

(19) 日本国特許庁(JP)

## (12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第4860857号  
(P4860857)

(45) 発行日 平成24年1月25日(2012.1.25)

(24) 登録日 平成23年11月11日(2011.11.11)

(51) Int.Cl.

C 12 N 9/74 (2006.01)

F 1

C 12 N 9/74

請求項の数 6 (全 19 頁)

(21) 出願番号 特願2001-501247 (P2001-501247)  
 (86) (22) 出願日 平成12年6月2日 (2000.6.2)  
 (65) 公表番号 特表2004-500026 (P2004-500026A)  
 (43) 公表日 平成16年1月8日 (2004.1.8)  
 (86) 國際出願番号 PCT/US2000/011865  
 (87) 國際公開番号 WO2000/074713  
 (87) 國際公開日 平成12年12月14日 (2000.12.14)  
 審査請求日 平成19年4月11日 (2007.4.11)  
 (31) 優先権主張番号 09/328,350  
 (32) 優先日 平成11年6月4日 (1999.6.4)  
 (33) 優先権主張国 米国(US)

(73) 特許権者 507101554  
 サーモジェネシス コーポレーション  
 アメリカ合衆国、カリフォルニア州 95  
 742, ランチョ コルドバ、シトラス  
 ロード 2711  
 (74) 代理人 100069062  
 弁理士 田代 和夫  
 (72) 発明者 コエロ、フィリップ、エイチ。  
 アメリカ合衆国、カリフォルニア州 95  
 762, エル ドラド ヒルズ、ジオット  
 ウエイ 121  
 (72) 発明者 キングスレー、フィル  
 アメリカ合衆国、カリフォルニア州 95  
 827, サクラメント、アパラチアン ド  
 ライブ 9560

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】自己由来トロンビン

## (57) 【特許請求の範囲】

## 【請求項 1】

患者から自己由来トロンビンを生成する方法であって、該方法は、  
 患者から得た血液製剤から血漿を分離するステップと、  
 血漿にエタノールを添加して、プロトロンビンを含有する溶液を調製すると共にカルシウムイオンまたはCaCl<sub>2</sub>を添加して該溶液中のプロトロンビンをトロンビンに変換するステップであって、前記エタノールが前記溶液中に単位体積当たり体積率で8%から20%の濃度で存在するステップと、

トロンビンを濾別して、粒状物を除去するステップと、  
 食塩水、CaCl<sub>2</sub>溶液、および無菌水からなるグループのいずれかによってトロンビンを希釈することでトロンビンがフィブリノゲンをフィブリン凝塊に変換するのに必要な時間を変化させるステップと、からなる、患者から自己由来トロンビンを生成する方法。

## 【請求項 2】

血漿を得るために血液製剤を遠心分離することを含む、請求項1の方法。

## 【請求項 3】

重量、大きさ、及び蛋白質結合によって血漿を濾別することを含む、請求項1の方法。

## 【請求項 4】

単一の人物からトロンビンを生成する方法であって、該方法は、

単一の人物から採取された血漿からエタノールを加えることでプロトロンビンを分離すると共にカルシウムイオンまたはCaCl<sub>2</sub>を添加してプロトロンビンをトロンビンに変

換するステップであって、前記エタノールが単位体積当たりの体積率で8%から20%の濃度で存在するステップと、

トロンбинから粒状物を除去するステップと、

食塩水、CaCl<sub>2</sub>溶液、および無菌水からなるグループのいずれかによってトロンбинを希釈することでトロンбинがフィブリノゲンをフィブリン凝塊に変換するのに必要な時間を変化させるステップとからなる、トロンбинを生成する方法。

【請求項5】

単一の人物からトロンбинを生成する方法であって、該方法は、

単一の人物から採取した全血から血漿を得るステップと、

エタノールを血漿に添加して、プロトロンбинを含有する溶液を調製すると共にカルシウムイオンまたはCaCl<sub>2</sub>を添加してプロトロンбинをトロンбинに変換するステップであって、前記エタノールが前記溶液中に単位体積当たりの体積率で8%から20%の濃度で存在するステップと、

トロンбинを分離するステップと、

食塩水、CaCl<sub>2</sub>溶液、および無菌水からなるグループのいずれかによってトロンбинを希釈することでトロンбинがフィブリノゲンをフィブリン凝塊に変換するのに必要な時間を変化させるステップと、からなる、トロンбинを生成する方法。

【請求項6】

トロンбинを生成する方法であって、該方法は、

人物から採取した全血から血漿を得るステップと、

エタノールを血漿に添加して、プロトロンбинを含有する溶液を調製すると共にカルシウムイオンまたはCaCl<sub>2</sub>を添加してプロトロンбинをトロンбинに変換するステップであって、前記エタノールが前記溶液中に単位体積当たりの体積率で8%から20%の濃度で存在するステップと、

トロンбинを分離するステップと、

食塩水、CaCl<sub>2</sub>溶液、および無菌水からなるグループのいずれかによってトロンбинを希釈することでトロンбинがフィブリノゲンをフィブリン凝塊に変換するのに必要な時間を変化させるステップと、からなる、トロンбинを生成する方法。

【発明の詳細な説明】

(技術分野)

以下の発明は一般的に、所与の単位の血漿から高い比活性を有するトロンбин酵素を調製することに関する。このトロンбин酵素は十分に安定であって、室温またはそれ以下に保たれるときは、フィブリノゲンに富む凝固接着性蛋白質溶液を急速に凝固させる能力を6時間超にわたって保つ。

(背景技術)

フィブリン密封剤の処方は、凝固カスケード反応の最後のステップを模倣したものである。この反応においてトロンбин酵素はフィブリノゲンを開裂し、開裂したフィブリノゲンは架橋して半固体または可撓性のフィブリン凝塊となる。このフィブリン凝塊は創傷部に接着して、液の浸出に対する障壁を形成するとともに組織間の接着をもたらし、かくして処置部に止血および治癒能力を提供する。

今日市販されている、出願者のクリオシール<sup>TM</sup>システムは、提供者の血漿から約1時間で、フィブリノゲンおよび第八因子を含む、寒冷沈降され、濃縮された凝固接着性蛋白質を採取する装置である。血液銀行で常用されている、1日ないし2日を要する寒冷沈降工程に較べれば、クリオシール<sup>TM</sup>システムが提供する約1時間の寒冷沈降採取が意味するところは大きい。すなわちクリオシール<sup>TM</sup>システムによる凝固接着性蛋白質の採取を、手術周辺環境で患者をそばにして行うことができ、したがって何日も前から工程を開始する必要を避けることができる。

このようなクリオシール<sup>TM</sup>採取された凝固接着性蛋白質は、ウシまたはヒト・トロンбинと組み合わされて、外科手術の止血および組織接着に有用な生物的接着剤を形成する。しかしながら市販のトロンбинは一般にウシまたはヒトのプールされた血漿から由来し

10

20

30

40

50

ているので、患者は依然として望ましくない免疫反応や、血液中の感染性ウイルスおよび可能性としてはクロイツフェルト - ヤコブ病 ( CJD ) すなわち新変異型 CJD ( NVCJD ) による汚染の危険にさらされている。クリオシール<sup>TM</sup> 寒冷沈降の発明の一つの利点は、採取された凝固接着性蛋白質が患者自身の血液に由来しているので、このような凝固接着性蛋白質を患者の外科的創傷部に局所的に適用するときに、血液感染性の病気による汚染の危険が避けられるということにある。

しかしながら、外科手術患者の最も安全な条件は、凝固接着性蛋白質を採取したのと同じ提供者からトロンбин成分を採取して、二成分生物的密封剤を調製すること - すなわち完全に自己由来の生物的密封剤ないし接着剤を形成することによってもたらされる、ということは以前から理解されていた。

患者に由来するトロンбинおよび / またはフィブリノゲンを当該の患者に行われる医学的処置に利用するという発想は新規なものではなく、1974年にアンドリヤノヴァが最初に記述している。約20年後、セデルホルム - ウィリアムスのPCT特許 ( WO 94 / 00566, 1994年1月6日 ) が改良されたフィブリン接着剤を記載しており、ここではトロンбин成分は遠心分離、中間的沈殿物の分離、血液のイオン強度および血漿のPHの調整等を含む13のステップを要して得られ、これも同じ提供者の血漿に由来するフィブリノゲン成分と組み合わされる。しかしながらこのような多くの調製ステップは非常に時間を要するので、処理時間が1時間以内でなければならない手術周辺環境での用途には実用的ではない。

