

【公報種別】特許法第 17 条の 2 の規定による補正の掲載  
【部門区分】第 1 部門第 2 区分  
【発行日】平成 17 年 12 月 2 日 (2005.12.2)

【公表番号】特表 2001-509064 (P2001-509064A)  
【公表日】平成 13 年 7 月 10 日 (2001.7.10)  
【出願番号】特願 平 10-539578  
【国際特許分類第 7 版】  
A 6 1 F 2/10  
【F I】  
A 6 1 F 2/10

【手続補正書】  
【提出日】平成 17 年 5 月 16 日 (2005.5.16)  
【手続補正 1】  
【補正対象書類名】明細書  
【補正対象項目名】補正の内容のとおり  
【補正方法】変更  
【補正の内容】

## 手続補正書

平成17年5月16日

特許庁長官殿

## 1. 事件の表示

平成10年 特許願 第539578号

## 2. 補正をする者

住所 アメリカ合衆国、ウィスコンシン州 53711、マディソン、  
サイエンス ドラライブ 565

名称 ジェリジェーン メディカル コーポレーション

## 3. 代理人

識別番号 100086461

住所 東京都港区白金1丁目29番9-401号

氏名 弁理士 齋藤 和則

電話番号 03-3280-4421



## 4. 補正により増加する請求項の数

無し

## 5. 補正対象書類名

明細書および請求の範囲

## 6. 補正対象項目名

明細書および請求の範囲の全文

## 7. 補正の内容

(1) 明細書および請求の範囲の全文を別紙のように補正する。



## 明細書

### 真皮、皮下、および声帯組織欠損の増大および修復

#### 発明の分野

本発明の分野は、真皮組織、皮下組織、または声帯組織の欠損の長期増大および／または修復である。

#### 発明の背景

##### I. 試験管内細胞培養

脊椎動物細胞の試験管内培養の大部分は、栄養培地に絶え間なく浸した人工培養基質上で単層として成長する。単層が成長できる培養基質の性質は、固体（例えばプラスチック）または半固体（例えばコラーゲンまたは寒天）のいずれかとすることができる。現在、使い捨てのプラスチックは、細胞培養のための好適な培養基質である。

細胞の2次元の成長は試験管内培養細胞の合成および検査にしばしば使用されるが、それは、例えば細胞と細胞および細胞と基質の相互作用をはじめとする無傷生体内組織の性質を欠く。したがって、これらの機能的および形態的相互作用を特性化するために、様々な研究者が、コラーゲンゲル (Yang ら, Cancer Res. 41:1027 (1981); Douglas ら, 試験管内 16:306 (1980); Yang ら, Proc. Nat'l Acad. Sci. 2088 (1980))、セルローススポンジ (Leighton ら, J. Nat'l Cancer Inst. 12:545 (1951))、コラーゲン被覆セルローススポンジ (Leighton ら, Cancer Res. 28:286 (1968))、および GEL FOAM(R) (Sorour ら, J. Neurosurg. 43:742 (1975)) のような形態の3次元培養基質の使用を研究してきた。一般的に、これらの上記3次元培養基質に培養すべき細胞が植え付けられ、これはその後培養基質を貫通し、生体内で見られるのと同様の「組織様」組織構造を形成する。「組織様」組織構造は、3次元培養基質を利用して分散した単層の細胞から「組織様」組織構造を再生しようとする幾つかの試みが報告されている。例えば、3次元コラーゲン培養基質は、乳房上皮 (Yang, Cancer Res. 41:1021 (1981))、血管上皮 (Folkman ら, Nature 288:511 (1980))、および肝細胞 (Sirica ら, Cancer Res. 76:3259 (1980)) をはじめとする様々な細胞の培養に利用さ

れてきた。しかし、かかるシステムにおける細胞の長期培養および増殖はまだ達成されていない。本発明以前に、3次元培養基質が真皮、筋膜、または基底膜から誘導される細胞または組織の自己由来試験管内培養に利用されたことはなかった。

#### I I. 真皮および皮下組織の増大および／または修復

美容および再建形成外科の実務では、皮下または真皮組織の欠損を増大および／または修復し、したがって審美的結果を達成するために、様々な注射可能物質を使用することがしばしば必要になる。非生物学的注射可能物質（例えばパラフィン）は、筋膜の輪郭欠損を修正するために、早くも19世紀に初めて利用された。しかし、多くの合併症や長期の審美的結果の一般的に不満足な性質のために、この方法は急速に放棄された。より近年に、微細な欠損の修復のために注射可能なシリコンを使用することが1960年代に流行したが、多くの内在的な合併症がこの物質の使用をも制限した。注射可能な液体シリコンの利用に伴う合併症は、局所および系統的炎症性反応、シリコン飛沫の周囲における瘢痕組織の形成、爆発性でしばしば遠隔性の予測不能な身体中の遊動、および局所的組織破壊を含む。これらの潜在的な合併症のため、シリコンは現在一般的な臨床用には認可されていない。シリコン注入の当初の提案者たちは、特別に製造された「医療級」シリコン（例：DOW CORNING社のMDX 4.4011(R)）を利用して、限定数の被験者で実験プログラムを継続しているが、その使用が外科医社会で一般的に採用される可能性はきわめて薄いようである。例えば、Spira と Rosen, Clin. Plastic Surgery 20:181 (1992); Mattonら, Aesthetic Plastics Surgery 9:133 (1985)を参照されたい。

また、潤滑性物質に極めて小さい粒子状の種を混合し、かかる微粒子媒体を軟組織および硬組織両方の増大および修復のために皮下に注入することも提案されてきた。しかし、これまでのところ、成功は限定されている。例えば、ヒドロキシアパタイトまたはコーダルグラニュール(骨伝導性)などの生物反応物質が、硬組織の欠陥の修復に利用されてきた。この物質の注入では、その後望ましくない微粒子媒体の遊動および深刻な肉芽腫反応がしばしば発生する。これらの望ましくない影響は、グリセリンに小径（～90%が直径 $\leq 30\mu\text{m}$ の微粒子）のポ

リテトラフルオロエチレン (TEFLON(R)) 球を混合して使用した場合について、よく報告されている。例えば、Malizia ら、JAMA 251;3277 (1984) を参照されたい。さらに、声帯適合流体潤滑剤に様々な物質の超小径の球状微粒子 ( $\sim 1 - 20 \mu\text{m}$ ) または矩形の微細繊維 (直径  $\sim 1 - 30 \mu\text{m}$ ) を注射可能な移植組成物として使用することが、米国特許第 4, 803, 075 号に開示されている。しかし、これらの上記物質は欠損の即時増大および／または修復を形成するが、これらはまた、当初の注入部位から遊動しかつ再吸収される傾向がある。

非生物学的な注射可能物質の使用で当初得られた貧しい結果は、様々な非免疫原性の蛋白質性物質 (例えばウシコラーゲンおよび線維素基質) の使用を促した。しかし、ヒトに注入する前に、ウシコラーゲンのカルボキシル末端またはアミノ末端ペプチドは、その高い免疫原性のために、最初に酵素で分解しなければならない。ウシコラーゲンの酵素分解によりアテロコラーゲンなる物質が生成され、これは、この物質に対して免疫反応する患者を排除するために予め選別された患者に、限定された量を使用することができる。アテロコラーゲンの調製および臨床利用に含まれる方法論は、米国特許第 3, 949, 073 号、第 4, 424, 208 号、および第 4, 488, 911 号に開示されている。アテロコラーゲンは、35 mg/ml および 65 mg/ml の濃度のアテロコラーゲン溶液が ZYDERM (R) のブランドで市販されている。アテロコラーゲンは幅広く利用されているが、ZYDERM 溶液の使用は、約 90% の患者に抗ウシ抗体の形成を、また 1 ~ 4% の患者に顕性免疫合併症を伴った。DeLustro ら、Plastic and Reconstructive Surgery 79:581 (1987) を参照されたい。

