸着実験を行った結果を表1に示す。

[0092] <実施例7>

(吸着材作製及び評価)

上記合成ポリマーAを、素材である平均繊維径1.3μmのPET製不織布にコーティングし、吸着材Gを得た。吸着材Gを用いて、実施例1と同様の吸着試験を行った結果を、表1に示す。

[0093] <実施例8>

(生体適合性ポリマーの合成)

各重合モノマーの仕込み比をMMA30モル%、DM10モル%、HEMA60モル%として実施例2と同様の条件で重合、精製、乾燥し、合成ポリマーCを得た。

(吸着材作製及び評価)

上記合成ポリマーCを、素材であるポリエチレンテレフタレート(PET)製不織布にコーティングし、吸着材Hを得た。吸着材Hを用いて、実施例1と同様の吸着試験を行った結果を、表1に示す。

[0094] <実施例9>

(吸着材作製及び評価)

上記合成ポリマーBを、素材であるポリエチレンテレフタレート（PET）製不織布にコーティングし、吸着材Iを得た。吸着材Iを用いて、実施例1と同様の吸着試験を行った結果を、表1に示す。

[0095] <比較例1>

実施例1と同じ強塩基性陰イオン交換樹脂にP-HEMAコートを施していないこと以外は実施例1と同様の吸着担体Lを用いて吸着試験を行った結果を、表1に示す。

[0096] <比較例2>

実施例4と同じビーズ状活性炭にP-HEMAコートを施していない以外は実施例4と同様の吸着担体Mを用いて吸着試験を行った結果を、表1に示す。

[0097] <比較例3>

実施例7と同じPET製不織布に合成ポリマーA液コートを施していない事以外は実施例7と同様の吸着担体Nを用いて吸着試験を行った結果を、表1に示す。

[0098] [表1]

	吸着材	担体	コートポリマー	担体形状	平均粒径 (μm)	平均繊維径 (μm)	ヒストンH3 吸着率(%)	肉眼観察結果
実施例1	A	スチレンジ ビニルベン ゼン系	p-HEMA	粒子状	400	-	98	血球付着なし
実施例2	B	スチレンジ ビニルベン ゼン系	合成ポリマーA	粒子状	400	-	99	
実施例3	C	スチレンジ ビニルベン ゼン系	合成ポリマーB	粒子状	400	-	98	
実施例4	D	活性炭	p-HEMA	粒子状	700	-	15	
実施例5	E	活性炭	合成ポリマーA	粒子状	700	-	80	
実施例6	F	活性炭	合成ポリマーB	粒子状	700	-	30	
実施例7	G	PET不織布	合成ポリマーA	不織布	-	1.3	97	
実施例8	H	PET不織布	合成ポリマーC	不織布	-	1.3	80	
実施例9	I	PET不織布	合成ポリマーB	不織布	-	1.3	37	
比較例1	L	スチレンジ ビニルベン ゼン系	なし	粒子状	400	-	98	血球の付着あり
比較例2	M	活性炭	なし	粒子状	700	-	15	
比較例3	N	PET不織布	なし	不織布	-	1.3	0	

[0099] 表1の結果から、担体表面に生体適合性ポリマーをコートされている吸着担体A、B、C、D、E、F、G、H、Iの抗血栓性が良好で、かつヒストンH3を除去したことが示された。一方で、生体適合性ポリマーがコートされていない吸着担体L、M、Nはいずれも血球の付着が多く（抗血栓性が低

く)、ヒストン除去デバイス用の吸着担体として最低限満たすべき生体適合性を満たしていないことが示された。

[0100] <実施例10>

(中空糸状の吸着材作製及び評価)

ポリスルホン及びポリビニルピロリドンからなる中空糸膜有効長17cm、膜内表面の面積が100mm²(内径185μmの中空糸膜を使用したため100フィラメント)となるように両端をエポキシ接着剤で接着してデバイスを作製した。このデバイスの血液の入口ポートより上記合成ポリマーAを5[mL/分]で20秒間流通させて、中空糸内表面に合成ポリマーAをコーティングし、吸着材Jを含むデバイスを作製した。

