

【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3部門第2区分

【発行日】平成28年5月12日(2016.5.12)

【公表番号】特表2015-516373(P2015-516373A)

【公表日】平成27年6月11日(2015.6.11)

【年通号数】公開・登録公報2015-038

【出願番号】特願2014-561519(P2014-561519)

【国際特許分類】

A 6 1 K 33/44 (2006.01)

A 6 1 P 1/16 (2006.01)

A 6 1 P 31/12 (2006.01)

A 6 1 P 29/00 (2006.01)

A 6 1 P 43/00 (2006.01)

A 6 1 P 9/10 (2006.01)

A 6 1 P 1/04 (2006.01)

A 6 1 P 9/12 (2006.01)

A 6 1 P 9/00 (2006.01)

A 6 1 P 3/04 (2006.01)

A 6 1 P 39/02 (2006.01)

C 0 1 B 31/10 (2006.01)

B 0 1 J 20/20 (2006.01)

【F I】

A 6 1 K 33/44

A 6 1 P 1/16

A 6 1 P 31/12

A 6 1 P 29/00

A 6 1 P 43/00 1 0 5

A 6 1 P 9/10

A 6 1 P 1/04

A 6 1 P 9/12

A 6 1 P 9/00

A 6 1 P 3/04

A 6 1 P 39/02

C 0 1 B 31/10

B 0 1 J 20/20 B

【手続補正書】

【提出日】平成28年3月14日(2016.3.14)

【手続補正1】

【補正対象書類名】特許請求の範囲

【補正対象項目名】全文

【補正方法】変更

【補正の内容】

【特許請求の範囲】

【請求項1】

粒子の全細孔容積の20%～90%が、2nm以下の平均直径を有する細孔から構成され、及び全細孔容積の残りの75%以上が、30nm～500nmの平均直径を有する細孔から構成される多孔性炭素粒子を有効成分として含み、該粒子が、経口又は経直腸での投与のために製剤化される、肝疾患の治療又は予防剤。

【請求項 2】

粒子の全細孔容積の残りの85%以上が、30nm～500nmの平均直径を有する細孔から構成される、請求項1に記載の治療又は予防剤。

【請求項 3】

粒子の全細孔容積の残りの90%以上が、30nm～500nmの平均直径を有する細孔から構成される、請求項2に記載の治療又は予防剤。

【請求項 4】

粒子の全細孔容積の残りの75%以上、85%以上又は90%以上が、50nm～300nmの平均直径を有する細孔から構成される、請求項1から3のいずれか一項に記載の治療又は予防剤。

【請求項 5】

粒子の全細孔容積の残りの75%以上、85%以上又は90%以上が、50nm～200nmの平均直径を有する細孔から構成される、請求項1から4のいずれか一項に記載の治療又は予防剤。

【請求項 6】

粒子の全細孔容積の35～60%が、2nm以下の平均直径を有する細孔から構成される、請求項1から5のいずれか一項に記載の治療又は予防剤。

【請求項 7】

粒子の全細孔容積の45～55%が、2nm以下の平均直径を有する細孔から構成される、請求項1から6のいずれか一項に記載の治療又は予防剤。

【請求項 8】

全細孔容積が、 $0.5 \sim 2.5 \text{ cm}^3/\text{g}$ である、請求項1から7のいずれか一項に記載の治療又は予防剤。

【請求項 9】

粒子の全細孔容積が、 $1.0 \sim 2.0 \text{ cm}^3/\text{g}$ である、請求項1から8のいずれか一項に記載の治療又は予防剤。

【請求項 10】

多孔性炭素粒子の嵩密度が、 $0.10 \text{ g/cm}^3 \sim 0.30 \text{ g/cm}^3$ である、請求項1から9のいずれか一項に記載の治療又は予防剤。

【請求項 11】

多孔性炭素粒子の嵩密度が、 $0.15 \text{ g/cm}^3 \sim 0.25 \text{ g/cm}^3$ である、請求項1から10のいずれか一項に記載の治療又は予防剤。

【請求項 12】

粒子の比表面積が、 $700 \text{ m}^2/\text{g} \sim 2000 \text{ m}^2/\text{g}$ である、請求項1から11のいずれか一項に記載の治療又は予防剤。

【請求項 13】

粒子の比表面積が、 $900 \text{ m}^2/\text{g} \sim 1400 \text{ m}^2/\text{g}$ である、請求項1から12のいずれか一項に記載の治療又は予防剤。