注射可能なアテロコラーゲンは、数週間ないし数か月の期間内に、宿主物質と置換されることなく、注入部位から吸収されることも示されている。アテロコラーゲンの繰返し注入を要求する臨床プロトコールは、実際問題として、主にウシコラーゲンに対する免疫反応の発生によって制限される。これらの制限を緩和するために、ウシコラーゲンは、0.25% のグルタルアルデヒドと架橋結合し、その後微細メッシュによる濾過および機械的剪断を行うことによって、さらに処理される。この物質の調製および臨床利用に含まれる方法論は、米国特許第 4, 582, 640 号および第 4, 642, 117 号に開示されている。変性アテロ

コラーゲンは、ZYPLAST(R)ブランドの架橋ウシアテロコラーゲンとして市販された。架橋結合の特徴的な利点は、宿主の分解に対する抵抗を高めることであったが、これは溶液の粘度の増加によって相殺された。さらに、ウシアテロコラーゲンの架橋は、注入されたコラーゲン部位に浸潤する宿主細胞の数を減少させることが明らかになった。粘度の増加、特に「でこぼこ」を引き起こす粘度の不規則な増加は、物質をいっそう利用しにくくするだけでなく、特定の状況での使用に適さなくする。例えば米国特許第5,366,498号を参照されたい。さらに、何人かの研究者は、ZYPLAST架橋ウシアテロコラーゲンの宿主分解に対する抵抗が、非架橋ZYDERMアテロコラーゲン溶液のそれに比較して、全くまたはほとんど増加しないこと、および注入した物質の総寿命がせいぜい4-6か月にすぎないことを報告した。例えばOzgentasら, Ann. Plastic Surgery 33:17 (1994)およびMattiとNicolle, Aesthetic Plastic Surgery 14:227 (1990)を参照されたい。

さらに、グルタルアルデヒドと架橋結合したウシアテロコラーゲンはこの物質を高分子量重合体として維持し、これは連続的に加水分解され、従ってグルタルアルデヒド単量体を放出する。単量体の形態のグルタルアルデヒドは、架橋アテロコラーゲンの最初の注入から最高6週間後まで身体の組織内で検出可能である。試験管内繊維芽細胞培養におけるグルタルアルデヒドの細胞障害効果は、この物質が、宿主細胞に最終的に浸潤すると共にウシアテロコラーゲン基質を急激に分解し、したがって結果的に身体組織中および体液中にグルタルアルデヒド単量体を放出する真皮等価物のための理想的な架橋剤ではないことを示唆している。同様に、中性pHのコラーゲンに弱く結合するコンドロイチン-6-硫酸(GAG)も、組織片移植用にウシ蛋白質を化学的に変性するために利用されてきた。HansboroughとBoyce, JAMA 136:2125 (1989)を参照されたい。しかし、グルタルアルデヒドと同様に、GAGは組織内に放出され、ヒト被験者に予見できない長期的な影響を引き起こすことがある。GAGは、創傷における瘢痕組織の形成を増加することが報告されているが、これは移植組織では回避すべきである。さらに、線維素凝塊は移植片の周囲の組織への癒着を引き起こすので、コラーゲンの血液凝固能力も出血性創傷での適用には有害である。

変性および非変性ウシアテロコラーゲンの両方の免疫原性によって負わされる制限の結果、胎盤（例えば米国特許第5, 002, 071号参照）、外科用検体（例えば米国特許第4, 969, 912号および第5, 332, 802号参照）、および死体（例えば米国特許第4, 882, 166号）からヒトコラーゲンが分離されることになった。さらに、ヒトコラーゲンはウシコラーゲンの場合と類似した分解過程を発生しやすいので、ヒト誘導コラーゲンもまた、架橋結合および同様の化学的変化による処理が必要である。患者自身の組織の標本から誘導した注入用のヒトコラーゲンが現在利用可能であり、AUTOLOGEN(R)として市販されている。しかし、ヒトコラーゲンの注入により結果的に得られる移植片の分解レベルがウシコラーゲンの調製で明らかになったレベルより低くなることを実証する、定量的な証拠は無いということに注意する必要がある。さらに、自己由来コラーゲンの調製および注入の利用は、コラーゲンを生成する始原培養が外科手術中に切除された組織から誘導されるという事実のため、以前に外科手術を受けた個人に限定される。したがって、ヒトコラーゲンはウシコラーゲンが示す免疫原性の潜在的可能性を回避するが、長期的な治療上の利益は得られず、以前に外科手術を受けたことのある患者に限定されることが明らかである。

下位真皮のアテロコラーゲン増大の代替物として現在使用されているその他の注射可能な物質は、FIBREL(R)として市販されている粉ゼラチン、eアミノカプロン酸、および患者の血漿の混合物から成る。Multicenter Clinical Trial, J. Am. Acad. Dermatology 16:1155 (1987)を参照されたい。FIBREL製品的作用は、物質の皮下注射による軟組織の増大に対する硬化組織形成炎症性反応の初期誘発によって異なるようである。例えば、Gold, J. Dermatologic Surg. Oncology, 20:586 (1994)を参照されたい。FIBREL製品の臨床利用はしばしば、その注入に伴う患者の不快感の訴えだけでなく、移植片の均一性が全体的に欠如し（例えば「でこぼこした表面」）かつ寿命が短いという結果を生じることが報告されている。例えば Millikan ら, J. Dermatologic Surg. Oncology, 17:223 (1991)を参照されたい。したがって、結論として、現在利用されている蛋白質をベースにした注射可能な物質はどれも、下位真皮および軟組織の増大および／または修復に対して全体的に満足できるものではないことが明ら

かである。

上述の物質の利用に伴う様々な合併症は、生育可能な生組織を移植（組織移植）して下位真皮および軟組織の増大および／または修復を促進する実験を促した。例えば、様々な欠損の外科的矯正が、脂肪組織を最初に切除し、かつ切除された脂肪組織をその後注射で（例えば Davis ら, Arch. of Otolaryngology-Head and Neck Surgery 121:95 (1995); McKinnery と Pandya, Aesthetic Plastic Surgery 18:383 (1994); および Lewis, Aesthetic Plastic Surgery, 17:109 (1993)）またはより大規模な移植手術で（例えば Ersck, Plastic & Reconstructive Surgery 87:219 (1991)）再移植することによって行われてきた。上述の技術はどちらもそれを実行するには、その後の増大または修復過程で必要になるのと同様またはそれ以上の量の脂肪組織を、患者から切除しなければならない。したがって、大規模の修復過程（例えば胸の再建）の場合、患者から外科的に切除できる脂肪組織の量が限定される。さらに、上述の方法論で頻繁に遭遇するその他の問題点として、注入物の不均一性、審美的効果の予測不能な寿命、ならびに 4 - 6 週間の注入後の炎症および腫脹が含まれる。対照的に、本発明は、好適な実施例で、一般的にコラーゲンまたは分離された細胞外基質から、ただしこれらのみ限定されず、誘導された固体支持体で培養した自己由来脂肪細胞の外科的増大を利用する。培養は簡単な皮膚生検標本から樹立することができ、その後試験管内で培養できる脂肪組織の量は、患者から最初に切除される脂肪組織の量によって限定されない。