[0101] (血漿ヒストンH3吸着試験)

健常ボランティアから採血した血液に、*Escherichia coli* 0127:B8由来のリポポリサッカライド(LPS)(Sigma-Aldrich社製)を0.1μg/ml濃度になるように添加し、振とう機を用いて24時間、39℃で振とうさせた。その後、遠心機を用いて2000gで10分間遠心し、上清を血漿サンプルとして取得した。取得した血漿サンプル10mlを、ペリスタポンプを用いて、吸着材Jを含むデバイスに流速1.2ml/minで、60分間、39℃で循環させた。その後、循環させた血漿を担体接触後血漿サンプルとして取得した。

[0102] (ヒストンH3除去性能評価)

取得した担体接触後血漿サンプルを用いて、処理後のヒストンH3吸着率についてそれぞれ算出した。ヒストンH3吸着率(%)をA_H、コーティングされていない中空糸で処理した後のヒストンH3濃度をC_{H0}、コーティングした中空糸で処理した後ヒストンH3濃度をC_{HA}として、ヒストンH3吸着率算出式を以下に示す。以下の実施例11及び比較例4、5においても、同一のヒストンH3吸着率算出式を用いた。ヒストンH3の濃度は、EpiQuik(登録商標) Total Histone H3 Quantification Kit(EPIGENTEK社製)を用いて測定した。結

果を表 2 に示す。

[数2]

$$A_H = \frac{C_{H0} - C_{HA}}{C_{H0}} \times 100$$

[0103] (抗血栓性の測定)

抗血栓性は、血球の中空糸担体表面への付着量を指標とした。具体的には、終濃度が 1 IU/ml になるようにヘパリンを添加して得た健常人の血液を、生理食塩水にて充填させた状態の吸着材 J を含むデバイスに、ペリスタポンプを用いて 1.2 ml/min の流速で、37℃で 60 分間循環させ、その後中空糸内部の血液を生理食塩水で洗浄後、デバイスを解体し、内部の中空糸を取り出し、2.5%グルタルアルデヒドに浸漬させ、血球の固定化を行った。その中空糸を、25%、50%、60%、70%、80%、90%、99%エタノール（和光純薬工業製）溶液に、順々に浸漬させ、脱水を行った後、t-ブチルアルコール（和光純薬工業製）に浸漬させた。中空糸から t-ブチルアルコールを十分に取り除いた後、凍結させ、一晚凍結乾燥させた。この中空糸を斜めにスライスした後、イオンスパッターによる蒸着を行い、中空糸 SEM サンプルを得た。その後、SEM 観察を行い、血球付着を評価した。結果を表 2 に示す。

[0104] <実施例 11>

ポリスルホン及びポリビニルピロリドンからなる中空糸膜有効長 17 cm、膜内表面の面積が 100 mm²（内径 185 μm の中空糸膜を使用したため 100 フィラメント）となるように両端をエポキシ接着剤で接着してデバイスを作製した。このデバイスの血液の入口ポートより上記合成ポリマー B を流通させて、中空糸内表面に合成ポリマー B をコーティングし、吸着材 K を含むデバイスを作製した。この吸着材 K を含むデバイスを用いて吸着試験を行った結果を、表 2 に示す。

[0105] <比較例 4>

(中空糸状の吸着材作製及び評価)

ポリスルホン及びポリビニルピロリドンからなる中空糸膜有効長 17 cm

、膜内表面の面積が 100 mm^2 （内径 $185\text{ }\mu\text{m}$ の中空糸膜を使用したため 100 フィラメント）となるように両端をエポキシ接着剤で接着してデバイスを作製した。この作製した吸着材Oを含むデバイスを用いて吸着試験を行った結果を、表2に示す。

[0106] <比較例5>

（中空糸状の吸着材作製及び評価）

ポリスルホン及びポリビニルピロリドンからなる中空糸膜有効長 17 cm 、膜内表面の面積が 100 mm^2 （内径 $185\text{ }\mu\text{m}$ の中空糸膜を使用したため 100 フィラメント）となるように両端をエポキシ接着剤で接着してデバイスを作製した。この吸着材Pを含むデバイスを用いて吸着試験を行った結果を、表2に示す。