【請求項 14】

粒子が、球状粒子の形態である、請求項1から13のいずれか一項に記載の治療又は予防剤。

【請求項 15】

粒子が、易流動性形態又は錠剤形態での経口投与のために製剤化される、請求項1から14のいずれか一項に記載の治療又は予防剤。

【請求項 16】

肝疾患が、アルコール性肝疾患(ALD)、非アルコール性肝疾患、非アルコール性脂肪性肝炎(NASH)、肝硬変、及び/又は肝硬変の合併症から選択される、請求項1から15のいずれか一項に記載の治療又は予防剤。

【請求項 17】

非アルコール性肝疾患が、非アルコール性脂肪性肝疾患(NAFLD)である、請求項16に記載の治療又は予防剤。

【請求項 18】

ALD、NAFLD又はウイルス性肝炎などの慢性肝疾患における炎症及び線維症の治療又は予防のための、請求項1から15のいずれか一項に記載の治療又は予防剤。

【請求項 19】

肝硬変の合併症が、門脈圧亢進、腹水、腎不全、肝性脳症、及び慢性肝不全の急性増悪から選択される、請求項16に記載の治療又は予防剤。

【請求項 20】

肝疾患を治療又は予防するための医薬品の製造における請求項1から15のいずれか一項に記載の多孔性炭素粒子の使用。

【請求項 21】

請求項1から15のいずれか一項に記載の多孔性炭素粒子を有効成分として含む、腸肝軸の調節剤。

【請求項 22】

腸肝軸の調節が、腸管腸内毒素症又は肥満、又は腸管透過性増加の調節による、請求項21に記載の調節剤。

【請求項 23】

請求項1から15のいずれか一項に記載の多孔性炭素粒子を有効成分として含む、冠状動脈疾患、炎症性腸疾患、過敏性腸症候群、回腸囊炎、高血圧、脳卒中、肥満、又は肥満の合併症から選択される疾患又は状態の治療又は予防剤。

【請求項 24】

疾患又は状態が、腸管腸内毒素症及び/又は腸管透過性の変化と関連する、請求項23に記載の治療又は予防剤。

【請求項 25】

全細孔容積の20%~90%が、2nm以下の平均直径を有する細孔から構成され、及び全細孔容積の残りの75%以上が、30nm~500nmの平均直径を有する細孔から構成される多孔性炭素粒子であって、それらの放出及び吸着特性をコントロールするために該粒子が被覆されている、多孔性炭素粒子。

【請求項 26】

粒子が、大腸中での顕著な放出を可能にするフィルムで被覆されている、請求項25に記載の多孔性炭素粒子。

【請求項 27】

粒子が、請求項2から15のいずれか一項に定義されている、請求項25又は26に記載の多孔性炭素粒子。

【請求項 28】

請求項25から27のいずれか一項に定義されている多孔性炭素粒子を有効成分として含む、肝疾患の治療又は予防剤。

【請求項 29】

肝疾患が請求項16から19のいずれか一項に定義されている、請求項28に記載の治療又は予防剤。

【請求項 30】

請求項25から27のいずれか一項に定義されている多孔性炭素粒子を有効成分として含む、腸肝軸の調節剤。

【請求項 31】

腸肝軸の調節が、腸管腸内毒素症又は肥満、又は腸管透過性増加の調節による、請求項30に記載の調節剤。

【請求項 32】

請求項25から27のいずれか一項に記載の多孔性炭素粒子を有効成分として含む、冠状動脈疾患、炎症性腸疾患、過敏性腸症候群、回腸囊炎、高血圧、脳卒中、肥満、又は肥満の合併症から選択される疾患又は状態の治療又は予防剤。

【請求項 33】

疾患又は状態が、腸管腸内毒素症及び/又は腸管透過性の変化と関連する、請求項32に

記載の治療又は予防剤。

【請求項34】

粒子が、経口又は経直腸での投与のために製剤化される、請求項28から33のいずれか一項に記載の治療又は予防剤。

【手続補正2】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0009

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0009】

【図1】非賦活のTE9炭素、29%及び47%燃焼で賦活されたTE9炭素に関して、窒素吸着によって測定し、BJH法を使用して求めた、フェノール樹脂に由来する炭素の細孔分布を示す図である。賦活は、主として、マイクロポア(直径<2nm)である細孔を増加させる。小さなマクロポア(50nm~500nm)は、大きく変化することではなく、2~50nmの範囲の細孔(メソポア)の導入を伴わない。