ヒトの皮膚の修復および／または再生の方法論として、生きた皮膚等価物が研究されてきた。中間層自己皮膚移植片、上皮自己移植片（培養された自己由来ケラチノサイト）、および上皮同種移植片（培養された同種ケラチノサイト）が使用され、成功の程度は様々であった。しかし、残念ながら、これらの治療様式は全て、多数の不利益を示した。例えば、中間層自己皮膚移植片は一般的に、組織の拡大が限定され、繰返し外科手術を必要とし、かつ好ましくない審美的結果を生じる。上皮自己由来移植片は、長期の培養が必要であり、成功（「生着」）率が約 30 - 48 % と低く、しばしば特発的発疱を形成し、元の大きさの 60 - 70 % の再建を示し、移植から最初の 15 日間に傷つきやすく、かつ上皮と真皮の



両方の組織が関係する場合には使用できない。同様に、上皮同種移植片（培養された同種ケラチノサイト）は、上皮自己由来移植片の使用に内在する制限要素の多くを提示する。その他に、X線を照射した死体の真皮の利用を含む方法論が研究されている。しかし、これもまた、例えば移植片拒絶および望ましくない審美的結果のために、限定的な成功しか達成されていない。可溶性コラーゲン中の齧歯類の線維芽細胞円柱の真皮層および培養した齧歯類のケラチノサイトの上皮層から成る生きた皮膚等価物は、Bell らによって Sprague Dawley ラットに同種移植片として移植され成功した (J. Investigative Dermatology 81:2 (1983))。移植された組織の組織学的研究により、上皮層が完全に分化してデスモノソーム (desmosome)、トノフィラメント、ケラトヒアリン、および基底ラメラを形成したことが明らかになった。しかし、ヒトの線維芽細胞およびケラチノサイトを使用した生きた皮膚等価物を再生しようとするその後の試みでは、限定的な成功しか得られなかった。一般的に、ケラチノサイトは完全に分化して基底ラメラを形成できず、真皮上皮接合部は直線になった。

本発明は、様々な皮膚欠損の修復および／または増大のための以下の方法論、すなわち（１）培養した自己由来の真皮または筋膜の線維芽細胞を皮膚の様々な層に注入するか、あるいは修復または増大させる領域に形成された「ポケット」内に直接注入すること、または（２）生体内で見られるのと同様の３次元の「組織様」構造を形成するような方法で培養された自己由来の真皮および筋膜の線維芽細胞から誘導した「線維」を外科手術で移植すること、を含む。

さらに、本発明はまた、患者自身の細胞および血清を試験管内培養のために利用することによって細胞の「真」の自己由来培養および形成が行われるという点で、２次元レベルにおいても異なる。

### Ⅲ 声帯筋拡張及び／又は修復

ヒトにおける発声は、咽頭内に位置する一対の声帯筋を通じて空気が通過することによってなされる。括約筋から成る咽頭内の溝のついた筋肉繊維が声帯の緊張度を変化させる働きをなし、もって全体の硬さと相互の位置関係を調節して会話をもたらす。しかしながら、一方（又は両方）の声帯筋が完全に又は部分的に動かなくなると、動かし得る筋に比べて、損傷のある筋で所要の張力を調節維持

できないために、声質が低下する。声帯の麻痺は、癌、外科手術又は機械的な外傷、ないしは類似の原因により生じることがあり、括約筋を所望のように緊迫できないために、声帯が作動不能となる。

発声が可能となるよう試みられた治療手法の一つに、生体適合性素材の埋設又は注入がある。麻痺ないし損傷した声帯を正置ないし支持して動かし得る筋に比べて一定の位置に維持すれば、動かし得る筋の単独振動で聞き分け可能な声紋を生ぜしめ得ることは以前から知られていた。このため、甲状軟骨を作って麻痺した声帯の支持及び／又は正置手段を与えるような種類の外科手術が開発されてきた。

例えば、テフロン®を麻痺した声帯に注入すれば、固有の“力（バルク）”が増強される。von Leden ら、Phonosurgery, 3, 175 (1985) 等を参照されたい。しかしながら、声門間隙が大きいと注入したテフロン®がこれを埋めることができず、また炎症反応を誘発して注入した筋に繊維状浸潤物を生ずる傾向もあるため、現在ではこの方法は受け入れられないとされている。Marves ら、Phonosurgery: Indications and Pitfalls, 98: 577 (1989) 等を参照されたい。さらに、注入したテフロン®は後に希望ないし必要なときにも、極めて除去が難しい。

これまで用いられてきた麻痺した声帯をサポートするもう一つの方法には、シリコンゴム（シラスティック、S I L A S T I C®）の個々に合うようにしたブロックの利用が含まれる。インプラントの正しい適合を確保するには、患者が発声する能力を最大にするため外科医の手は処置の間シラスティック（S I L A S T I C）のブロックをカーブさせているのである。患者は、インプラントの位置取りをテストするため発声できるように局所麻酔下におかれる。一般的に、埋め込まれたブロックは、甲状軟骨内に全体的に埋め込まれた楔型あるいは甲状軟骨中の開口部中を前後に動くことができる突縁プラグ型に形成されて患者の声を微調整する。

シラスティック（S I L A S T I C）のインプラントはテフロン注入物よりも優れていることはすでに証明されているが、ブロックの彫刻及び挿入の困難さ、処置に相当の時間を要する点、及びブロックを甲状軟骨内の適切な場所に固定する有効な方法の欠如を含む処置に関して不満足な領域がある。また、時間が掛る

という処置の性質及び手術中の繰り返し行われる発声テストに起因する声帯浮腫が最善の声質を得ることの難しさをも証明しているであろう。

声帯麻痺及び損傷の治療においてこれまでに用いられたその他の方法には、シリコン及びコラーゲンの注入物同様、ゲルフォーム（商品名、GELFOAM®）ハイドロキシアパタイト及び多孔質セラミック製インプラントが含まれる。例えば、カウフマン（Kaufman）の喉頭形成音声外科手術（Laryngoplastic Phonosurgery, 1988）を参照のこと。しかしながら、これらの材料もまた後に起こる免疫反応の可能性と同様に、固いインプラントのサイズ処理及び成形の困難さゆえにあまり理想的ではないことが証明されている。従って、声帯麻痺及び／または損傷の有効な治療を可能にする方法の開発の必要性がまだ残っている。

#### 発明の要約

本発明は、（１）結合組織、真皮あるいは筋膜由来の自己培養繊維芽細胞、（２）基底膜組織、（３）基底膜由来の繊維芽細胞あるいは（４）脂肪細胞の注入あるいは直接的な外科的設置／移植による真皮、皮下あるいは声帯組織の長期にわたる強化及び／または修復の方法を開示している。皮膚欠損の補強及び／または修復に用いられた繊維芽細胞の培養物は結合組織、真皮及び／または筋膜の繊維芽細胞のいずれかに由来している。自己繊維芽細胞あるいは脂肪細胞の注入あるいは直接的な外科的移植によって治すことができる典型的な皮膚欠損には、皺襞、ストレッチマーク、陥没瘢痕、外傷性あるいは非外傷性の原因による皮膚陥凹、口唇の形成不全及び／または尋常性アクネによる瘢痕が含まれる。基底膜あるいは基底膜由来の自己培養繊維芽細胞の注入あるいは直接的な外科的移植によって治すことができる典型的な声帯欠損には、瘢痕のある、麻痺した、外科的あるいは外傷的に損傷を受けた、あるいは先天的に未発達な声帯が含まれる。