3年後、1977年にヒルシュ等 ( 米国特許第5,643,192号 ) が、上記セデルホルム - ウィリアムスに続いて、フィブリノゲンおよびトロンбин成分が同一提供者の血漿から由来する、他のフィブリン接着剤調製法を教示した。ヒルシュ特許は血漿中のフィブリノゲンの大部分を最初に沈殿除去して上澄みを調製し、次いでこの上澄み中の残部のフィブリノゲンを凝固させるトロンбин調製法を記載している。この方法はセデルホルム - ウィリアムスが教示する方法とは異なってより単純であるが、商業的に有用なトロンбинは得られない。なぜならば ( ヒルシュ等の図1参照 ) このトロンбинが5秒以下の凝固速度を与えるのはわずか4分間に過ぎず、10秒未満の凝固速度を与えるのはわずか47分間に過ぎないからである。

このような凝固速度は外科医の要求には合致しない、なぜならば外科医はヒルシュ等のフィブリン接着剤の限界前後で外科手術全体の計画をたてることは不可能だからである。

外科医はほとんどの場合、止血および組織密封または接着のために速効性 (< 5秒) の凝固時間を必要とする。凝固の遅い生物的接着剤 (> 5秒) は毛細管出血および出血によって、しばしば機能を果たす前に外科的創傷部から洗い去られてしまう。ヒルシュのフィブリン接着剤を使用する外科医は、ヒルシュ接着剤処置によって行おうとする止血および組織密封が、凝固時間が5秒未満に収まる4分間の枠内に行われるよう、外科手術を組むことが要求されるが、これはほとんどの外科手術にとってヒルシュ発明を全く非実用的なものにしている。なぜならば6時間に及ぶこともある外科手術の全経過にわたって、急速な止血と組織接着が要求されることがほとんどだからである。

以下に挙げる先行技術は出願者が知るところの先端技術を反映しており、関係する先行技術を開示すべき出願者の義務を果たすために包含されたものである。しかしながらこれらの参考文献のなかに、以下において詳細に開示し、具体的に請求する本発明の概念を、単独で教示したり、あるいは全ての考えられる組み合わせにおいて明白にしたりするものはない。

#### 米国特許文献

発明者	特許番号	発行日
Pumphrey	713,017	1902年11月 4日
Mobley	1,614,532	1927年1月18日
Ferry 他	2,533,004	1950年12月5日
Wahlin	2,747,936	1956年5月29日
Clark	3,179,107	1965年4月20日

Cobey	3,223,083	1965年12月14日	
Kennedy 他	3,236,457	1966年2月22日	
Meurer 他	3,269,389	1966年8月30日	
Venes, Jr.	3,416,737	1968年12月17日	
Horn	3,467,096	1969年9月16日	
Creighton 他	3,828,980	1974年8月13日	
Green	3,942,725	1976年3月9日	
Polnauer (故人) 他	3,945,574	1976年3月23日	
Speer	4,040,420	1977年8月9日	
Reinhardt 他	4,067,333	1978年1月10日	10
Kozam 他	4,109,653	1978年8月29日	
Sugitachi 他	4,265,233	1981年5月5日	
Schwartz 他	4,298,598	1981年11月3日	
Redl 他	4,359,049	1982年11月16日	
Schwartz 他	4,362,567	1982年12月7日	
Altshuler	4,363,319	1982年12月14日	
Schneider	4,374,830	1983年2月22日	
Schwartz 他	4,377,572	1983年3月22日	
Schwartz 他	4,414,976	1983年11月15日	
Stroetmann	4,427,650	1984年1月24日	20
Stroetmann	4,427,651	1984年1月24日	
Stroetmann	4,442,655	1984年4月17日	
Zimmerman 他	4,453,939	1984年6月12日	
Rose 他	4,627,879	1986年12月9日	
Redl 他	4,631,055	1986年12月23日	
Sakamoto 他	4,655,211	1987年4月7日	
Silbering 他	4,696,812	1987年9月29日	
Alterbaum	4,714,457	1987年12月22日	
Koizumi 他	4,734,261	1988年3月29日	
Eibl 他	4,735,616	1988年4月5日	30
Saferstein 他	4,752,466	1988年6月21日	
Wolf 他	4,767,416	1988年8月30日	
Skorka 他	4,826,048	1989年5月2日	
Davis	4,842,581	1989年6月27日	
Miller 他	4,874,368	1989年10月17日	
Avoy	4,902,281	1990年2月20日	
Seelich	4,909,251	1990年3月20日	
Tanaka 他	4,923,815	1990年5月8日	
Silbering 他	4,965,203	1990年10月23日	
Capozzi 他	4,978,336	1990年12月18日	40
Wolf 他	4,979,942	1990年12月25日	
L ' Hermite 他	4,987,336	1991年1月22日	
La Duka	5,089,415	1992年2月18日	
Kotitschke 他	5,099,003	1992年3月24日	
Wolf 他	5,104,375	1992年4月14日	
Capozzi 他	5,116,315	1992年5月26日	
Nishimaki 他	5,130,244	1992年7月14日	
Kraus 他	5,143,838	1992年9月1日	
Crowley 他	5,151,355	1992年9月29日	
Knighton	5,165,938	1992年11月24日	50

Galanakis	5,185,001	1993年2月9日	
Morse 他	5,219,328	1993年6月15日	
Fischer	5,290,259	1994年3月1日	
Sierra 他	5,290,552	1994年3月1日	
Michalski 他	5,304,372	1994年4月19日	
Fischer	5,328,462	1994年7月12日	
Lonneman 他	5,368,563	1994年11月29日	
Linnau	5,393,666	1995年2月18日	
Epstein	5,405,607	1995年4月11日	
Marx	5,411,885	1995年5月2日	10
Kikuchi 他	5,443,959	1995年8月22日	
Miller 他	5,474,540	1995年12月12日	
Broly 他	5,474,770	1995年12月12日	
Weis-Fogh 他	5,480,378	1996年1月2日	
Proba 他	5,506,127	1996年4月9日	
Cochrurn	5,510,102	1996年4月23日	
Antanavich 他	5,585,007	1996年12月17日	
Pines 他	5,605,887	1997年2月25日	
Cochrurn	5,614,204	1997年3月25日	
Marx	5,631,019	1997年5月20日	20
Hirsh 他	5,643,192	1997年7月1日	
Epstein	5,648,265	1997年7月15日	
Edwardson 他	5,750,657	1998年5月12日	
Cederholm-Williams	5,795,571	1998年8月18日	
Cederholm-Williams	5,795,780	1998年8月18日	
Edwardson 他	5,804,428	1998年9月8日	

外国特許文献

<u>出願者</u>	<u>国</u>	<u>特許番号</u>	<u>発行日</u>	
Zdari I	DE	DE 25,913	1884年2月12日	
Szent-Gyorgyi 他	CH	259,254	1949年6月1日	30
The Trustees of Columbia University in the City of New York	WIPO	WO 86/01814	1986年3月27日	
Weis-Fogh	WIPO	WO 88/02259	1988年4月7日	
Board of Reagents, The University of Texas System	WIPO	WO 88/03151	1988年5月5日	
	SU	1,527,261 A1	1989年12月7日	
Cryolife, Inc.	WIPO	WO 91/09641	1991年7月11日	
Baxter International, Inc.	EP	0 443 724 A1	1991年8月28日	40
Warner-Lambert Co.	EP	0 505 604 A1	1992年9月30日	
Octapharma AG	EP	0 534 178 A2	1993年3月31日	
Cryolife, Inc.	WIPO	WO 93/19805	1993年10月14日	
Cederholm-Williams 他	WIPO	WO 94/00566	1994年1月6日	
E. R. Squibb & Sons	EP	0 592 242 A1	1994年4月13日	
Plasmaseal Coporation	WIPO	WO 96/17871	1996年6月13日	