【図2】水銀ポロシメトリーで測定された、本発明の多孔性炭素粒子(A:TE7試験炭素、B:TE8試験炭素)の代表的な細孔径分布を示す図である。30,000nmより大きいピークは、炭素粒子間の空隙によるものであり、孔隙によるものではない。

【図3】ほぼ50%の燃焼まで賦活されたTE3からTE7までの炭素に関する、細孔形成剤濃度の増加に伴うマクロポア(50~500nm)容積の増加を示す図である。メソポア範囲(2~50nm)の細孔の有意な導入、又はマイクロポア領域の細孔の変化はない。

【図4】Aは、細孔構造に対する賦活度の効果、すなわち賦活に起因する水銀ポロシメトリーによって測定した場合の cm^3/gm 基準での細孔容積の漸増、及び賦活による嵩密度の低下を示す図であり;Bは、細孔構造に対する賦活度の効果、すなわち水銀ポロシメトリーで測定した場合の水銀細孔容積の変化(cm^3/cm^3)を賦活化度の関数として表した図である。

【図5】Aは、時間経過に伴うアセトアルデヒドの除去($500\mu\text{M}$ (22mg/L)のアセトアルデヒド濃度(Ac)で添加、 $n=3$ 、平均 $\pm$ SEM、室温、DIH誘導体化剤、HPLC ELS検出法)を示す図であり;Bは、時間経過に伴う試験炭素によるアセトアルデヒド(AT)(7.2mM、0.1g/mLで添加)の%吸着($n=3$ 、平均 $\pm$ SEM)を表す図である。

【図6】試験炭素TE8の細菌増殖に対する、E coli(3.9×10^9 細菌/mLで接種)との直接接触後の蛍光シグナルを時間経過と共に評価するBacTitre-Gro微生物細胞生存アッセイを使用して測定される効果を、示した図である(平均 $\pm$ SEM、 $n=3$)。

【図7】試験炭素TE7の細菌増殖に対する効果を、S. aureus(7.5×10^7 細菌/mLで接種)と直接接触後の蛍光シグナルを時間経過と共に評価するBacTitre-Glo微生物細胞生存アッセイを使用して測定した図である(平均 $\pm$ SEM、 $n=3$)。データは、炭素が、生体外でこれらの細菌を死滅させないことを示唆している。

【図8】試験炭素TE7の浸出液のE coliの増殖性に対する効果を、Biscreen比濁分析計を使用し、濁度(540nm)の増加によって時間経過と共に測定した図である(平均、 $n=4$)。データは、炭素が、これらの細菌を生体外で死滅させないことを示唆している。

【図9】試験炭素TE7の浸出液のB subtilisの増殖性に対する効果を、Biscreen比濁分析計を使用し、濁度(540nm)の増加によって時間経過と共に測定した図である(平均、 $n=4$)。データは、炭素が、これらの細菌を生体外で死滅させないことを示唆している。

【図10】Aは、試験炭素によるエンドトキシンの除去を、炭素不含対照と時間経過と共に比較した図であり($n=3$ 、平均 $\pm$ SEM);Bは、試験炭素によるエンドトキシンの除去を、より多くのエンドトキシン添加(SIFに0.1g、200EU/mLで添加)で、炭素不含対照と時間経過と共に比較した図である($n=3$)。

【図11】試験炭素TE8がSIFからTNFを除去する能力を、平衡濃度に対して炭素1g당りに吸着されたTNF量(μg)を示す吸着等温線として表現した図である(平均、 $n=4$)。

【図12】肝臓内生化学物質ALTを示す図である。非治療群に比較して有意なアラニン转ランスアミナーゼ(ALT)の減少が、炭素で治療されたBDL及びBDL+LPS群において観察され

た。炭素治療には、BDL+LPSラットにおいて99U/mLから62U/mL($p=0.0152$)への、及びBDLラットにおいて71U/mLから52U/mL($p=0.0422$)へのALTの減少が伴った。(Sham:偽手術、BDL:胆管結紮[4週間後に調査]、LPS:腹腔内でリボ多糖を投与された動物、BDL炭素は、炭素で治療された群を指す)。

【図13】動脈TNF α を示す図である。TNF α は、炭素で治療されたBDL動物において有意に減少する。

【図14】門脈圧を示す図である。炭素治療後に、門脈圧の有意な低下が、BDL+LPS群で(非治療で平均18.05mmHg、炭素治療で10.17mmHg、 $p=0.0007$)、及びBDL群で(非治療で平均12.57mmHg、炭素治療で11.02mmHg、 $p=0.0043$)観察された。(Sham:偽手術、BDL:胆管結紮[4週間後に調査]、LPS:腹腔内でリボ多糖を投与された動物、BDL炭素は、炭素で治療された群を指す)。