真皮、筋膜、結合組織あるいは基底膜に由来する自己培養繊維芽細胞の利用は、組織の組織適合性の欠如による免疫反応の可能性を低減させる。この事は、非常に優れた術後の結果をもたらす。本発明の望ましい実施態様においては、脂肪細胞と同様に、結合組織、真皮あるいは筋膜由来の繊維芽細胞は皮膚の全層生検に

由来している。同様に、基底膜組織あるいは基底膜から得た繊維芽細胞は、声帯の生検により得ている。引き続いて外科的処置を受けるであろう個人から得た前述の組織はかくも免疫反応の可能性を軽減させるということに注目すべきである。これらの組織は、標準的な組織培養法を用いて試験管内で更に増えていくのである。

加えて、本発明は更に、無血清培地あるいは患者自身の血清中の培養繊維芽細胞、基底膜組織あるいは脂肪細胞の晩期継代培養によって潜在的に免疫血清由来の蛋白質を実質的に含まない培養細胞を供給する方法を提供する。また、免疫原性蛋白質は、リン酸緩衝生理食塩水（PBS）あるいは同様の生理的に適合性のある緩衝液中で繰り返し洗うことで顕著に軽減あるいは除去できるであろう。

## 発明の詳細な説明

### I. 皮膚の組織学

皮膚は二つの異なる層から成っている；外肺葉由来の特殊な上皮である表皮とこの下の血管性密生結合組織であり中肺葉の派生体である真皮である。これらの二つの層は互いにしっかりと密着し、体の場所によって全厚がおよそ0.5ないし4mmの範囲で異なる領域を形成している。真皮の下は、性質が輪紋状組織から脂肪組織へと変化する疎性結合組織の層である。これは、肉眼的解剖学の浅筋膜であり、時には皮下組織と言われているが、皮膚の部分とはみなされていない。真皮は、一つの層から他の層へ通じる結合組織繊維によって皮下組織につながっている。

#### A.表皮

層を成す偏平上皮である表皮は、二つの別個の、異なる細胞から成っている。外肺葉由来である上皮の大部分は、皮膚の死んだ表層の形成に帰着する角質化のプロセスを辿る。第二の構成部分は、メラニンによる色素合成に係わっているメラノサイトを含んでいる。後者の細胞は角質化のプロセスは辿らない。表層の角質化した細胞は、皮膚表面から継続的に失われ、表皮の基底層の細胞の分裂活動の結果として生じる細胞に取って代わられなければならない。この増殖によって

生じる細胞はより高い位置へと移動させられ、上層へ移動するにしたがってケラチンを作りだし、これが結果的に大部分の細胞質と取って代わるのである。角質化のプロセスが続くにしたがって、細胞は死に、最終的には剥落する。従って、表皮の層への構造的な組織化は、細胞の増殖及び分化の動的なプロセスの種々の段階を反映していることを認識すべきである。

## B. 真皮

真皮はその下にある皮下層（皮下組織）へと徐々に変化しているため、その範囲を定量的に区別することはしばしば困難である。真皮の平均的な厚さは0.5ないし3mmの範囲で、更に二層に細分される；表面近くに乳頭層そしてその下に網状層である。網状層は、外延的な網目状に配された薄い膠原生で、網状の弾性繊維から成っている。表皮の直下には、真皮の網状繊維が、胚芽層の細胞の基底突起が固着されている密な網の目を形成している。この領域は基底板と言われている。

網状層は真皮の主要な繊維層である。一般的に、乳頭層は網状層に比してより多くの細胞とより小さく細かい結合組織繊維を含んでいる。網状層は粗く、濃密で絡み合う膠原繊維から成っており、その中には少数の網状繊維と多数の弾性繊維とが混ざり合っている。これらの繊維の主要な配列は皮膚表面に対して平行である。真皮の主な細胞組成物は繊維芽細胞とマクロファージである。また、脂肪細胞は単独であるいは、より頻繁には、クラスター状で存在しているであろう。繊維の方向によって、皮膚張力線、即ちランガー線が形成されている。該線に平行に作られた切り口は該線に対して直角あるいは斜めに作られたものに比して裂けにくく、瘢痕細胞形成がより少ない状態で治る傾向があるので、これらの線の全体的な方向は外科的に重要である。色素沈着性の、分岐した結合組織細胞、即ち、色素細胞もまた存在していることがある。これらの細胞は色素を作り出さないが、代わりに、見たところメラノサイトからそれを得ている。

平滑筋繊維もまた真皮中に見出すことができる。これらの繊維は小さな束の状態で毛胞（立毛筋）に接続する形で配列されており、乳首、ペニス、陰のう及び会陰の各部の皮膚中の真皮じゅうに相当数散在している。筋繊維の収縮はこれら

の部位の皮膚に髪状の外観を与える。顔や首では、いくつかの骨格筋の繊維が真皮の繊細な弾性繊維の網の目の中に終端している。

### C. 脂肪組織/脂肪細胞

脂肪細胞（アジポサイト）は疎性結合組織に点在する。脂肪細胞が大凝集体を形成し、かつ、それが主細胞型である場合、組織は脂肪組織と呼ばれる。脂肪細胞は完全に分化した細胞であり、従って有糸分裂をおこなうことができない。結合組織内でいつでも発育（develop）できる新規な脂肪細胞は、従って、もっとプリミティブな細胞が分化する結果として生じる。脂質を蓄える前の脂肪細胞は繊維芽細胞に似ているが、それは未分化の間充織基質組織から直接生じているようである。

脂肪細胞はそれぞれ、微細な網状繊維ウェブにより囲まれている。その間のスペースには、繊維芽細胞やリンパ系細胞、好酸球および若干のマスト細胞がある。脂肪細胞の間隔が狭くなると、繊維状隔壁（fibrous septa）によって隔てられた小葉（lobules）を形成する。さらに、小葉の内部およびその間に多くの毛細管ネットワークがある。この豊かな血液供給は脂肪組織の代謝活性が高率であることの指標である。

脂肪組織は静的でないことを理解しておかなければならない。脂質の沈着・除去の間には動的バランスがある。脂肪細胞内にある脂質は三つのソースから誘導できる。ホルモンインスリンの影響を受ける脂肪細胞は炭水化物から脂肪を合成することができる。脂肪細胞はまた、食物脂肪の初期分解によって生じる種々の脂肪酸から脂肪を作ることにもできる。脂肪酸は、肝臓のグルコースからも合成され、血清リポプロテインとして脂肪細胞に輸送される。様々の異なるソースに由来する脂肪は化学的に異なっている。食物脂肪は各個人の食事に応じて、飽和されていたり不飽和であったりする。炭水化物から合成される脂肪は一般に飽和されている。脂肪は、蓄積された脂肪を酵素的に加水分解し脂肪酸を血液中に放出することにより除去される。しかしながら、外部から継続的にグルコースの供給がある場合、脂肪の加水分解は無視できる程度である。正常なホメオスタティック・バランスは、ホルモン類、主にインスリンと、脂肪組織からの脂肪の移動性