その他の先行技術（著者、題名、関係ページ、日付、等を含む）

Fenton, J.W.他、"Human Thrombins"、Chemistry & Biology of Thrombin、43-70ページ

。

Rosemberg, R.D.他、"Bovine Thrombin: Constant Specific Activity Products From Si

50

- ngle Animals"、Fed. Proc.、321ページ、要約 第361番。
- Quick, A.J.他、"Production Of Thrombin From Precipitate Obtained By Acidification Of Diluted Plasma"、114-118ページ。
- Eagle, H.、"Studies On Blood Coagulation"、531-545ページ、1934年。
- Mann, K.G.他、"The Molecular Weights Of Bovine Thrombin And Its Primary Auto-lys is Products"、6555-6557ページ、1969年。
- Mann, K.G.他、"Multiple Acrtive Forms Of Thrombin"、5994-6001ページ、1971年。
- Martin, M.他、"Thrombolysis In Patients With Chronic Arterial Occlusions"、Throm -bolytic Therapy、第 47巻、235-241ページ、1971年。
- Fenton, J.W.他、"Large-Scale Preparation And Preliminary Characterization Of Human Thrombin"、Biochimica et Biophysica Acta. 第229巻、26-32ページ、1971年。 10
- Andrianova 他、"An Accessible Methoc Of Simultaneous Production Of Fibrinogen And Thrombin From Blood"、648-650ページ、1975年 (Plus English Translation)。
- Georgi, M.他、"Occlusion Of The Renal Artery By Intra-Arterial Injection Of Thrombin In A Case Of Inoperable Renal Tumor"、Deutsche Medizinische Wochenschrift 、第 100(47)巻、2428-2429ページ、1975年(Plus English Translation)。
- Lundblad, R.L.他、"Preparation And Partial Characterization Of Two Forms Of Bovine Thrombin"、Biochemical and Biophysical Research Communications、第 66(2)巻、4 82-489ページ、1975年。
- Sakuragawa, N.他、"Purification And Some Characterization Of Human Thrombin"、Acta Medical et Biologica、第 23(1)巻、65-73ページ、1975年。 20
- Fenton, J.W.他、"Human Thrombins: Production, Evaluation, And Properties Of -Thrombin"、The Journal of Biologocal Chemistry、第 252(11)巻、3587-3598ページ、19 77年。
- Nordenman, B.他、"Purification Of Thrombin By Affinity Chromatography On Immobilized Heparin"、Thrombosis Research、第 11巻、799-808ページ、1977年。
- Nowotny, R.他、"Mechanical Properties Of Fibrinogen-Adhesive Material"、Bio-materials 1980、第 3巻、677-682ページ、1982年。
- Kotelba-Witkowska, B.他、"Cryopreservation Of Platelet Concentrates Using Glycerol-Glucose"、Transfusion、第 22(2)巻、121-124ページ、1982年。 30
- Redl, H.他、"Fibrin Sealant-Antibiotic Mixture - Stability And Elution Behavior" 、Fibrinkleber Orthop. Traumatol. Orthop. Symp.、第 4巻、178-181ページ、1982年 (Plus English translation)。
- Redl, H.他、"In Vitro Properties Of Mixtures Of Fibrin Seal And Antibiotics"、Biomaterials、第 4(1)巻、29-32ページ、1983年。
- Gestring, G.他、"Autologous Fibrinogen For Tissue-Adhesion, Hemostasis And Embolization"、Vascular Surgery、第 17巻、294-304ページ、1983年。
- Wolf, G.、"The Concentrated Autologous Tissue Glue"、Archives of Oto-Rhino-Laryngology、第 237巻、279-283ページ、1983年。
- Tsvetkov, T.S.他、"A Method For Preparation Of Dry Thrombin For Topical Application"、Cryobiology、第 21(6)巻、661-663ページ、1984年。 40
- Yu, X.J.他、"Affinity Chromatography Of Thrombin On Modified Plystyrene Resins" 、Journal of Chromatography、第 376巻、429-435ページ、1986年。
- Fischer, A.M.他、"Thrombin Purification By One-Step Preparative Affinity Chromatography On Modified Polystyrenes"、Journal of Chromatography、第 363(1)巻、95-10 0ページ、1986年。
- Harpel, P.C.、"Blood Proteolytic Enzyme Inhibitors: Their Role In Modulating Blo od Coagulation And Fibrinolytic Enzyme Pathways"、219-234ページ、1987年。
- Fenton, J.w.、"Regulation Of Thrombin Generation And Functions"、Seminars in Thrombosis and Hemostasis、第 14(3)巻、234-240ページ、1988年。 50

Awano, K.他、"Role Of Serotonin, Histamin, And Thromboxane A2 In Platelet-Induced Contractions Of Coronary Aeteries And Aortae From Rabbits"、Journal of Cardiovascular Pharmacology、第 13(5)巻、781-792ページ、1989年。

Mulvihill, J.他、"Thrombin Stimulated Platelet Accumulation On Protein Coated Glass Capillaries: Role Of Adhesive Platelet -Granule Proteins"、Thromosis and Hemostasis、第 62(3)巻、989-995ページ、1989年。

Suzuki, S.他、"A Study On The Properties Of Commercial Thrombin Preparations"、Thrombosis Research、第 53(3)巻、271-277ページ、1989年。

Ronford, V.他、"Use Of Human Keratinocytes Cultured On Fibrin Glue In The Treatment Of Burn Wounds"、Burns、第 17(3)巻、181-184ページ、1991年。 10

Brennan, M.、"Fibrin Glue"、Blood Reviews、第 5巻、240-244ページ、1991年。

DePalma, L.他、"The Preparation Of Fibrinogen Concentrate For Use As Fibrin Glue By Four Different Methods"、Transfusion、第33(9)巻、717-720ページ、1993年。

McCarthy, P. "Fibrin Glue In Cardiothoracic Surgery"、Transfusion Medicine Reviews、第 7(3)巻、173-179ページ、1993年。

Cederholm-Williams, S.、"Benefits Of Adjuvant Fibrin Glue In Skin Grafting"、The Medical Journal of Australia、第 161(9)巻、575ページ、1994年。

Cederholm-Williams, S.、"Autologous Fibrin Sealants Are Not Yet Available"、The Lancet、第 344巻、336ページ、1994年。

Wiegand, D.A.他、"Assessment Of Cryoprecipitate-Thrombin Solution for Dural Repair"、Head & Neck、569-573ページ、1994年。 20

上に列挙したその他の先行技術は、そのすべてについて具体的に論評しないが、出願者の知るところの先行技術を網羅したものである。これらの論評されない参考文献は、以下に具体的に特徴を述べる本発明とは、さらに明瞭に異なっている。

(発明の開示)

本発明は、長い手術時間（例えば 6 時間）にわたって急速な（< 5 秒）凝固を提供するような安定なヒト・トロンビンを、提供者の血液から調製するための簡単で実用的で早い方法という、長い間感じられていた必要性に指向されたものであり、またこのヒト・トロンビンを、同じ単位の血液から採取され、濃縮された凝固接着性蛋白質と組み合わせることによって、患者を微生物や CJD または NVCD による汚染にさらすことのない生物的密封剤を形成することに指向されたものである。この分野におけるこれまでの研究（ヒルシュ等）によって提示されたトロンビンは最小限度の安定性しかなかった、すなわちこのトロンビンは 4 分ないし 5 分という非常に短い時間の間しか、急速な（つまり 5 秒未満の）フィブリノゲン凝固を達成できなかった。またそれは非常に多くのステップと経過時間を要するために、手術周辺での調製に適しなかった。これら二つの事情は広範囲の手術に対して全く非実用的であった。 30

本発明が提供する安定なトロンビン酵素は、6 時間に達する経過時間にわたって - すなわち長時間の手術であっても、その間にわたって - 凝固接着性蛋白質の急速な、または緩徐な重合を、正確に再現性良く起こさせることができる。さらに、すべて単一の提供者に由来する凝固接着性蛋白質およびトロンビンを用いることによって、市販のフィブリント接着剤を使用することによって生じる様々な病気の危険が排除される。市販のフィブリント接着剤においては、フィブリントは何千人という提供者からプールされた血漿に由来しており、トロンビンは同様なプールされたヒト血漿に由来するか、またはウシ由来のものである。本発明による安定なトロンビンの製造は早くして簡単なので、手術処置の直前またはその過程で調製することが可能になり、得られたトロンビンは最も長時間の手術においても、その間にわたって急速凝固を提供する。本発明によって製造されたトロンビンは食塩水（生理食塩水）、水、または希薄  $\text{CaCl}_2$  溶液（例えば 125 mM の  $\text{CaCl}_2$ ）に希釈可能であり、希釈によって正確な、より遅い凝固時間を提供する。このようにして、5 秒未満から 2 分間超にわたる任意の凝固時間が得られる。 40

本発明の方法は好ましくは三つのステップからなり、そのはじめの二つのステップは好 50

ましくは同時に行われる。

1. エタノールを用いてプロトロンビンの濃度を実質的に高めることによって、プロトロンビンが濃縮されたフラクション（分画）を調製し、同時に血漿中に自然に存在するフィブリノゲンやアンチトロンビンIIIなどの成分を除去または変性する。これらの成分はプロトロンビンに結合し、封鎖し、または介在して、プロトロンビンが活性化して長寿命の機能性トロンビンになるのを阻害する。

2. 濃縮されたプロトロンビン溶液にカルシウムイオンを加えて軽く攪拌し、プロトロンビンを安定な長寿命トロンビンに変換する。

3. トロンビン溶液をフィルターを通して押し出して、粒状物（粒状物質）を除去する。この粒状物はトロンビンを創傷部上に狭いオリフィスからスプレーしたり、細いチューブから押し出すのを妨げる。  
10