【図15】体重を示す図である。炭素で治療されたBDL動物において、最終乾燥重量の非治療群と比較して有意な増加が観察された($p=0.0271$)。データは、炭素の投与が、肝硬変に付随する悪質液を減少させることができることを示唆している。(Sham:偽手術、BDL:胆管結紮[4週間後に調査]、BDL炭素は、炭素で治療された群を指す)。

【図16】クッパー細胞(CD163+)集団を示す図である。炭素で治療されたBDL動物において、炭素での治療は、非治療群に比較して、賦活されたクッパー細胞集団の減少をもたらした。データは、BDL動物で観察される肝損傷低下の潜在的機構を提供している。(Sham:偽手術、BDL:胆管結紮[4週間後に調査]、LPS:腹腔内でリボ多糖を投与された動物、BDL炭素は、炭素で治療された群を指す)。

【図17】賦活されたマクロファージ(CD63+)集団を示す図である。炭素で治療されたBDL動物において、炭素での治療は、非治療群に比較して、賦活されたクッパー細胞集団の減少をもたらした。データは、BDL動物で観察される肝損傷低下の潜在的機構を提供している。(Sham:偽手術、BDL:胆管結紮[4週間後に調査]、LPS:腹腔内でリボ多糖を投与された動物、BDL炭素は、炭素で治療された群を指す)。

【図18】全肝ROS活性を示す図である。炭素で治療されたBDL動物において、炭素での治療は、非治療群に比較して、肝臓の酸化ストレスの低下をもたらした。データは、BDL動物で観察される肝損傷低下の潜在的機構を提供している。(Sham:偽手術、BDL:胆管結紮[4週間後に調査]、BDL炭素は、炭素で治療された群を指す)。

【図19】クッパー細胞ROS活性を示す図である。炭素で治療されたBDL動物において、炭素での治療は、非治療群に比較して、クッパー細胞の活性酸素種の産生の調節を介する肝酸化ストレスの低下をもたらした。データは、BDL動物で観察される肝損傷低下の潜在的機構を提供している。(Sham:偽手術、BDL:胆管結紮[4週間後に調査]、BDL炭素は、炭素で治療された群を指す)。

【図20】クッパー細胞のLPS ROS活性を示す図である。炭素で治療されたBDL動物において、炭素での治療は、非治療群に比較して、クッパー細胞の活性酸素種の生成で誘導されるエンドトキシンの減少をもたらした。データは、BDL動物で観察される肝損傷低下の潜在的機構を提供している。(Sham:偽手術、BDL:胆管結紮[4週間後に調査]、LPS:腹腔内でリボ多糖を投与された動物、BDL炭素は、炭素で治療された群を指す)。

【図21】腸管透過性を示す図である。炭素で治療されたBDL動物において、腸管透過性は、非治療群に比較して正常化された。データは、炭素で治療された群が、BDL動物で観察される透過性の増加を正常化したことを立証している。(Sham:偽手術、BDL:胆管結紮[4週間後に調査]、BDL炭素は、炭素で治療された群を指す)。

【図22】細菌移入のマーカー(門脈エンドトキシン)を示す図である。炭素での治療は、内毒素血症を顕著に低減し、腸管透過性及び細菌移入を変化させた。

【図23】遠隔臓器への効果(肝性脳症)を示す図である。炭素での治療は、脳中水分及び血清中アンモニアレベルの低下をもたらした。

【図24】細菌移入のマーカー(細菌PCR陽性)を示す図である。炭素での治療は、細菌移入の顕著な低下をもたらした。

【図25】門脈サイトカインを示す図である。炭素療法で、門脈IL-4及びIL-10の有意で

ない減少が観察された。

【図26】結腸の組織構造を示す図である。炭素での治療の後に、回腸、空腸及び結腸の組織構造は、影響を受けないでそのままであり、治療が、腸粘膜に対して安全であることを示している。(Sham:偽手術、BDL:胆管結紮[4週間後に調査]、BDL炭素は、炭素で治療された群を指す)。