[0107] [表2]

	吸着材	担体	コートポリマー	担体形状	平均中空糸内径(μm)	ヒストンH3吸着率(%)	SEM観察結果
実施例10	J	ポリスルホン中空糸	PVP+合成ポリマーA	中空糸状	185	12	血球付着なし
実施例11	K	ポリスルホン中空糸	PVP+合成ポリマーB	中空糸状	185	12	
比較例4	O	ポリスルホン中空糸	なし	中空糸状	185	5	血球付着あり
比較例5	P	ポリスルホン中空糸	PVP	中空糸状	185	0	血球付着なし

[0108] 表2の結果から、担体表面に生体適合性ポリマーをコートされている吸着材J、Kを含むデバイスが、抗血栓性良くヒストンH3を除去したことが示された。一方で、生体適合性ポリマーがコートされていない吸着材Oを含むデバイスは血球の付着が多く（抗血栓性が低く）、ヒストン除去デバイスとして最低限満たすべき生体適合性を満たしていない。さらに、カチオン性官能基を有しないPVPでコートされた吸着材Pを含むデバイスは、抗血栓性は高いが、ヒストンを吸着しない。

[0109] <実施例12>

（水系ヒストンH4吸着試験）

生理用食塩水に、EpiQuik（登録商標） Total Histone H4 Quantification Kit（EPIGENTEK社製）付属の標準品（ヒストンH4（初期濃度： $50\text{ }\mu\text{g/mL}$ ）を添加し

た溶液を、PP製チューブ内で0.2 mL調整した。ここへ吸着材Aを0.1 mL加え、振とう機を用いて1時間、39℃で振とうさせた。振とうさせた後のPP製チューブを、遠心機を用いて2000 gで1分間遠心し、上清を担体接触後血漿サンプルとして取得した。

[0110] (ヒストンH4除去性能評価)

取得した担体接触後血漿サンプルを用いて、吸着材AのヒストンH4吸着率を算出した。ヒストンH4吸着率(%)を A_4 、吸着材処理前ヒストンH3濃度を C_{40} 、吸着材処理後ヒストンH3濃度を C_{4A} として、ヒストンH4吸着率算出式を以下に示す。以下の実施例13、14及び比較例6においても、同一のヒストンH4吸着率算出式を用いた。ヒストンH4の濃度は、EpiQuik (登録商標) Total Histone H4 Quantification Kit (EPIGENTEK社製)を用いて測定した。結果を表3に示す。

[数3]

$$A_{H4} = \frac{C_{40} - C_{4A}}{C_{40}} \times 100$$

[0111] <実施例13>

吸着材Dを用いて、実施例12と同様の吸着試験を行った結果を表3に示す。

[0112] <実施例14>

吸着材Gを用いて、実施例12と同様の吸着試験を行った結果を表3に示す。

[0113] <比較例6>

(水系ヒストンH4吸着試験)

生理用食塩水に、EpiQuik (登録商標) Total Histone H4 Quantification Kit (EPIGENTEK社製) 付属の標準品 (ヒストンH4 (初期濃度: 50 µg/mL)) を添加した溶液を、PP製チューブ内で0.2 mL調整した。ここに吸着材を加えず

に、振とう機を用いて1時間、39℃で振とうさせた。振とうさせた後のPP製チューブを、遠心機を用いて2000gで1分間遠心し、上清を血漿サンプルとして取得した。

[0114] (ヒストンH4除去性能評価)

取得した血漿サンプルを用いて、処理後のヒストンH4吸着率についてそれぞれ算出した。ヒストンH4吸着率算出式を以下に示す。ヒストンH4の濃度は、EpiQuik (登録商標) Total Histone H4 Quantification Kit (EPIGENTEK社製) を用いて測定した。結果を表3に示す。

[0115] [表3]

	吸着材	担体	コートポリマー	担体形状	平均粒径 (μm)	平均繊維径 (μm)	ヒストンH4 吸着率(%)
実施例12	A	ステレンジ ビニルベン ゼン系	p-HEMA	粒子状	400	—	65
実施例13	D	活性炭	p-HEMA	粒子状	700	—	55
実施例14	G	PET不織布	合成ポリマー-A	不織布	—	1.3	82
比較例6	—	—	—	—	—	—	20