を司る自律神経系により、影響を受ける。

脂肪組織は疎性組織の多い場所であればほとんどどこでも発生可能であるが、ヒトの場合、脂肪組織が蓄積する大部分の共通場所は、腸間膜と腹膜網の中、骨髓の中、および腎臓の周囲にある皮下組織（脂肪層と呼ばれる）である。中性脂肪の貯蔵および代謝の基本的な機能に加え、皮下組織では、脂肪組織は過剰な熱損失を防止し、あるいは、皮膚を通してこれを得る衝撃吸収・断熱組織としても作用する。

## II. 喉頭および声帯の組織学

喉頭は咽頭と気管とを結合する呼吸系の部分である。呼吸系の一部としての機能の他に、喉頭は発声（話すこと）に重要な役割を果たしている。喉頭は、透明な弾性軟骨の「骨格」、膠質性結合組織、横紋筋および粘液腺からなる。喉頭の主な軟骨（甲状、輪状および披裂軟骨）は透明であり、一方これより小さい軟骨（小角軟骨、楔状軟骨および披裂軟骨の先端）は、咽喉蓋にある軟骨のように、弾性である。上記軟骨は、舌骨と共に、三つの大きく平たい膜、すなわち、甲状軟骨舌骨膜、方骨膜および輪状声帯膜によりつながっている。これらは密な繊維結合組織からなっており、多数の弾性繊維が特に輪状声帯膜に存在する。真および偽声帯（声帯・前庭靱帯）はそれぞれ、輪状声帯（輪状甲状）膜の遊離上板部（free upper boarders）および方形骨（披裂喉頭蓋）膜の遊離下板部（free lower boarders）である。真・偽声帯間のそれぞれの側面に伸びるのは、喉頭の洞（sinus）と嚢（sacculle）、すなわち、小さいスリット状の憩室である。輪状軟骨と披裂軟骨との後ろに、咽頭の外壁が咽頭収縮筋の横紋筋によって形成される。

咽頭粘膜の上皮は場所により変化する。例えば、声帯壁を覆って、重層へん平上皮の基底膜が極めて密に、かつ、しっかりと声帯下にある結合組織と結合している。喉頭に真の粘膜下組織はないが、粘膜の基底膜は厚く、かつ、多数の弾性繊維を含んでいる。

### III. 方法論

#### A. 繊維芽細胞または基底膜の試験管内細胞培養

本発明は、試験管内培養で増やすことができる、皮膚に存在する非分化間充織細胞のあらゆる型を利用して実施することができるが、真皮、結合組織、筋膜、基底膜組織の脂肪細胞由来の繊維芽細胞、および/またはその細胞から誘導される細胞外組織（基質）は、組織細胞における分離および試験管内増殖の類縁性により、好ましい態様として用いられる。一般に、非分化間充織細胞の増殖に好適な組織培養技術を用いることができ、さらに以下述べるように前記の細胞/組織を増やして本発明を実施することができる。例えば、Culture of Animal Cells: A Manual of Basic Techniques, Freshney, R.I., ed., (Alan R. Liss & Co., New York 1987); Animal Cell Culture; A Practical Approach, Freshney, R. I., ed., (IRL Press, Oxford, England (1986)参照。これらの文献はここに引用して本発明の開示をなすものとする。

自己由来移植片の利用は、アログラフト（同種異型移植片）をベースとした移植を用いることに付随する移植拒絶に有望であるため、好ましい治療方法である。自己由来移植片、すなわち、患者に直接由来する移植片は、まず矯正外科処置を受ける患者からバイオプシーにより組織標本を得、次いで引き続き、真皮、結合組織、筋膜またはそこに含まれる基底膜領域由来の繊維芽細胞を培養することによって組織適合性を確実にすることができる。

以下のセクションではまず結合組織、真皮または筋膜由来繊維芽細胞の自己培養について述べるが、基底膜組織の試験管内培養物も同様に利用できることが確立されている方法である。自己繊維芽細胞培養は、以下の方法で行うのが好ましい。まず、例えば、穿刺生検法によって、皮膚（～3x6 mm）の完全長バイオプシーを得る。標本は培養する前に抗生物質および抗菌剤により繰り返し洗っておく。無菌的顕微鏡切断法により、角化組織を含む表皮および皮下の脂肪細胞含有組織を除去して、得られた培養物が実質的に非繊維芽細胞（例えば、脂肪細胞お



よびケラチノサイト) を含まないようにする。次いで、分離した脂肪細胞含有組織を用いて脂肪細胞培養物を株化することができる。あるいは、全組織を培養し、繊維芽細胞に特異的な増殖培地を用いてこれらの細胞を「選択」してもよい。

本発明の実施においては、繊維芽細胞の自己培養に対して一般に二つの方法—機械的および酵素的的方法—が用いられる。機械的方法においては、まず初めに、筋膜、真皮あるいは結合組織を解剖用メスまたはハサミで切り離して細かくする。細片にした組織をまず5ミリのペトリ皿(Costar) あるいは24 マルチウェル培養プレート(Corning) のいずれか、または適当な組織培養びんに入れた培地1-2ミリリットルに入れる。

インキュベーションは、5% CO<sub>2</sub> 雰囲気下37℃で行うのが好ましく、細胞は繊維芽細胞のコンフルエントな単層が得られるまでインキュベートする。インキュベーションは3週間程度まで必要である。コンフルエンスとなった後、単層をトリプシン処理して培養びんの壁に付着した繊維芽細胞をはがす。浮遊細胞を遠心分離により集め、リン酸緩衝食塩水で洗った後、培地に再浮遊させて、適当な完全増殖培地を含むさらに大きい培養びんへ移す。

酵素的培養法の好ましい態様においては、細切した組織片を、時間を変えてプロテアーゼにより消化する。酵素濃度およびインキュベーション時間は、個々の由来組織により変更することができる。組織からの繊維芽細胞の最初の分離ならびに続く培養細胞の増殖は、これら二つのファクターに高度に依存する。有効なプロテアーゼとしては、以下の例示に限定されるものではないが、トリプシン、キモトリプシン、パパイン、キモパパインおよび類似の蛋白質分解酵素がある。組織は、コラーゲナーゼII型200-1000 U/mlで30分から24時間培養するのが好ましい。コラーゲナーゼII型は、高収率の生存繊維芽細胞を与えるのに非常に有効であることが分かったからである。酵素分解後、細胞は遠心分離により集めて培養フラスコに入れた新鮮培地に再懸濁する。

種々の培養基質をヒト繊維芽細胞の試験管内培養の初期株化のために用いることができる。ダルベコス・モデファイド。イーグル培基(Dulbecco's

Eagle Medium (DMEM, Gibco/BRL ラボラトリース)) であって 5-20% (v/v) の濃度の胎児ウシ血清 (FBS)、コスミック子牛血清 (CCS) 又は患者自身の血清 (濃度が高いほど培養成長がより速い) を有するものが繊維芽細胞の培養のために容易に利用することができる。血清の濃度の実質的な減少 (即ち、0.5% v/v) は培養における細胞生存力の損失をもたらす。更に、完全培養基質は一般に、L グルタミン、重炭酸ナトリウム、塩酸ピリドキシン、1 g/L グルコースおよびゲンタマイシンスルフェートを含む。患者自身の血清の使用は、他の血清中の成分抗原蛋白質の存在による後の免疫原反応の可能性を緩和させる。