（産業上の利用可能性）

本発明の産業上の利用可能性は、以下に述べる本発明の目的の説明により明らかとなる。  
。

すなわち、本発明の第1の目的は、提供者の血漿から速効性かつ安定な自己由来トロンビンを得るための、新式かつ新規な装置および方法を提供することである。

本発明の他の目的は、関連するほとんどの外科処置よりも可使用時間の長い、上記特徴のトロンビンを提供することである。

本発明の他の目的は、食塩水希釈によって凝固時間を任意にかつ予知可能に延長できるような、前記特徴のトロンビンを提供することである。  
20

本発明の他の目的は、単純な調製工程を有する、前記特徴のトロンビンを提供することである。

本発明の他の目的は、短くて30分、長くとも75分の工程時間有する、前記特徴のトロンビンの製造方法を提供することである。

本発明の他の目的は、狭いオリフィスからスプレーしたり、細いチューブから押し出すことのできるトロンビンを提供することである。

第1の利点から見れば本発明の目的は、エタノール分別によってプロトロンビン濃度を増加させて実質的に濃縮すると同時に、不純物としての蛋白質を除去したプロトロンビンのフラクションから、安定なヒト・トロンビンを製造するための、新規かつ実用的な方法を提供することである。濃縮されたプロトロンビンに塩化カルシウム（CaCl<sub>2</sub>）を添加することによって、プロトロンビンはトロンビンに変換される。同じ単一の提供者の血漿から、他の方法によって凝固接着性蛋白質が同時に得られ、自己由来の生物的接着剤に必要な第2の成分となる。  
30

第2の利点から見れば本発明の目的は、患者から自己由来のトロンビンを生成する方法を提供することであり、該方法は患者から血液製剤を得るステップ、得られた血液製剤から血漿を分離するステップ、血漿フラクション中のプロトロンビンを濃縮するステップ、プロトロンビンをトロンビンに変換するステップ、およびトロンビンから粒状物を濾別するステップ、の各ステップを含む。

第3の利点から見れば本発明の目的は、15分間超にわたって安定な自己由来トロンビンを製造するための方法を提供することであり、該方法は血漿からプロトロンビンを分離するステップ、およびプロトロンビンをトロンビンに変換するステップを含む。  
40

第4の利点から見れば本発明の目的は、15分間超にわたって5秒未満の急速な凝固を提供する自己由来トロンビンを提供することである。

第5の利点から見れば本発明の目的は、必須的に血漿、エタノール（ETOH）、CaCl<sub>2</sub>からなる、血漿からトロンビンを抽出するための組成物を提供することである。

第6の利点から見れば本発明の目的は、トロンビンの調製方法を提供することであり、該方法は：血漿を採取すること、血漿にETOHおよびCaCl<sub>2</sub>を添加して組成物を形成すること、組成物を攪拌すること、組成物を静置モードまたは振動モードで定温放置ないし保温（incubate）すること、組成物から粒状物を濾別し、トロンビンをフィルター通過させること、からなる。  
50

第7の利点から見れば本発明の目的は、血漿からトロンビンを製造するための装置を提供することであり、該装置はCaCl<sub>2</sub>およびETOHの溶液を入れた反応容器と、血漿を反応容器中に導入する手段と、反応容器に結合されてトロンビンを受け入れるためのトロンビン受入注射器と、反応容器とトロンビン受入注射器の中間に位置するフィルターと、からなる。

第8の利点から見れば本発明の目的は、自己由来の生物的接着剤を処理する装置を提供することであり、該装置はトロンビン処理手段と、トロンビン処理手段に操作可能に結合された凝固接着性蛋白質処理手段と、血漿をその後にトロンビンと凝固接着性蛋白質にそれぞれ変換するために、操作可能のカップリングから血漿を受け入れる手段と、を組み合わせてなる。

本発明は、十分に安定であって最大6時間にわたって5秒未満の凝固を提供するようなトロンビンを製造するための方法及び装置を提供する。これはすべての先行技術に示されるものよりはるかに安定である。また凝固時間は食塩水希釈によって任意に調節できる。

さらにまた本発明は効率的な調製方法を提供する。クリオシール<sup>TM</sup>発明による凝固接着性蛋白質の改良された寒冷沈降の所要時間は1時間未満である。これと同じ時間枠内に、自己由来ヒト・トロンビン成分を、最小限度の原料および処理で同一の血漿源から製造することができる。生物的接着剤の両方の成分は外科手術の状況において容易に組み合わせて、提供者と同一人である患者に適用され、かくして生じた凝塊は創傷部における止血と組織接着を提供する。

これに加えて本発明は生物的接着剤の両成分の無菌的製造方法を提供する。ここに記述する改良された無菌的製造方法は、本質的に非自己由来微生物による汚染のない最終製剤を提供する。

これらの、およびその他の目的は、添付の図面を参照しつつ、以下の詳細な明細書に明らかにされるであろう。

#### (発明を実施するための形態)

図面を参照すれば、全体的に類似の要素は類似の部品を示しているが、参考符号10は図1Aおよび図1Bに示される本発明の処理セットを表している。

基本的には、処理セット10は液受入系統20を含み、該系統はトロンビン処理ユニット40と凝固接着性蛋白質処理ユニット60の、両方に連通している。

より具体的には、図1Aおよび図1Bを参照すると、液受入系統20はチューブ4に連通する入口2を含み、該入口を通して血漿が処理ユニット40, 60に入る。チューブ4にはストップバルブ6用の場所が2ヶ所あり、前記ストップバルブはチューブ4を閉止して液の流通を防ぐ。チューブ4はT字部品8を介して連通しており、血漿を二つの枝管に分けている。すなわちトロンビン処理ユニット40に通じる第1の枝管12および凝固接着性蛋白質処理ユニット60に通じる第2の枝管14である。第1の枝管12はまたストップバルブ6を含んでいる。

図1Bを参照すると、第1の枝管12を通して血漿をトロンビン処理ユニット40に導入する前に、あらかじめ液を入れた注射器95からの試薬が、プランジャー94をA'の方向に押すことによって、無菌バリアフィルター92を通して液受入系統20に注入される。試薬はワンウェイバルブ91、カップリング18及びバルブ91をつけたY字コネクタ90、および枝管チューブ93を通じて最終的にケーシング22の内部に入る。図3B及び図7Bを参照すれば、バルブ24は当初、試薬を反応容器26の方へ向けている。

入口2に導入される血液製剤は血漿であることが好ましいから、全血はまず濾別、遠心分離またはその他の沈降手段で重い赤血球を血液製剤から除去して、残った血漿を図1の装置に用いる。このシステムはどのような大きさのバッチに対しても対応する大きさにできるが、濃縮トロンビンの最終体積が凝固接着性蛋白質処理ユニット60からの寒冷沈降された凝固接着性蛋白質の通常の収率に見合うようにするために、トロンビン処理ユニットに必要とされる血漿は通常9-10mlである。

図1A及び図1Bに示される実施例においては、シールされたバッグ16および78が、トロンビン投与注射器42（および導管64の差し込み部）および寒冷沈降物保存注射

器 7 6 の両方を覆っており、このようにして両方の注射器が無菌の外科現場（例えば手術室）に持ち込まれるまで、無菌性が保たれる。その前に、トロンビン処理ユニット 4 0 は図 2 A から図 1 0 までに図示説明されるように作動する。図 1 B を参照すると、試薬が添加された後、血漿は第 1 の枝管 1 2 に入り、カップリング 1 8 を通過し、枝管チューブ 9 3 を通って、ケーシング 2 2 の内部に流入する。

ふたたび図 1 A を参照すると、トロンビン処理ユニット 4 0 は図 2 A 、 3 A 、 4 A 、 5 A 、 6 A 、 7 A 、 8 A 、 9 A 、 および図 1 0 に図示説明されるように作動する。前述したように、液は第 1 の枝管 1 2 に入り（図 1 A ）、カップリング 1 8 を通過してケーシング 2 2 の内部に流入する。カップリング 1 8 は好ましくは摩擦および／または接着剤によって枝管 1 2 に取り付けられているが、なおトロンビン処理ユニット 4 0 は血漿を受け入れた後、図 2 に示されるように（例えば図 2 A ）処理セット 1 0 から取り外すことができる（例えば枝管 1 2 を単に抜き取り、あるいはむしり取ることによって取り外され、その後おそらくはヒートシールされる）。接着剤が用いられる場合は、手術室で用いられるのと同様な無菌グレードのものが用いられる。

図 3 A を参照すると、バルブ 2 4 は当初は血漿を反応容器 2 6 の方に向けている。この反応容器は好ましくはガラス製の内部チューブ 2 8 a（図 6 A ）を有しており、該チューブは例えば 1 5 m l の容積（体積）を受け入れることができる。ガラスのチューブ 2 8 a は好ましくは外側のバレル 3 2 より短く、その中に包み込まれている。前記バレルは好ましくは PVC 製である。PVC バレル 3 2 の窓 3 1 a はガラスのチューブ 2 8 a の内容物を計量し、および／または確認するのに用いられる。計量はガラスのチューブ上の容積（体積）を示す目盛り 2 9 を含んでもよい。反応容器 2 6 のガラスのチューブ 2 8 a は第 1 の枝管 1 2 から血漿を内部に受け入れ、これをあらかじめガラスのチューブ 2 8 a に入れられた後述の試薬と混合する。図 7 A に示されるように、ガラスチューブの内部は好ましくは硼珪酸ガラス、ガラス、またはセラミック製のビーズ 2 5 で、好ましくは部分的にあらかじめ充填されており、このビーズが反応および攪拌を促進する。