[0116] 表3の結果から、担体表面に生体適合性ポリマーをコートされている吸着材A、D、Gを含むデバイスが、ヒストンH4を除去したことが示された。なお、比較例6においては、ヒストンH4は、PP製チューブに非特異的に吸着したものと考えられる。

産業上の利用可能性

[0117] 本実施形態に係る吸着材及び生体由来液浄化デバイスは、生体由来液中よりヒストンH3を生体適合性よく除去でき、SIRSに代表されるヒストンが介在して発症又は悪化する疾患の治療用途等に有用である。

[0118] この生体由来液浄化用デバイスにより、ヒストンを原因とするSIRS等の治療に使用できる。本実施形態に係る吸着材を生体由来液と接触させることにより、生体由来液中のヒストンが該吸着材に生体適合性良く吸着され、生体由来液からヒストンを除去することができ、生体に好ましくない細胞外のヒストンを除去することができるので、ヒストンが介在する疾患において、全身炎症を抑制又は治療するために有効に使用することができる。具体的な疾患名としては、敗血症、敗血症性ショック、播種性血管内凝固症候群（

D I C)、毒素ショック症候群、虚血再還流障害、成人呼吸促進症候群 (A R D S)、パジェット病、骨粗鬆症、多発性骨髄腫、急性及び慢性骨髄性白血病、膵臓 β 細胞破壊、炎症性腸疾患、乾癬、クローン病、潰瘍性大腸炎、アナフィラキシー、接触性皮膚炎、喘息、筋変性症、悪液質、ライター症候群、I型及びII型糖尿病、骨吸収症、移植片対宿主反応、アテローム性動脈硬化、脳外傷、多発性硬化症、大脳マラリア、発熱、並びに感染による筋肉痛等が挙げられる。特に、敗血症など全身性炎症反応症候群 (S I R S : s y s t e m i c i n f l a m m a t o r y r e s p o n s e s y n d r o m e) の病態を改善させる用途に好適に用いられる。

[0119] より具体的には、血液体外循環による方法として患者から血液を脱血した後、全血をそのまま、あるいは、血漿分離 (1次) 膜や遠心分離法を用いて分離された血漿を、例えば、図1のデバイスの入口ポート140に導入させ、出口ポート160から導出させることで、ヒストン含有量が減量した血液あるいは血漿を患者体内に戻す体外循環療法に好適に用いることができる。

[0120] また、上記の本実施態様に係る吸着材及びデバイスは、ヒストンを含む生体由来液を通過させ、デバイス出口より排出された、ヒストン含有量を減量した生体由来液を取得する処理方法に好適に用いることができる。

[0121] 例えば、本発明の吸着材が充填された血液バッグに採血した患者血液又は腹水を入れ、この中で患者血液中、腹水中のヒストンを吸着する方法、などが挙げられる。血液は、全血でなくとも、血漿を分離した後、血漿を処理してもよい。処理された血液は患者に戻されるか、必要に応じて血液バッグ中などに保存することもできる。

[0122] ヒストンは細胞障害性を有することが報告されており、この生体由来液浄化用デバイスは、細胞培養液中から細胞障害性を持つヒストンを除去する用途に好適に使用することができる。

[0123] 例えば、本発明の吸着材が充填されたバッグに採取した培養液を入れ、この中で培養液中のヒストンを吸着する方法、本発明の吸着材を充填したデバイスに培養液を循環させる方法、などが挙げられる。培養液は、細胞を分離

した後、細胞培養液上澄みを処理してもよい。処理された培養液は、再度細胞培養に用いることもできる。なお、本発明の産業上の利用可能分野は、上記に限られないことはもちろんである。

符号の説明

[0124] 100, 200…デバイス、110, 210…円筒、120, 120' …フィルター、130, 130' …パッキン、140, 240…入口ポート、150, 170, 250, 250' …キャップ、160, 260…出口ポート、180…全身炎症抑制用担体層、220…担体（吸着担体）、230…ポッティング剤、270…透析液導入口、280…透析液導出口。