初期ヒトバイオプシー試料からの繊維芽細胞系の株化は一般に合計 2 ないし 3.5 週間を必要とする。初期培養が一旦、集合に達したとき、細胞は、当該分野で公知の標準的方法によるトリプシン化の後、新しい培養フラスコ中に移される。好ましくは、拡大のため、培養物は 1:3 又は 1:4 で T-150 培養フラスコ (Corning) に“分割”され、 $5 \times 10^7$  細胞/培養容器を生じさせる。T-150 培養フラスコの容量は一般に 5-8 日の培養で到達し、この時点において培養された細胞は集合ないし集合に近い状態になる。

ヒト繊維芽細胞は限られた数の継代 (passages) を行うことができるという事実のため、細胞は好ましくは培養の後段ではなく、培養の初期の段階で凍結および長期保存のために取除かれる。70% DMEM 成長培養基質、10% (v/v) 血清、および 20% (v/v) 組織培養グレードのジメチルスルホキシド (DMEM, Gibco/BRL) を含む培養基質を繊維芽細胞の凍結のために効果的に利用することができる。凍結細胞は後に二次培養を接種するために使用し、元の患者に使用するため追加の繊維芽細胞を得ることができ、二次バイオプシー試料を得る必要性をなくすることができる。

組織移植患者における後の免疫原反応の可能性を少なくするため、血清中の種々の抗原成分蛋白質の除去を以下のようにして容易に行うことができる。すなわち、遠心分離により繊維芽細胞を採取し、燐酸塩緩衝液 (PBS) 中で細胞の繰返し洗浄し、更に当該分野で公知の必要な成長因子を含む無血清培養基質で 2-24 時間に亘り洗浄した繊維芽細胞を再懸濁又は培養する。培養基質は、特に

限定されないが、繊維芽細胞基底培基（F B M）を含む。その他、繊維芽細胞を患者自身の血清を利用し適当な成長培基中で培養してもよい。

培養物が集合ないし集合に近い状態に到達した後、繊維芽細胞を注射のために処理してもよいし、又は、更に培養し、後の外科的組織移植のため三次元“組織”を形成するようにしてもよい。注射のために利用される繊維芽細胞はコラーゲンゲル基質又は細胞外基質に懸濁された細胞からなる。コラーゲンゲル基質は、好ましくは、0.05%酢酸中にコラーゲン0.5ないし1.5mg/mLを溶かしたコラーゲン溶液2mLと、DMEM培基1mLと、7.5%重炭酸ナトリウム270マイクロリットルと、ゲンタマイシンスルフェートの100マイクログラム/mL溶液48マイクロリットルと、 $5 \times 10^6$ 以下の繊維芽細胞/mLコラーゲンゲルとの混合物からなる。コラーゲンゲル基質中に繊維芽細胞を懸濁させたのち、その懸濁液を室温又は37℃、5%炭酸ガス雰囲気中で約15分間かけて固化させる。このコラーゲンはヒト又はウシから得られるものであってもよいし、又は、患者から得られるものでもよいし、酵素的又は化学的に変性（アテロコラーゲン）させたものでもよい。

三次元“組織”は、上述のように繊維芽細胞を最初にコラーゲンゲル基質中に懸濁させることにより形成される。好ましくは、三次元組織の培養において、切詰められた又は変性されたコラーゲン誘導体よりは、むしろ全長コラーゲンが利用される。得られた懸濁液は専売の“トランスウエル（transwell）”培養システムに移される。この培養システムは一般に、下方の成長培基がマイクロ細孔膜により培養ウエルの上方領域から分離された培養ウエルからなる。このマイクロ細孔膜は一般に直径が0.4ないし8ミクロンの孔を有し、例えばポリエステル、ナイロン、ニトロセルロース、酢酸セルロース、ポリアクリルアミド、架橋デキストロース、アガロース、その他の類似物から選ばれるものから作られている。このトランスウエル培養システムの培養ウエル成分は、後の外科的組織移植を容易にし、かつ、通常200マイクロリットルから5ミリリットルの範囲の培養基質を保持し得るものであれば、任意の形状、サイズ（例えば、四角、円形、楕円形など）のものであってもよい。一般に、 $0.5 \times 10^6$ ないし $10 \times 10^6$ 細胞/mLの範囲、好ましくは $5 \times 10^6$ 細胞/mLの濃度のものが上述のよう

なコラーゲン／繊維芽細胞含有懸濁液中に接種される。好ましい濃度の細胞（すなわち、 $5 \times 10^6$  細胞/mL）を使用した場合、三次元組織基質の形成には、合計約4－5週間を要する。しかし、この時間は接種された細胞の濃度を増大させたり、減少させたりすることにより変動する。従って、利用される細胞の濃度が高いほど、その時間は少なくなる。これは、細胞増殖の割合が高いことおよび外因性コラーゲンの内因性コラーゲンによる置換および培養された繊維芽細胞により合成された細胞外基質を形成する他の成分物質による置換の全体的割合が高いことに起因する。この細胞外基質を形成する他の成分物質の例としては、例えば、コラーゲン、エラスチン、フィブリン、フィブリノゲン、プロテアーゼ、フィブロネクチン、ラミニン、フィブレリン、その他の類似の蛋白質である。組織移植患者における後の免疫原反応の可能性は、初期のコラーゲン／繊維芽細胞含有懸濁液を定着するのに用いられる外因性コラーゲンが後の培養の間に徐々に内因性コラーゲンにより並びに繊維芽細胞により合成された細胞外基質物質により置換されるという事実によって、著しく減少することになる。

#### B. 脂肪細胞の試験管内培養

脂肪細胞はその成長のため、“フィーダー層”又は他の型の固体支持体を必要とする。この固体支持体の1つとして前述のコラーゲンゲル基質の利用を挙げることができる。その他、この固体支持体は培養された細胞外基質により形成させることができる。一般に、脂肪細胞の試験管内培養は、バイオプシー試料から得られる脂肪組織中の脂肪細胞の機械的又は酵素的分裂により行われる。脂肪細胞は上記固体支持体の表面に“種付け”され、近集合が達成されるまで、その成長が行われる。成長した脂肪細胞は固体支持体の表面を緩くこすり取ることにより除去される。分離された脂肪細胞は前記 IIIA で述べた繊維芽細胞について用いられたのと同様の方法により培養される。

#### C. 細胞外基質の分離

細胞外基質（ECM）は細胞又は無細胞の形で分離することができる。ECMを形成する構成物質は例えばコラーゲン、エラスチン、フィブリン、フィブリノ

ゲン、プロテアーゼ、フィブロネクチン、ラミニン、フィブレリン、その他の類似の蛋白質を含む。ECMは一般に、前述のように皮膚、皮下組織又は声帯組織試料から得られる細胞の初期培養により分離することができる。この培養された細胞が25-50%近集合の最小値に達したのち、このECMを機械的、酵素的、化学的又は変性処理により得ることができる。機械的採取はプラスチック培養器のECMをこすり取り、燐酸塩緩衝液(PBS)中に再懸濁させることにより行われる。所望により、構成細胞を、5mMEDTAを含む低張性塩溶液中で培養することにより溶解又は破断される。しかし、好ましくは、上記のこすり取りの後、PBS中での再懸濁が一般的に利用される。酵素的処理は、トリプシンのような蛋白質分解酵素で若干培養する処理を含む。更に、ドデシル硫酸ナトリウム(SDS)などの洗剤の使用あるいは尿素、ジチオテリトール(DTT)のような変性剤による処理の後、PBSに対する透析により周りの関連組織からのECMの開放を促進するようにしてもよい。