図 3 B を参照すると、バルブ 2 4 は当初は血漿を反応容器 2 6 の方へ向けている。この反応容器は好ましくは透明ポリカーボネート製のチューブ 2 8 b（図 6 B ）を有しており、例えば 1 5 m l の容積を受け入れることができる。ポリカーボネートのチューブ 2 8 b 上の目盛り 3 1 b は、チューブ 2 8 b 中の内容物を計量するのに用いられる。反応容器 2 6 のポリカーボネートのチューブ 2 8 b は第 1 の枝管 1 2 から血漿を内部に受け入れ、これをあらかじめポリカーボネート製のチューブ 2 8 b に入れられた後述の試薬と混合する。図 7 B に示されるように、ポリカーボネートのチューブ 2 8 b の内部は、好ましくは硼珪酸ガラス、ガラス、またはセラミック製のビーズ 2 5 で、好ましくは部分的にあらかじめ充填されており、このビーズが反応および攪拌を促進する。

図 1 A および図 3 A に示される実施例の、第 1 と第 2 の端部キャップ 3 4 を有してなる反応容器 2 6 の詳細が、図 6 A 、 7 A および図 8 A に示されている。各端部キャップは、中央の、外側に向かって円錐状に先細になったスパウト 3 6 を有し、これは一端部においてバルブ 2 4 に、反対側の端部においてもう一つのバルブ 4 4 に連通している。各スパウト 3 6 は、絞り部 4 8 内に入れられたスクリーン 2 3 によって、ビーズ 2 5 から遮断されている。バルブ 2 4 は三つの枝管を有する。バルブ 4 4 も同様であるが、バルブ 4 4 は、一つの枝管がキャップ 4 5 によって封鎖されているので二股のバルブをなしている。各バルブ 2 4 、 4 4 の一つの枝管は、各キャップ 3 4 から突き出したスパウト 3 6 にそれぞれ連通している。各バルブの一つの枝管と、そのガラスのチューブ 2 8 a 内部につながるスパウトとの間には液体流通があり、バルブ 2 4 、 4 4 が貫流する流れを制御している。図 8 A に示されるように、キャップ 3 4 は環状の絞り部 4 8 を有しており、これが PVC バレル 3 2 内部の空腔に摩擦的に、および／または接着剤を用いて係止している。このようにして絞り部 4 8 はガラスのチューブ 2 8 a の端部に係止してこれと密閉的に係合しており、かくして反応容器の内部を PVC バレル 3 2 から遮断している。

図 1 B および図 3 B に示される実施例の、主としてポリカーボネートからなる反応容器 2 6 の詳細が、第 6 B 、 7 B 、 および 8 B 図に示されている。この反応容器 2 6 を形成す

10

20

30

40

50

る第1と第2の端部キャップ34の詳細が図8Bに示されている。各端部キャップは、中央の、外側に向かって円錐状に先細になったスパウト36を有し、これは一端部においてバルブ24に、反対側の端部においてもう一つのバルブ44に連通している。各スパウト36は、内部の障害物を有し、これが液の通過は許すがビーズ25の通過を防いでいる。バルブ24は三つの枝管を有する。バルブ44も同様であるが、バルブ44は一つの枝管がキャップ45によって封鎖されているので二股のバルブをなしている。各バルブ24、44の一つの枝管は、各キャップ34から突き出したスパウト36にそれぞれ連通している。各バルブの一つの枝管と、そのポリカーボネートのチューブ28b内部につながるスパウトとの間には液体流通があり、バルブ24, 44が貫流する流れを制御している。図8Bに示されるように、キャップ34は環状の内部後退部48を有しており、これがポリカーボネートチューブ28bの内部表面に接着剤によって係止している。 10

好ましくは、反応容器26または試薬注射器95にあらかじめ入れておく試薬はエタノールおよび塩化カルシウムである。図1Aの実施例については、当初バルブ24, 44はいずれも試薬がこれを通過しないような方向に向いていて、反応容器を密閉している。図1Bを参照すると、当初バルブ24は血漿が反応容器26に入らないような方向に、またバルブ44は反応容器26と吸引プランジャー58との間の通過を許すような方向に向いている。ふたたび図1Aを参照すれば、血漿が処理ユニット60へポンプ送りされた後、バルブ44はプランジャー58への連通を許す方向に回され、バルブ24は通路21と反応容器26との連通を許す方向に向けられる。トロンビン処理ユニット40を図1Aの平面に関して垂直に保持した状態でスライドクリップ6が開けられ、注射器のプランジャー58が矢印Aの方向へ動かされて反応容器26中の空気を脱気する。ふたたび図1Bを参照すれば、試薬注射器95が無菌のバリアフィルター92の解放端に取り付けられる。プランジャー94が押されて、試薬を無菌のバリアフィルターおよび枝管チューブ93を通して反応容器26に移送する。図1Aの実施例と同様に図1Bにおいても、トロンビン処理ユニット40を図1Bの平面に関して垂直に保持した状態で注射器のプランジャー58が矢印Aの方向へ動かされ、反応容器26中の空気を脱気する。両実施例とも、注射器56は流れの経路に置かれたフィルター62を含んでいる。より具体的には、バルブ44と注射器56の間のプランジャー43は流れの経路に置かれたフィルター62を含んでいる。フィルター62は無菌的な微生物バリアを提供するので、後でトロンビンを投与注射器42(図1)に送る際に、プランジャー58のシール57まわりからの汚染物が注射器42に送られることはない。次いで血漿がチューブ4から反応容器26に入り、空気を置換する。バルブ24はフィルター66の方向へ向けられる。試薬と血漿はビーズ25の助けで軽く攪拌される(そして約40ないし70分間だけ定温放置ないし保温(incubate)される)。定温放置ないし保温(incubate)後、トロンビン処理ユニット40は生成したゲルをゆるめて崩すために攪拌される。図1Bの実施例においては、トロンビン処理ユニット40は次いで10分間以上、水平位置にもどして静置される。その後トロンビン処理ユニット40は生成したゲルをゆるめて崩すためにふたたび攪拌される。両実施例とも、注射器56のプランジャーが矢印Aと反対の方向に動かされてトロンビンを反応容器26からフィルター66を通して注射器42に送る。注射器42へのトロンビンの送液は注射器42のプランジャー43を後退させて、ブッシュプルシステムを形成することによって促進される。フィルター66はトロンビンからゲルを含む粒状物を除去する。 20 30 40

反応容器26に入れられたトロンビンを攪拌の後10分間以上静置することによって、後の使用を便にするために粒状物を除去するフィルター66の効果が促進される。この変換と活性化のための時間によって粒状物がフィルターで十分に除去されるようになり、後でトロンビンをスプレーなどの狭いオリフィスから噴出したり、細いチューブから押し出して用いるのが容易になる。

図9A、9B、および図10はフィルター66の別法を開示している。これは円筒形の外壁65と端部キャップ34を含み、各端部キャップは、円筒形のスパウト37と、それを取り囲む環状の凹部39を有している。図9Aに示される別法の実施例は、中心に配置された好ましくはポリウレタンフォーム製の円筒形のフィルター要素67aを示している 50

。これに対して図 9 B に示される中心に配置された円筒形のフィルター要素 67 b は、好みしくはポリエステルを巻いたものでできている。図 9 B にはまた好みしくはグラスファイバーまたはポリエステル製の円形のフィルター 68 が示されている。いずれの別法実施例においても、フィルター 67 a または 67 b は重量、大きさ、および蛋白質結合によって濾別する。

ふたたび図 1 A および図 1 B を参照して、こんどは凝固接着性蛋白質処理ユニット 60 に注目する。トロンビン処理ユニット 40 に向けられなかつたすべての血漿は、凝固接着性蛋白質処理ユニット 60 の内部容器 72 に導入される。凝固接着性蛋白質処理ユニット 60 は熱交換と回転の操作を受け、これによって血漿から抽出されたすべての凝固接着性蛋白質は内部容器 72 の先端 74 に沈殿し、続いて凝固接着性蛋白質収集チューブまたは無菌のパウチ 78 に入れられた投与注射器 76 によって抜き取られる。容器 72 はこの工程の間、汚染を防ぐフィルター通気孔 82 によって保護されている。トロンビンが投与注射器 42 に充填され、凝固接着性蛋白質が凝固接着性蛋白質収集チューブまたは投与注射器 76 に充填されたならば、二つの注射器 42, 76 は処理セット 10 から（例えば無菌の取り外し装置で）取り外され、無菌の外科現場の近傍に移される。続いて外側を覆うバッグが開かれ、注射器 42, 76 が取り外されて外科現場に移され、ここで内容物がそれぞれの無菌の 3cc プラスチック注射器に分配される。これらは続いてフィブリン接着剤塗布器に充填され、線状または点状に塗布される。トロンビンを凝固接着性蛋白質と混合することによって生物的接着剤が形成される。