請求の範囲

- [請求項1] 生体由来液中よりヒストンを除去する吸着材であって、水不溶性の担体と、生体適合性ポリマーと、を備え、前記担体が、活性炭、ポリエステル、ポリスルホン、又はカチオン性官能基を備える担体のいずれかである吸着材。
- [請求項2] 前記生体適合性ポリマーが、カチオン性官能基を備える、請求項1に記載の吸着材。
- [請求項3] 前記担体の形状が、粒子状、不織布状、又は中空糸膜状である、請求項1又は2のいずれかに記載の吸着材。
- [請求項4] 前記担体が、前記カチオン性官能基と、ポリエチレンテレフタレート又はスチレンジビニルベンゼン系共重合体のいずれかと、を備える、請求項1に記載の吸着材。
- [請求項5] 前記カチオン性官能基がアミノ基である、請求項4に記載の吸着材。
- [請求項6] 前記アミノ基が第4級アンモニウム基である、請求項5に記載の吸着材。
- [請求項7] 前記生体適合性ポリマーが親水性ポリマーである、請求項1～6のいずれかに記載の吸着材。
- [請求項8] 前記親水性ポリマーがヒドロキシエチルメタクリレート系重合体である、請求項7に記載の吸着材。
- [請求項9] 前記生体適合性ポリマーがジメチルアミノエチルメタクリレートを10モル%以上含むポリマーである、請求項1～7のいずれかに記載の吸着材。
- [請求項10] 前記ヒストンがヒストンH3である、請求項1～9のいずれかに記載の吸着材。
- [請求項11] 生体由来液中よりヒストンを除去する生体由来液浄化デバイスであって、体液入口、出口を備えたハウジングと、前記ハウジング内に收容された請求項1～10のいずれかに記載の吸着材と、を備え、前記

ハウジング内に前記生体由来液が流通されることにより、前記生体由来液から前記ヒストンが除去される、生体由来液浄化デバイス。

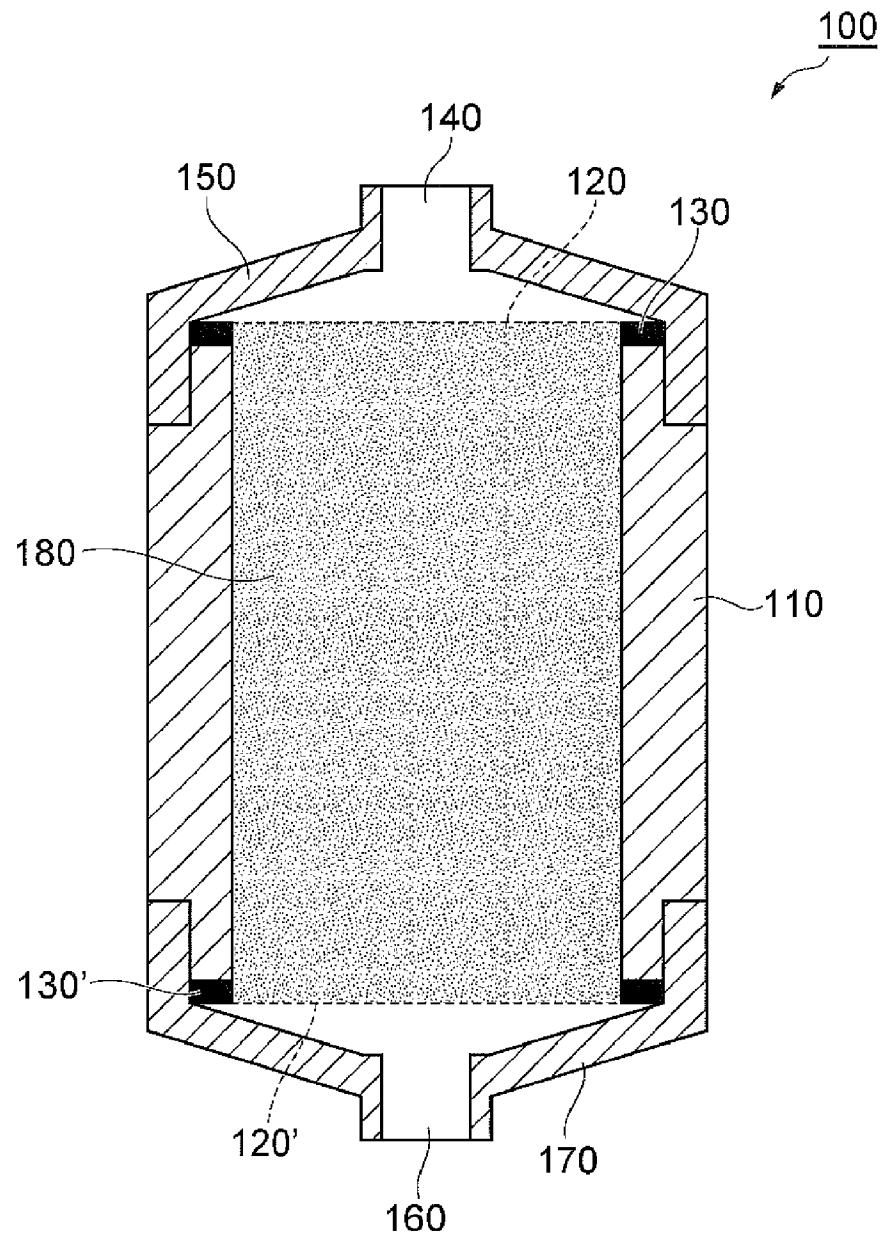
[請求項12] 前記生体由来液が体液である、請求項11に記載の生体由来液浄化デバイス。