分離されたECMは次いで本発明で開示されている種々の増大又は修復手法において“フィラー”として利用される。更に、このECMはある種の細胞成長又は代謝促進特性を有するものであってもよい。

#### D. 胎児ないし未熟細胞又は組織の試験管内培養

他の好ましい例において、患者自身の組織を利用するのでなく、上記細胞、細胞懸濁物又は組織の全てを、日光に僅かしか又は全く当たっていない、あるいはいずれにしても修復される組織よりも少ない程度で日光に露出された胎児ないし未熟細胞又は組織から得ることもできる。胎児細胞はホストグラフト拒絶反応を誘発させるのに必要な免疫原決定子が欠乏しており、従って、後に免疫原反応を生じさせる虞れが殆どない状態で組織移植手法のために利用することができる。無細胞ECMも構成細胞の低張性溶解により胎児ECMから得ることができる。胎児ないし未熟細胞又は低日光露出源から得られる無細胞ECMあるいは初期継代細胞の試験管内培養から得られる無細胞ECMは、老化又は後期継代細胞から得られるECMのものと量および特性の双方において異なるものを有する。胎児ないし未熟細胞源から得られる細胞又は無細胞ECMは本発明で開示されている

種々の増大又は修復手法において“フィラー”として利用することができる。更に、胎児ないし未熟ECMは、ある種の細胞成長又は代謝促進特性を有することがある。

#### E. 自己由来培養皮膚／筋膜繊維芽細胞の注入

皮膚欠損を増大ないし修復させるため、自己由来培養繊維芽細胞が最初に下部真皮中に注射され、ついで上部および中間真皮中に注射され、最後に皮膚の皮下領域に注射され、はれ上がり部又は“膨疹”を生じさせる。繊維芽細胞懸濁液は30ないし18ゲージの針の注射器により注射される。なお、注射針のゲージは繊維芽細胞懸濁液の総粘度、使用される麻酔薬のタイプなどのファクターに応じて決定される。好ましくは、全身および局部麻酔の場合、22ないし18ゲージの針、30ないし27ゲージの針がそれぞれ使用される。下部真皮中に繊維芽細胞懸濁液を注射するため、針は斜角面を下にした状態で皮膚に対し約45度の角度で挿入する。繊維芽細胞懸濁液を中間真皮中に注射する場合、針は皮膚に対し約20ないし30度の角度で挿入する。繊維芽細胞懸濁液を上部真皮中に注射する場合、針は皮膚に対し殆ど水平の状態（即ち、10ないし15度の角度）で挿入する。皮下注射は、針を皮下組織内に最初に刺し込み、針を引き抜く間に繊維芽細胞懸濁液を注射する。更に、針は好ましくは皮膚に対し種々の角度から挿入し、針の通路が後の各注射において多少異なるようにする。この方法により、繊維芽細胞懸濁液が注射された皮膚の総領域を容易に大きくすることができる。

上記注射の後、皮膚は膨脹し、緊張した感触のものとなる。なお、この注射領域が過度につらい感じを生じさせないように注意すべきである。好ましくは、注射の後に窪み又は皺壁が上昇するようにし、繊維芽細胞懸濁液を若干、過剰注射して“過剰修正”するようにする。なぜならば、或る程度の沈降又は収縮が術後に発生するからである。

或るシナリオにおいては、注射をより深い組織層にまで行う。例えば、唇の増大又は修復の場合、好ましい注射の方式として、最初に繊維芽細胞懸濁液を上述のように皮膚および皮下層に対して注入し、さらに朱色縁における唇上部の皮膚に注入する。更に、垂直人中にも注入してもよい。繊維芽細胞懸濁液は後に皮下

注射で述べたのと同様にして筋肉を含む唇のより深い組織中に注射される。

#### F. 自己由来培養皮膚／筋膜繊維芽細胞ストランドの外科的配置

自己由来培養皮膚／筋膜繊維芽細胞ストランドの外科的配置により皮膚および／又は唇の増大又は修復に利用される好ましい方法として、修復又は増大される領域よりも径並びに長さが大きい針（“パッサーニードル（passer needle）”）が選ばれる。このパッサーニードルは皮膚中に挿入され上記領域長さまで縫い進められる。案内縫糸が皮膚／筋膜繊維芽細胞ストランドを通して両端に配置される。案内縫糸の一端はキース（Keith）針に固定される。このキース針は後にパッサーニードルを介して配置される。この案内縫糸はパッサーニードルの最初の挿入位置から最も遠い側（先端）の皮膚から引出される。ついで、皮膚／筋膜繊維芽細胞移植組織がパッサーニードル内に引込まれるが、その位置は先端の案内縫糸又はパッサーニードル挿入点に最も近い案内縫糸を引寄せることにより調節することができる。皮膚／筋膜繊維芽細胞ストランドが先端の案内縫糸により所定位置に保持されている間に、パッサーニードルを後方に引き、取り去る。これにより移植組織が最終的に配置され、残る縫糸が最終的に切断される。

一般に皮膚／筋膜移植組織は皮膚の皮下層中に配置される。しかし、或る場合には、より深く又はより浅く配置してもよい。

もし、修復ないし増大されるべき領域が上記の針による方法で实际的に満たされるものよりも小さい又は大きい場合は、鼓膜切開ナイフ、ハサミ、その他の器具により皮下“ポケット”が形成される。ついで皮膚又は筋膜の1片が上述のように案内縫糸およびパッサーニードルを用いて、その領域中に縫い込まれる。

#### G. 声帯又は喉頭への細胞又は他の物質の注入

一般に、声帯上皮は非常に薄いため、声帯上皮中に細胞物質又は他の物質を直接、注入することは不可能である。従って、注射は通常、基底膜又は筋肉自体に対し行われる。

一般に、基底膜組織（注射のため必要に応じて細かく刻む）、基底膜組織から得

られた繊維芽細胞、又はゼラチン質物質が注射のために利用される。好ましい方法は、基底膜を含む空間、特にラインケ空間（Reinke's空間）に直接注射することである。この注射はできるだけ小さいゲージの喉頭注射針を用いて行うことができ、これは実際の注射の際に異常に高い圧力を加えることなく注入物質を収容することができる。

これは総体的“感覚”に関する主観的プロセスであり、高すぎる圧力の使用は注射された細胞に対し修復不可能な損傷を与えることになる。この注入物質は30ないし18ゲージの針の注射器により注射される。なお、注射針のゲージは注入物質の総粘度、使用される麻酔薬のタイプなどのファクターに応じて決定される。好ましくは、全身および局部麻酔の場合、22ないし18ゲージの針、30ないし27ゲージの針がそれぞれ使用される。必要に応じて、数回の注射が声帯の長さに沿って行われる。

声帯を自己由来培養繊維芽細胞で平均的にするため（medialize）、注入物質は好ましくは、声帯の側方組織又は側方縁部に直接注射する。繊維芽細胞は、具体的声帯の病状に応じて、傷跡、ラインケ空間、筋肉などに注射することができる。好ましくは、繊維芽細胞は筋肉に注射する。