両投与注射器 42 および 76 は、室温、または好みしくはそれぞれの最適条件で保存される。すなわち寒冷沈降物 76 は室温で保存され、トロンビン 42 は 1 ないし 5 の氷浴中に保存される。図 13 から図 16 までを参照されたい。

9 ~ 10 ml の室温血漿が反応容器 26 に導入されたとする。その他の血漿量も有用である。図 15 および図 16 を参照されたい。1.0 ml の 75 mM 塩化カルシウム (CaCl<sub>2</sub>) および 2.0 ml のエタノール (ETOH) を添加する（すなわちエタノールは 100% の「ストック」瓶から採られて添加され、体積 / 単位体積でエタノール 18.9%、あるいは重量 / 単位体積でエタノール 15.02% を占める）。エタノールに関する他の試薬量対血漿量の比も有用な相がある（すなわちエタノールは 100% の「ストック」瓶から採られ、塩化カルシウム (CaCl<sub>2</sub>) は 75 mM のストック溶液から採られる）。図 13 および図 14 を参照されたい。トロンビンの寿命は、2.98 秒の凝固時間を持つつ少なくとも 300 分であることが示されている。エタノールの最終濃度は 8.0% から 20.0%（体積 / 単位体積）の範囲にわたっているが、なお有用である。図 11 を参照されたい。

エタノールの最終濃度が体積 / 単位体積で 18.9%（上述通り）で、塩化カルシウムの最終濃度が 5.7 mM（塩化カルシウムの 75 mM ストック溶液の 1 ml を採る）である場合、トロンビンの寿命は少なくとも 360 分に延び、この間凝固時間はトロンビンの室温保存において 5.98 秒に保たれる。トロンビンを氷浴中で最適の 1 ないし 5 に保存すれば通常、360 時間ににおいて 2 秒ないし 3 秒の凝固時間が保たれる。しかしながら塩化カルシウムの、50 mM から 250 mM までの範囲のストック溶液濃度が有用である。図 12 を参照されたい。最終濃度は 4.5 mM から 23 mM の範囲である。

食塩水、希薄 CaCl<sub>2</sub>（例えば 40 mM ないし 125 mM の CaCl<sub>2</sub>）などの溶液、あるいは無菌水をトロンビンに加えることによってトロンビンの凝固時間および寿命の両方を変化させることができる。エタノールの最終濃度 18.9% および塩化カルシウムの最終濃度 5.7 mM が反応容器 26 に用いられたとする。トロンビンを水で 1.5 倍に希釈すると、凝固時間は 30 秒弱に伸び、寿命は 150 分までとなる。

以上において本発明を説明したが、以上のように説明され、以下において請求範囲に記載される本発明の範囲および正当な意味から逸脱することなく、多くの構造的な改変および適応がなされ得ることは明らかである。

#### 【図面の簡単な説明】

【図 1 A】 図 1 A は、血漿からプロトロンビンを分離し、プロトロンビンを処理してト

10

20

30

40

50

ロンビンとし、プロトロンビン向け以外の血漿を採取してこのものから凝固接着性蛋白質を抽出するための器具の斜視図である。

【図1B】 図1Bは、血漿からプロトロンビンを分離し、プロトロンビンを処理してトロンビンとし、プロトロンビン向け以外の血漿を採取してこのものから凝固接着性蛋白質を抽出するための器具の斜視図である。