[請求項13] 前記体液が血液である、請求項12に記載の生体由来液浄化デバイス。

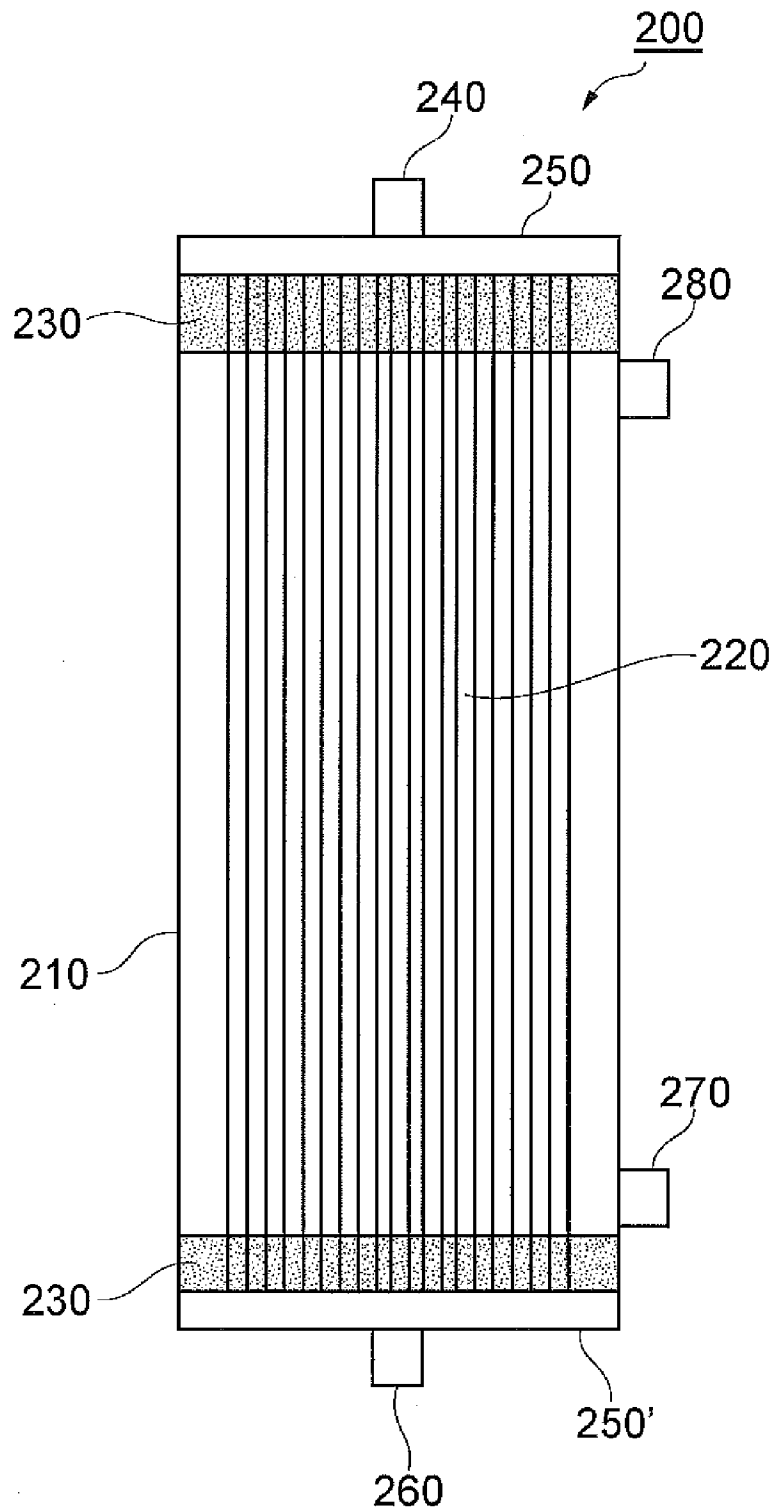
[請求項14] 請求項11～13のいずれかに記載のデバイスを用いて生体由来液からヒストンを除去するヒストン除去方法。