この手法は、患者の順応性、耐力、注入される物質の量、行われる注射のタイプなどに応じて、全身のあるいは局所的に、モニター監視下、あるいは麻酔薬なしで行うことができる。

もし、より大きい程度の増大が必要な場合は、針による切除により“ポケット”を形成してもよい。又は、ナイフおよびハサミを用いて喉頭の顕微解剖を行ってもよい。ついで、所望の物質が、ポケットの大きさ、移植物質の大きさ、麻酔薬、開かれたアクセスなどに応じて、喉頭鉗子を用いてポケット中に挿入され、あるいは直接、注射される。もし、このポケットがこの手法の後にも開いた状態のままであれば、その大きさ、材料の入手可能性、外科医個人の好みなどに応じて、縫合糸、接着剤、レーザーを用いて閉塞することが好ましい。

本発明の具体例、応用を明瞭、理解を目的として具体例に基づいて詳細に説明したが、発明の趣旨から逸脱しない範囲において種々変更し得ることは当業者にとって自明であろう。



### 請求の範囲

1. ヒト被験者における、欠損の矯正用の医療組成物を製造する方法において自己由来の試験管内培養細胞を使用する方法であって、前記ヒト被験者から生成される複数の生育可能な細胞を抽出するステップと、試験管内の生育可能な複数の細胞を培養して生育可能な細胞を拡張して成育可能な細胞数を試験管内で培養するステップとを含み、前記使用方法是、ある容量の試験管内培養細胞を、被験者の組織に配置して上記欠損を治療するステップを含む、方法。

2. ヒト被験者の欠損に適用する組成物を製造するために細胞外基質を使用する方法であって、

a) 被験者から複数の生育可能な細胞を回収し、

b) 細胞が細胞外基質を産生するのに十分な時間、培養容器中で試験管内に細胞を培養し、

c) 細胞により産生された細胞外基質を培養容器から分離し、

d) 細胞外基質を採取し、

e) 前記欠損を治療するための前記組成物に、採取した細胞外基質を配置することによって前記組成物を製造するステップを含む、方法。

3. 被験者における皮膚欠損を修復するための用具であって、

(a) 注射器チェンバ、そこに配置されるピストンおよびチェンバと連通する開口を有する皮下注射器と、

(b) (1) 被験者から得られる基底膜線維芽細胞、乳頭状線維芽細胞、網状線維芽細胞、筋膜線維芽細胞、前脂肪細胞、脂肪細胞、平滑筋細胞、骨格筋細胞、未分化間葉細胞、間葉細胞あるいはこれらの組み合わせおよび (2) 薬学的に許容可能な担体溶液を包含する懸濁液であって、前記チェンバ中に配置される懸濁液と、

(c) 開口に固着される皮下針と、を含む、用具。

4. ヒト患者における欠損を治療するための医療組成物の製造に試験管内培養自己由来細胞を使用する方法であって、前記患者の欠損に前記医療組成物を導入

するステップを含み、前記試験管内培養自己由来細胞は試験管内で培養されて、非自己由来血清に暴露されることなく、自己由来血清を含む少なくとも1つの培地中で細胞数を拡張する、方法。

5. ヒト被験者における欠損に有効量の医療組成物を配置することによって、前記欠損の矯正用の医療組成物を製造する方法における試験管内培養細胞の使用方法であって、前記組成物は複数の試験管内培養された生存可能なヒト胎児細胞あるいは試験管内培養細胞中で拡張された試験管内培養されたヒト若年性細胞を含む、方法。

6. 試験管内培養細胞は、乳頭状繊維芽細胞、網状繊維芽細胞、筋膜繊維芽細胞、基底膜繊維芽細胞、前脂肪細胞または脂肪細胞である、請求項1、4または5のいずれかの項に記載の方法。

7. 前記試験管内培養細胞は、真皮、筋膜、基底膜、脂肪組織および結合組織からなる群から選択される組織由来である、請求項1、4、5または6のいずれかの項に記載の方法。

8. 欠損は、皺襞、妊娠線、陥凹性瘢痕、皮膚陥凹、口唇の形成不全、皺、顕著な鼻唇皺、顕著な頬唇皺、声帯、鼻形成後の不同および尋常性アクネからの瘢痕からなる群から選択される、請求項1、4、5、6または7のいずれかの項に記載の方法。

9. 試験管内培養細胞は、

- a) 下部真皮、
- b) 中間真皮、
- c) 上部真皮、
- d) 皮膚の皮下領域、
- e) 筋組織、

f) 組織内および／または組織周囲の前記の組合せ

の中に配置される請求項1、4、5、6または7のいずれかの項に記載の方法。

10. 皺襞、妊娠線、陥凹性瘢痕、皮膚陥凹、口唇の形成不全、皺、顕著な鼻唇皺、顕著な頬唇皺、声帯、鼻形成後の不同および尋常性アクネからの瘢痕からなる群における欠損に前記懸濁液を導入する、請求項2に記載の方法。

- 1 1. 前記欠損は声帯の欠損である、請求項 1、4、5、6 または 7 のいずれかの項に記載の方法。
- 1 2. 試験管内培養細胞は、前記欠損に前記試験管内培養自己由来細胞と共に配置される細胞外基質を産生する、請求項 1、4、5、6 または 7 のいずれかの項に記載の方法。
- 1 3. 前記組成物は細胞外基質を含む請求項 1、4、5、6 または 7 のいずれかの項に記載の方法。
- 1 4. 前記試験管内培養細胞は、ウシ血清、非ヒト血清、ヒト血清、自己由来血清あるいは無血清培地中で培養されている、請求項 1、4、5、6 または 7 のいずれかの項に記載の方法。
- 1 5. 前記試験管内培養された生存可能なヒト細胞は、前記被験者の組織に配置する前に、凍結あるいは解凍されている、請求項 1、4、5、6 または 7 のいずれかの項に記載の方法。
- 1 6. 前記試験管内培養された生存可能なヒト細胞は、組織サンプルから機械的にあるいは酵素的に製造される複数の細胞から拡張されている、請求項 1、4、5、6 または 7 のいずれかの項に記載の方法。
- 1 7. 前記試験管内培養された生存可能なヒト細胞は、日光に対してほとんど、あるいは全く暴露されていない組織由来の複数の細胞から拡張されている、請求項 1、4、5、6 または 7 のいずれかの項に記載の方法。
- 1 8. 前記試験管内培養された生存可能なヒト細胞は、前記患者へ導入される細胞を得るために、機械的、酵素的、あるいは化学的な処理によって分離されている、請求項 1、4、5、6 または 7 のいずれかの項に記載の方法。
- 1 9. 前記試験管内培養細胞は細胞外基質中で培養されている、請求項 1、4、5、6 または 7 のいずれかの項に記載の方法。
- 2 0. 前記細胞外基質は、フィブロネクチン、フィブリン、ラミニン、エラスチン、ヒアルロン酸、グリコサミノグリカン、コラーゲン、あるいは変性コラーゲンを含む、請求項 1、4、5、6、7、12 または 13 のいずれかの項に記載の方法。
- 2 1. 前記試験管内培養細胞は、平滑筋細胞、骨格筋細胞、未分化間葉細胞から

なる群より選択される、請求項1、4、5、6または7のいずれかの項に記載の方法。

22. 前記試験管内培養細胞は、瘢痕、ラインケ空間、声帯の筋肉および基底膜からなる群より選択された部位に送り出される、請求項1、4、5、6または7のいずれかの項に記載の方法。