【図27】血清中クレアチニンを示す図である。LPSを投与した後のBDL動物で悪化する腎機能を象徴する血清中クレアチニンの上昇は、炭素で治療されたBDL動物で予防され、炭素は、肝硬変の急性腎損傷を低減することを示している。(Sham:偽手術、BDL:胆管結紮[4週間後に調査]、LPS:腹腔内でリポ多糖を投与された動物、BDL炭素は、炭素で治療された群を指す)。

【図28】脑中水分(%)を示す図である。LPSで処置されたBDL動物において、脑中水分の増加は、炭素で治療された動物で予防され、BDL動物の治療が、肝硬変の脳合併症及びそれによる肝性脳炎を減少させることを示唆している。(Sham:偽手術、BDL:胆管結紮[4週間後に調査]、LPS:腹腔内でリポ多糖を投与された動物、BDL炭素は、炭素で治療された群を指す)。

【図29】糞便中でのバクテロイデス/全細菌の比率を示す図である。データは、バクテロイデス種が、BDL動物の糞便中で増加し、炭素で治療されたBDL動物で正常に向かって減少するが、細菌全数は、同じままであることを示唆している。(Sham:偽手術、BDL:胆管結紮[4週間後に調査]、BDL炭素は、炭素で治療された群を指す)。

【図30】糞便中でのファーミキューテス/全細菌の比率を示す図である。データは、ファーミキューテス種が、BDL動物の糞便中で減少し、炭素で治療されたBDL動物で正常に向かって増加するが、細菌全数は、同じままであることを示唆している。(Sham:偽手術、BDL:胆管結紮[4週間後に調査]、BDL炭素は、炭素で治療された群を指す)。

【図31】糞便中でのファーミキューテス/バクテロイデスの比率を示す図である。データは、ファーミキューテスのバクテロイデス種に対する比率が、BDL動物の糞便中で減少し、炭素で治療されたBDL動物で正常に向かって増加することを示唆している。(Sham:偽手術、BDL:胆管結紮[4週間後に調査]、BDL炭素は、炭素で治療された群を指す)。

【図32】体重を示す図である。レプチン欠損0b/0bマウスにおいて、肥満マウスは、炭素での治療により正常に向けて体重を減らす。データは、炭素が、肥満の治療で有用である可能性があることを示唆している。(0b-/ob遺伝子に関してヘテロ接合体、0b-/0b-/0b/0b遺伝子に関してホモ接合体、+C:炭素で4週間治療された群)。

【図33】ALTを示す図である。肥満(0b/0b)マウスの炭素での治療は、肝損傷の減少をもたらす。炭素が、非アルコール性脂肪性肝疾患のための治療である可能性があることを示唆している。(0b-/ob遺伝子に関してヘテロ接合体、0b-/0b-/0b/0b遺伝子に関してホモ接合体、+C:炭素で4週間治療された群)。

【図34】肝臓の組織構造を示す図である。肥満マウスの炭素での治療は、肝脂肪の蓄積及び炎症性細胞の浸潤の減少をもたらす。(0b-/ob遺伝子に関してヘテロ接合体、0b-/0b-/0b/0b遺伝子に関してホモ接合体、+C:炭素で4週間治療された群)。

【図35】クッパー細胞集団(F4/80+/CD68-/CD11b+)を示す図である。肥満マウスの炭素での治療は、クッパー細胞の賦活の低下をもたらす。(0b-/ob遺伝子に関してヘテロ接合体、0b-/0b-/0b/0b遺伝子に関してホモ接合体、+C:炭素で4週間治療された群)。

【図36】クッパー細胞集団(F4/80+)を示す図である。肥満マウスの炭素での治療は、クッパー細胞の賦活の低下をもたらす。このことは、炭素で治療された0b/0bマウスにおいて肝損傷が低減される可能性のある機構を提供する。(0b-/ob遺伝子に関してヘテロ接合体、0b-/0b-/0b/0b遺伝子に関してホモ接合体、+C:炭素で4週間治療された群)。

【図37】クッパー細胞集団のF4/80+LPS:ROS産生を示す図である。肥満マウスの炭素での治療は、クッパー細胞による活性酸素種の産生の低下をもたらす。(0b-/ob遺伝子に関してヘテロ接合体、0b-/0b-/0b/0b遺伝子に関してホモ接合体、+C:炭素で4週間治療された群)。

【図38】肝臓の組織構造(コラーゲン染色)を示す図である。非アルコール性脂肪性肝疾

患のハーフ-メチオニンコリン欠損食(HMCD)モデルにおいて、炭素は、組織学的線維症を低減し、炭素治療が、肝線維症の治療である可能性があることを示唆している。(HMCD非治療:食餌のみ、HMCD炭素:4週間の食餌+炭素治療)。