【図2A】 図2Aは、凝固接着性蛋白質を抽出する処理セットから取り外されたトロンビン処理セットの平面図である

【図2B】 図2Bは、凝固接着性蛋白質を抽出する処理セットから取り外されたトロンビン処理セットの平面図である。

【図3A】 図3Aは、トロンビン処理ケースの内部の斜視図であり、図2Aおよび図2Bに示されるトロンビン用注射器は取り外されている。 10

【図3B】 図3Bは、トロンビン処理ケースの内部の斜視図であり、図2Aおよび図2Bに示されるトロンビン用注射器は取り外されている。

【図4A】 図4Aは、トロンビン用ケースの上半部の斜視図である。

【図4B】 図4Bは、トロンビン用ケースの上半部の斜視図である。

【図5A】 図5Aは、トロンビン用ケースの下半部の斜視図である。

【図5B】 図5Bは、トロンビン用ケースの下半部の斜視図である。

【図6A】 図6Aは、図3Aおよび図3Bに示される反応容器26の部品分解図であり、併せて両端部のバルブ構造を示している。

【図6B】 図6Bは、図3Aおよび図3Bに示される反応容器26の部品分解図であり、併せて両端部のバルブ構造を示している。 20

【図7A】 図7Aは、図6Aおよび図6Bに示される反応容器およびバルブ構造の断面図である。

【図7B】 図7Bは、図6Aおよび図6Bに示される反応容器およびバルブ構造の断面図である。

【図8A】 図8Aは、図7Aおよび図7Bに示される構造の詳細図である。

【図8B】 図8Bは、図7Aおよび図7Bに示される構造の詳細図である。

【図9A】 図9Aは、図3Aおよび図3Bに用いられる別法のフィルターの部品分解図である。

【図9B】 図9Bは、図3Aおよび図3Bに用いられる別法のフィルターの部品分解図である。 30

【図10】 図10は、図9に示されるものの斜視図である。

【図11】 図11は、異なるETOH濃度で分別されたトロンビンの寿命対凝固時間のグラフである。

【図12】 図12は、異なるCAC<sub>1,2</sub>濃度における、異なるETOH濃度で分別されたトロンビンの寿命対凝固時間のグラフである。

【図13】 図13はトロンビンの寿命対凝固時間のグラフであり、トロンビンが氷浴中で保存されたときの試薬量による感度を示している。

【図14】 図14は、トロンビンの寿命対凝固時間のグラフであり、トロンビンが室温で保存されたときの試薬量による感度を示している。

【図15】 図15は、トロンビンの寿命対凝固時間のグラフであり、トロンビンが氷浴中で保存されたときの血漿量による感度を示している。

【図16】 図16は、トロンビンの寿命対凝固時間のグラフであり、トロンビンが室温で保存されたときの血漿量による感度を示している。 40

### 【図 1 A】

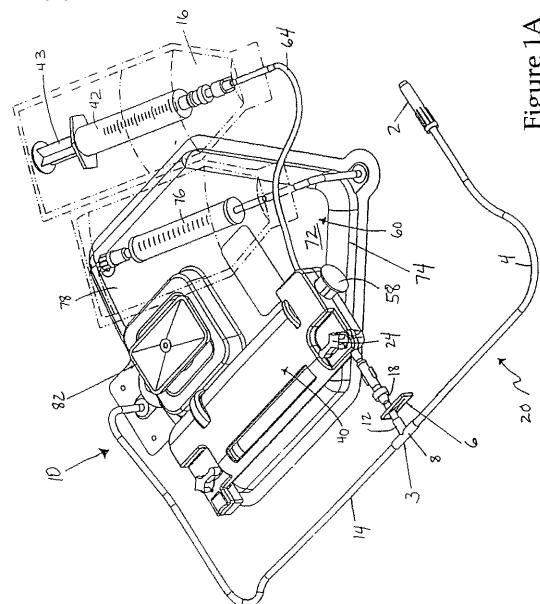


Figure 1A

【図1B】

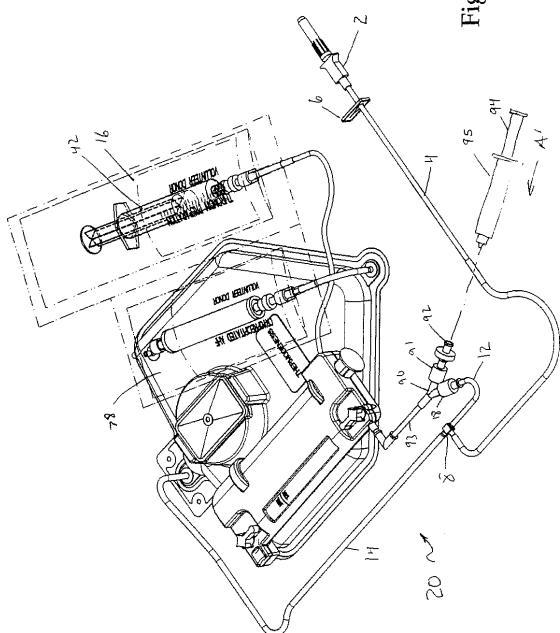


Figure 1B

### 【図2A】

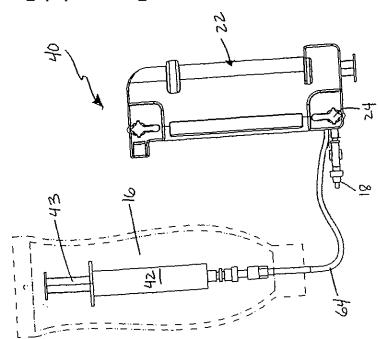


Figure 2A

### 【図2B】

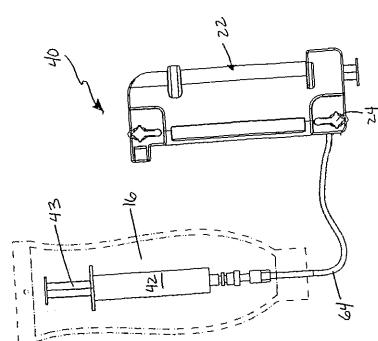


Figure 2B

【図3A】

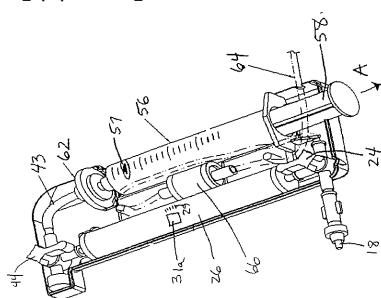


Figure 3A

【図3B】

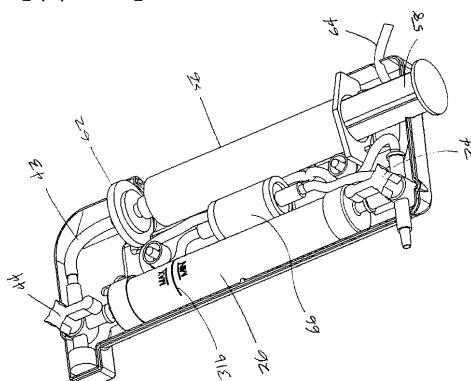


Figure 3B

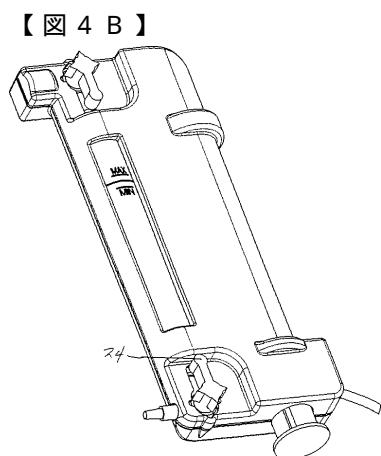
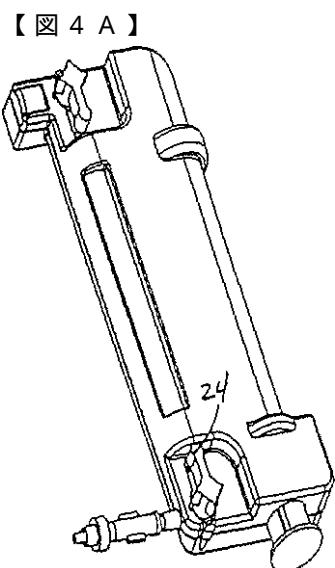


Figure 4B

Figure 4A

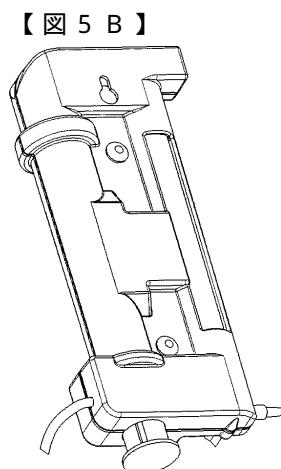
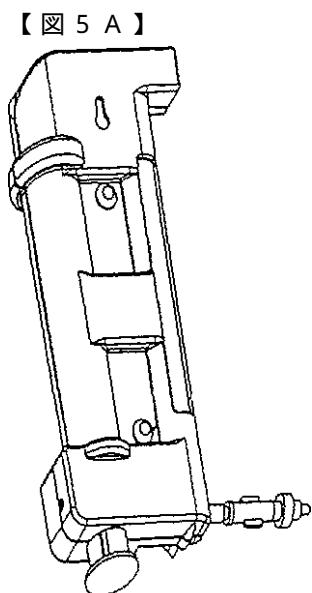