[請求項15] 請求項11～13のいずれかに記載のデバイスを用いて、血液あるいは血漿を通過させ、血液あるいは血漿中からヒストン含有量を減量させ、全身性炎症反応症候群を治療する治療方法。

[図1]



[図2]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2015/070675

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

B01J20/26(2006.01)i, A61M1/02(2006.01)i, A61M1/36(2006.01)i

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

B01J20/26, A61M1/02, A61M1/36

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Jitsuyo Shinan Koho	1922-1996	Jitsuyo Shinan Toroku Koho	1996-2015
Kokai Jitsuyo Shinan Koho	1971-2015	Toroku Jitsuyo Shinan Koho	1994-2015

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	JP 2013-523772 A (Cytosorbents Corp.), 17 June 2013 (17.06.2013), entire text & US 2013/0195792 A1 & WO 2011/123767 A1 & EP 2552459 A1 & CA 2795177 A1 & CN 103037869 A	1-14
A	JP 64-026656 A (Paul Corp.), 27 January 1989 (27.01.1989), entire text & US 4886836 A & GB 2205839 A & EP 294186 A2	1-14
A	WO 2013/146142 A1 (Hoya Corp.), 03 October 2013 (03.10.2013), entire text (Family: none)	1-14



Further documents are listed in the continuation of Box C.



See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"I"

later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X"

document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y"

document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&"

document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

01 September 2015 (01.09.15)

Date of mailing of the international search report

08 September 2015 (08.09.15)

Name and mailing address of the ISA/

Japan Patent Office
3-4-3, Kasumigaseki, Chiyoda-ku,
Tokyo 100-8915, Japan

Authorized officer

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2015/070675

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	JP 2005-104908 A (Snow Brand Milk Products Co., Ltd.), 21 April 2005 (21.04.2005), entire text & US 2006/0286084 A1 & WO 2005/030244 A1 & EP 1669084 A1 & CA 2539445 A1	1-14
A	WO 2013/191280 A1 (The University of Tokyo), 27 December 2013 (27.12.2013), entire text & EP 2865384 A1	1-14

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2015/070675

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☒ Claims Nos.: 15
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
(See extra sheet)
2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.
- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.
- ☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2015/070675

Continuation of Box No.II-1 of continuation of first sheet(2)

The invention according to claim 15 relates to "a therapeutic method for treating systemic inflammatory response syndrome" and thus pertains to methods for treatment of the human body by therapy. Therefore, this invention relates to a subject matter which this International Searching Authority is not required, under the provisions of Article 17(2)(a)(i) of the PCT and Rule 39.1 of the Regulations under the PCT, to search.