【図 3 9】肝臓での線維症のマーカーに関する遺伝子発現を示す図である。非アルコール性脂肪性肝疾患のハーフ-メチオニンコリン欠損食(HMCD)モデルにおいて、炭素は、コラーゲンA2及びTGFB1の遺伝子発現を低減する。データは、炭素が、肝線維症の予防のための治療である可能性があることを支持している。(HMCD非治療:食餌のみ、HMCD C4:4週間の食餌+炭素治療)。

【図 4 0】ALTを示す図である。非アルコール性脂肪性肝疾患のハーフ-メチオニンコリン欠損食(HMCD)モデルにおいて、炭素の投与は、肝損傷を低減し、炭素が、非アルコール性脂肪性肝疾患の治療である可能性があることを示唆している。(HMCD:食餌のみ、HMCD+C:4週間の食餌+炭素治療、WT:非治療対照)。

【図 4 1】肝臓の組織構造(H&E染色)を示す図である。非アルコール性脂肪性肝疾患のハーフ-メチオニンコリン欠損食(HMCD)モデルにおいて、炭素は、肝臓中での脂肪蓄積を低減し、炭素が、非アルコール性脂肪性肝疾患の治療である可能性があることを示唆している。(HMCD非治療:食餌のみ、HMCD炭素:4週間の食餌+炭素治療)。

【図 4 2】肝臓の組織構造(脂肪症評点)を示す図である。非アルコール性脂肪性肝疾患のHMCDモデルにおいて、炭素は、脂肪蓄積を低減し、炭素が、非アルコール性脂肪性肝疾患の治療である可能性があることを示唆している。(HMCD非治療:食餌のみ、HMCD炭素:4週間の食餌+炭素治療)。

【図 4 3】肝臓の生化学物質を示す図である。非アルコール性脂肪性肝疾患のメチオニンコリン欠損食(MCD)モデルにおいて、炭素は、肝損傷を低減し、炭素が、非アルコール性脂肪性肝疾患の治療である可能性があることを示唆している。(WT:非治療群、WT+C:非治療群+C、MCD:食餌のみ、MCD+C:炭素で治療されたMCD動物)。

【図 4 4】肝臓の組織構造(H&E染色)を示す図である。非アルコール性脂肪性肝疾患のメチオニンコリン欠損食(MCD)モデルにおいて、炭素は、脂肪蓄積を低減し、炭素が、非アルコール性脂肪性肝疾患の治療である可能性があることを示唆している。(MCD非治療:食餌のみ、MCD+炭素:食餌+炭素治療)。

【図 4 5】非アルコール性脂肪性肝疾患のMCDモデルにおいて、炭素は、組織学的線維症を低減し、炭素が、肝線維症の治療である可能性を示唆している。MCD非治療:食餌のみ、MCD+炭素:食餌+炭素治療)。

【手続補正 3】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0 1 5 9

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0 1 5 9】

<非実質肝細胞の単離>

灌注された肝臓組織をメスで解体し、ハンクス平衡塩溶液(カルシウム及びマグネシウム+0.01%のコラゲナーゼ及び0.01%のDNA分解酵素を含む)中でホモジナイズした。ホモジネートを、50mLのファルコン管に移し、37℃でインキュベートした後、100 μmの細胞ストレーナーを通して濾過した。次いで、これを500rpm、4℃で5分間遠心し、続いて、上清液を、2000rpm、4℃で10分間遠心した。上清液を廃棄し、ペレットをPF4(カルシウム又はマグネシウムを含まず、0.01%のDNA分解酵素、0.25%のウシ血清アルブミンを含むHBSS)中に再懸濁し、2000rpm、4℃で10分間遠心した。次いで、ペレットを、3.9mLのRPMI 1640中に再懸濁し、2.1mL(RPMI+22%のOptiprep)と穏やかに混合した。次いで、頂面上にRPMIを層化し、続いて、制動せずに2800rpm、4℃で25分間遠心した。非実質細胞を、界面から単離し、等容積のPF4中に再懸濁し、2000rpm、4℃で10分間遠心した。続くすべてのアッセイで、 10×10^6 個の細胞を使用した。

【手続補正 4】

【補正対象書類名】図面
【補正対象項目名】図 3 9
【補正方法】変更
【補正の内容】
【図 3 9】