Figure 5B

Figure 5A

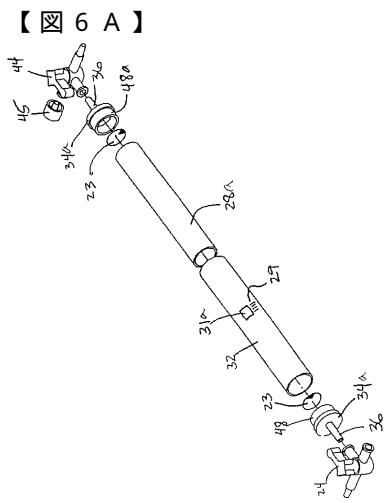


Figure 6A

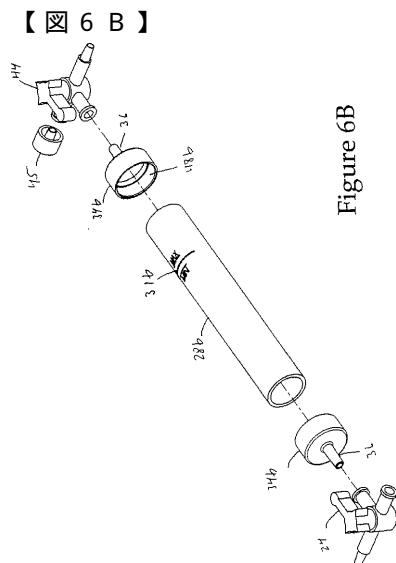


Figure 6B

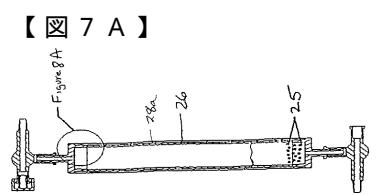


Figure 7A

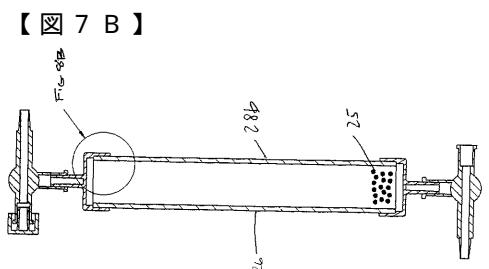


Figure 7B

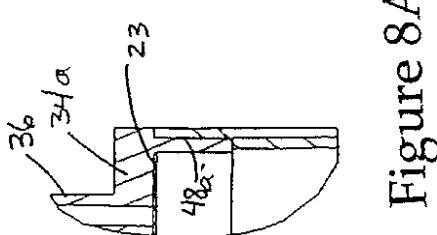


Figure 8A

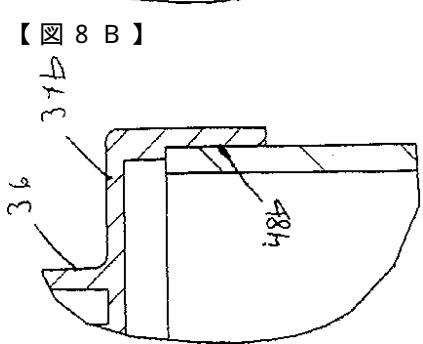


Figure 8B

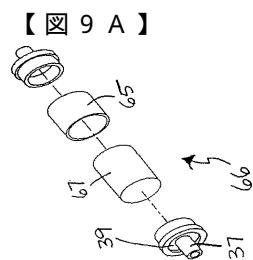


Figure 9A

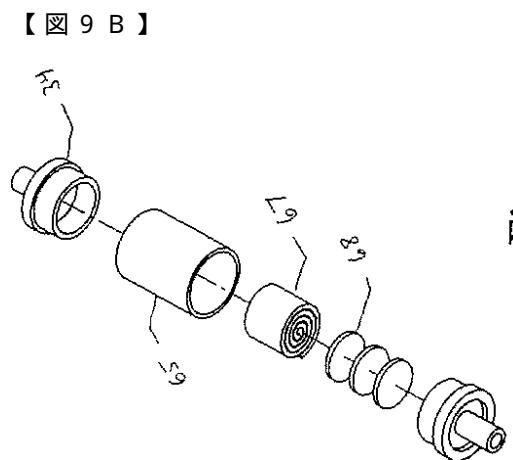


Figure 9B

【図 10】

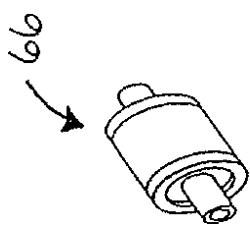
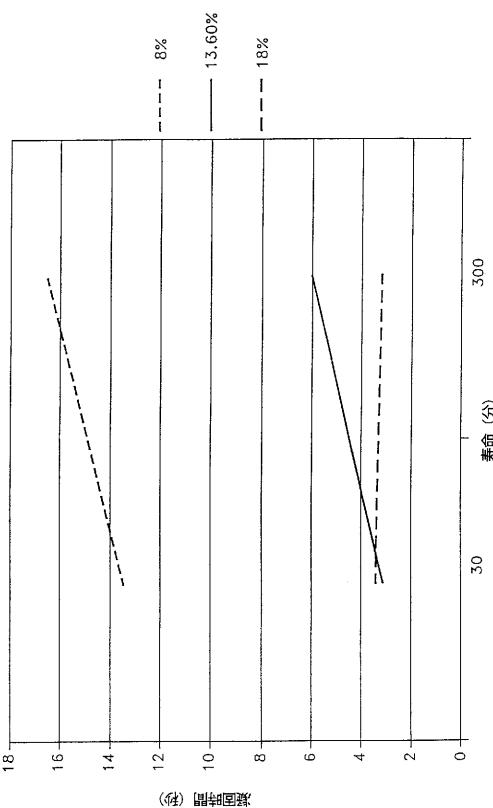
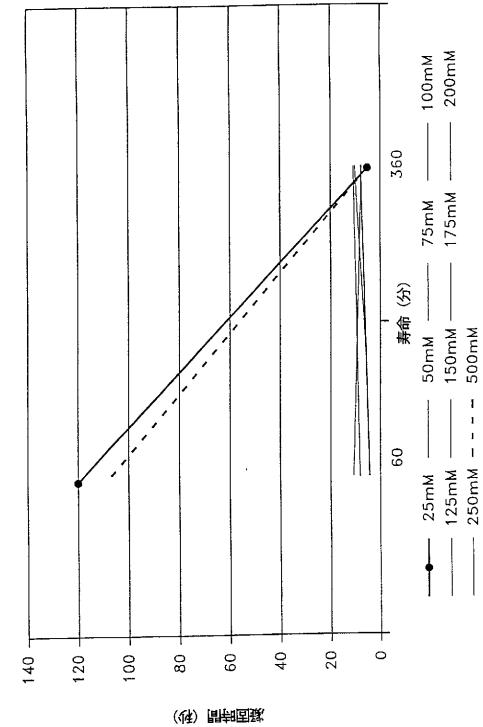


Figure 10

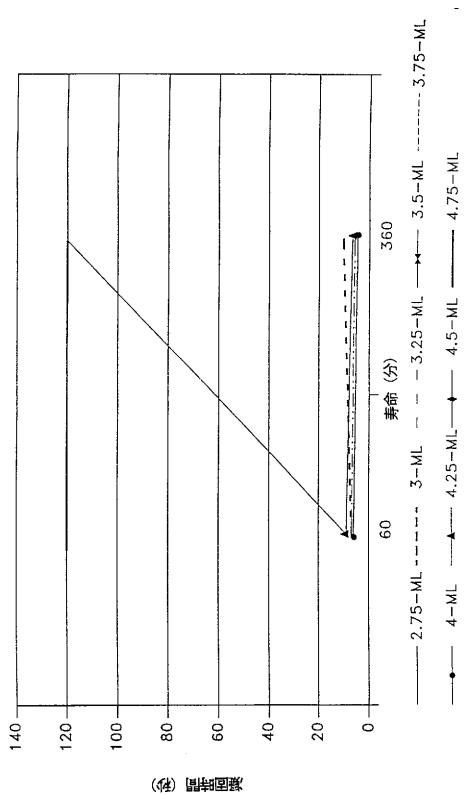
【図 11】



【図 12】

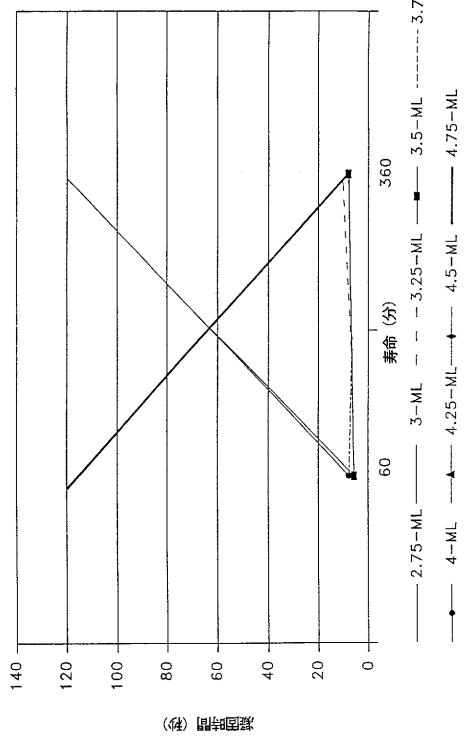


【図 13】



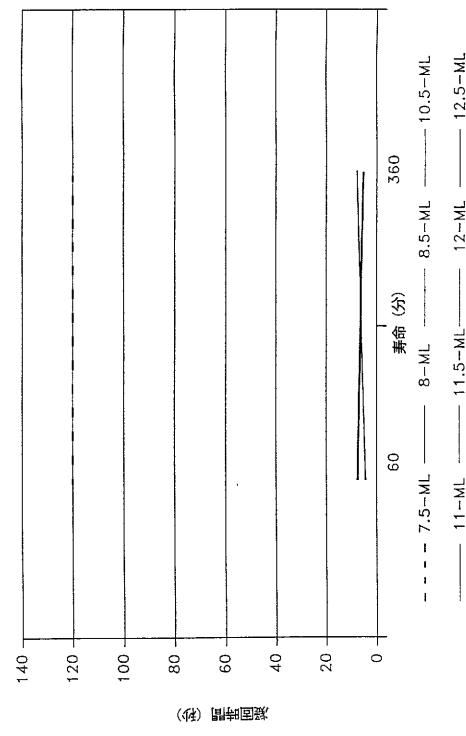
【図 1 4】

急速凍結トロンビンの試験による感度 (室温保存)



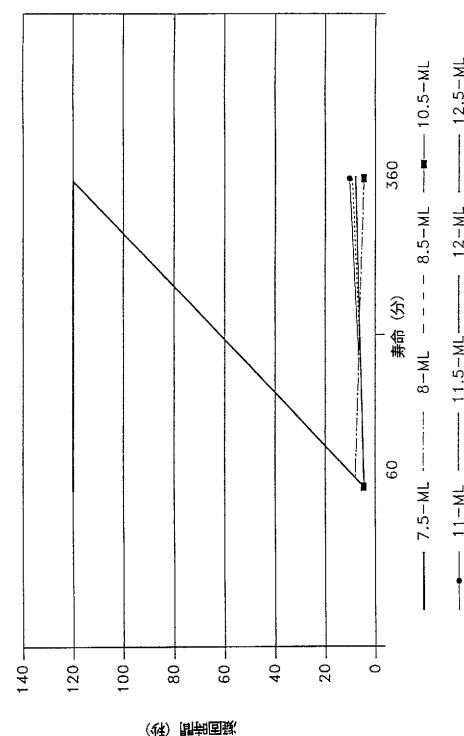
【図 1 5】

急速凍結トロンビンの血漿量による感度 (氷浴保存)



【図 1 6】

急速凍結トロンビンの血漿量による感度 (室温保存)



---

フロントページの続き

(72)発明者 プローシュ , ジム

アメリカ合衆国 , カリフォルニア州 95828 , サクラメント , ピラ ジャレス サークル 6  
875

(72)発明者 ゴッドセイ , ジェームス , エイチ .

アメリカ合衆国 , カリフォルニア州 95630 , フォルソン , サマー シェイド コート 10  
1

(72)発明者 ロック , ゲイル

カナダ , オンタリオ州 ケ-1エル 5エ-2 , オタワ , サンドリッジ ロード 270

(72)発明者 マドセン , トリスタ , ケー .

アメリカ合衆国 , カリフォルニア州 95624 , エルク グローブ , ロス エンカントス サー  
クル8782

(72)発明者 フロスト , ソナ , ピー .

アメリカ合衆国 , カリフォルニア州 95828 , サクラメント , グレイロッジ コート 795  
4

審査官 伊達 利奈

(56)参考文献 特表平11-503125 (JP, A)

米国特許第05795780 (US, A)

特開平03-128398 (JP, A)

特開平05-186369 (JP, A)

特開平10-052267 (JP, A)

特開平04-045785 (JP, A)

国際公開第98/057678 (WO, A1)

(58)調査した分野(Int.Cl. , DB名)

C12N 9/00-9/99

PubMed

JSTPlus(JDreamII)