A. 発明の属する分野の分類（国際特許分類（I P C））

Int.Cl. B01J20/26(2006.01)i, A61M1/02(2006.01)i, A61M1/36(2006.01)i

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料（国際特許分類（I P C））

Int.Cl. B01J20/26, A61M1/02, A61M1/36

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

日本国実用新案公報	1 9 2 2 - 1 9 9 6 年
日本国公開実用新案公報	1 9 7 1 - 2 0 1 5 年
日本国実用新案登録公報	1 9 9 6 - 2 0 1 5 年
日本国登録実用新案公報	1 9 9 4 - 2 0 1 5 年

国際調査で使用した電子データベース（データベースの名称、調査に使用した用語）

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII)

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号
A	JP 2013-523772 A（サイトソーベント・コーポレーション） 2013.06.17, 全文 & US 2013/0195792 A1 & WO 2011/123767 A1 & EP 2552459 A1 & CA 2795177 A1 & CN 103037869 A	1-14
A	JP 64-026656 A（ポール・コーポレーション）1989.01.27, 全文 & US 4886836 A & GB 2205839 A & EP 294186 A2	1-14
A	WO 2013/146142 A1（HOYA株式会社）2013.10.03, 全文（ファミリーなし）	1-14

☒ C 欄の続きにも文献が列挙されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの

「E」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの

「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献（理由を付す）

「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献

「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの

「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの

「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの

「&」同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

0 1 . 0 9 . 2 0 1 5

国際調査報告の発送日

0 8 . 0 9 . 2 0 1 5

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁（I S A / J P）

郵便番号 1 0 0 - 8 9 1 5

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官（権限のある職員）

池田 周士郎

4 Q

3 9 0 9

電話番号 0 3 - 3 5 8 1 - 1 1 0 1 内線 3 4 6 8

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号
A	JP 2005-104908 A (雪印乳業株式会社) 2005. 04. 21, 全文 & US 2006/0286084 A1 & WO 2005/030244 A1 & EP 1669084 A1 & CA 2539445 A1	1-14
A	WO 2013/191280 A1 (国立大学法人 東京大学) 2013. 12. 27, 全文 & EP 2865384 A1	1-14

第II欄 請求の範囲の一部の調査ができないときの意見（第1ページの2の続き）

法第8条第3項（PCT第17条(2)(a)）の規定により、この国際調査報告は次の理由により請求の範囲の一部について作成しなかった。

1. ☒ 請求項 15 は、この国際調査機関が調査することを要しない対象に係るものである。
つまり、
請求項 15に係る発明は「全身性炎症反応症候群を治療する治療方法」であるから、治療による人体の処置方法に該当し、PCT第17条(2)(a)(i)及びPCT規則39.1の規定により、この国際調査機関が調査することを要しない対象に係るものである。
2. ☐ 請求項 は、有意義な国際調査をすることができる程度まで所定の要件を満たしていない国際出願の部分に係るものである。つまり、
3. ☐ 請求項 は、従属請求の範囲であってPCT規則6.4(a)の第2文及び第3文の規定に従って記載されていない。

第III欄 発明の単一性が欠如しているときの意見（第1ページの3の続き）

次に述べるようにこの国際出願に二以上の発明があるところの国際調査機関は認めた。

1. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料をすべて期間内に納付したので、この国際調査報告は、すべての調査可能な請求項について作成した。
2. ☐ 追加調査手数料を要求するまでもなく、すべての調査可能な請求項について調査することができたので、追加調査手数料の納付を求めなかった。
3. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を一部のみしか期間内に納付しなかったため、この国際調査報告は、手数料の納付のあった次の請求項のみについて作成した。
4. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を期間内に納付しなかったため、この国際調査報告は、請求の範囲の最初に記載されている発明に係る次の請求項について作成した。

追加調査手数料の異議の申立てに関する注意

- ☐ 追加調査手数料及び、該当する場合には、異議申立手数料の納付と共に、出願人から異議申立てがあった。
- ☐ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがあったが、異議申立手数料が納付命令書に示した期間内に支払われなかった。
- ☐ 追加調査手数料の納付はあったが、異議申立てはなかった。