(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
2004 年11 月25 日 (25.11.2004)

PCT

(10) 国際公開番号
WO 2004/100833 A1

(51) 国際特許分類[7]: A61F 2/02, A61L 27/00, A61K 35/12

(21) 国際出願番号: PCT/JP2004/006666

(22) 国際出願日: 2004 年5 月12 日 (12.05.2004)

(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2003-138016 2003 年5 月15 日 (15.05.2003) JP

(71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 学校法人早稲田大学 (WASEDA UNIVERSITY) [JP/JP]; 〒1698050 東京都新宿区戸塚町一丁目１０４番地 Tokyo (JP). オーベクス株式会社 (AUBEX CORPORATION) [JP/JP]; 〒1308601 東京都墨田区業平五丁目１番１２号 Tokyo (JP).

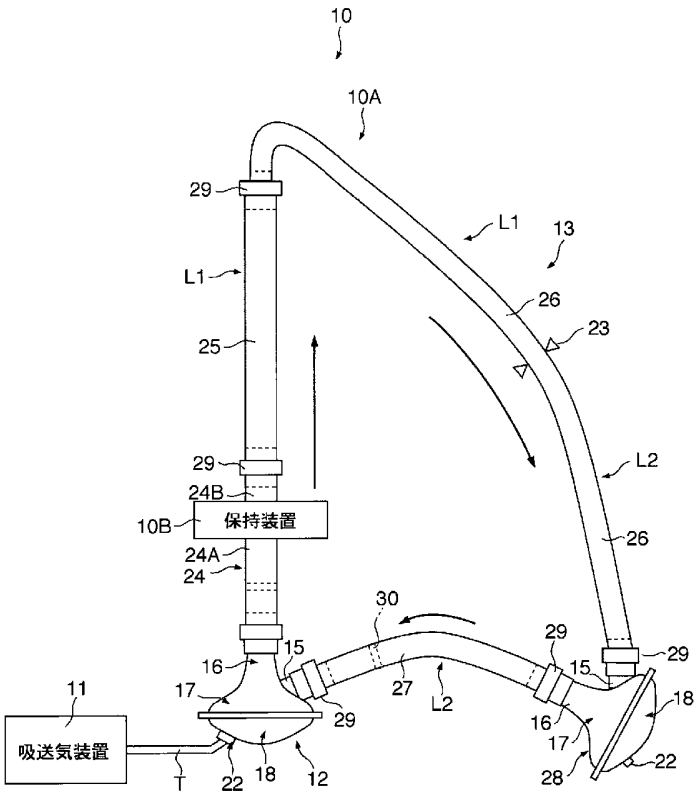
(72) 発明者; および

(75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 梅津 光生 (UMEZU, Mitsuo) [JP/JP]; 〒1698555 東京都新宿区大久保三丁目４番１号 学校法人早稲田大学理工学部内 Tokyo (JP). 岩崎 清隆 (IWASAKI, Kiyotaka) [JP/JP]; 〒1698555 東京都新宿区大久保三丁目４番１号 学校法人早稲田大学理工学部内 Tokyo (JP). 尾崎 重之 (OZAKI, Shigeyuki) [JP/JP]; 〒1520033 東京都目黒区大岡山１丁目２９番２２号－５０１ Tokyo (JP). 守

[続葉有]

(54) Title: METHOD OF SOWING CELL

(54) 発明の名称: 細胞播種方法



10B...RETENTION UNIT
11...AIR SUCTION SUPPLY UNIT

(57) Abstract: In the transplant of given living organism tissue, a cell-containing solution having transplant recipient living organism cells incorporated therein is prepared; the cell-containing solution is provided with flow approximately equal to the bloodstream of transplant recipient living body; and the living organism tissue is placed in the flow so as to effect immersion of the living organism tissue in the cell-containing solution. In the immersion, the living organism tissue is rotated so that the revolving directions of the upper and lower sides of the living organism tissue are reverse to each other. As a result, the orientation of living organism cells adhering to living organism tissue after cell removal can be improved so that the living organism cells can be vitalized. Thus, living organism cells can be attached to the living organism tissue at an increased density with the result that the biocompatibility of living organism tissue after transplant can be enhanced.

(57) 要約: 所定の生体組織を移植する際に、当該移植先の生体細胞を含む細胞含有溶液を作成し、当該細胞含有溶液に対し、移植先の生体の血流に略相当する流れを付与し、当該流れの中に前記生体組織を置くことで、前記生体組織を細胞含有溶液に浸漬させる。この際、生体組織の上下両側が反転

[続葉有]

WO 2004/100833 A1

本 祐司 (MORIMOTO, Yuji) [JP/JP]; 〒1570074 東京都世田谷区大蔵二丁目１１番２号－４０６ Tokyo (JP). 遠藤 修 (ENDO, Osamu) [JP/JP]; 〒1308601 東京都墨田区業平五丁目１番１２号 オーベクス株式会社内 Tokyo (JP).

(74) 代理人: 榎本 英俊 (ENOMOTO, Hidetoshi); 〒1930941 東京都八王子市狭間町１７６９－８ 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, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NA, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

(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, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

添付公開書類:
— 国際調査報告書

２文字コード及び他の略語については、定期発行される各*PCT*ガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語のガイダンスノート」を参照。

する方向に、当該生体組織を回転させる。これにより、脱細胞化後の生体組織に付着する生体細胞の配向性が良くなり、当該生体細胞が活性化されることで、生体細胞をより高密度で生体組織に付着させることができ、当該生体組織を移植した後の生体適合性を高めることができる。

明 細 書

細胞播種方法

技術分野

本発明は細胞播種方法に係り、更に詳しくは、所定の生体組織を移植する際に、当該生体組織の細胞播種効果を高めることのできる細胞播種方法に関する。

背景技術

人体の心臓弁が正常に働かず、弁の開口部位の狭窄や血液の逆流が生じるような機能障害が生じた場合には、その心臓弁を所定の代替弁に交換する必要がある。この代替弁としては、現在、所定の人工材料で形成される機械弁、ブタ等の動物から採取される異種生体弁、他の人体から提供される同種生体弁等がある。ここで、前記機械弁は、耐久性があるものの抗凝固剤を一生飲み続けなければならないという問題がある。一方、前記異種生体弁は、抗凝固剤を一生飲み続けなくても良いが、長期的なカルシウムの沈着等によって弁機能不全を起こし、１５年程度で新たな代替弁への交換必要性が生じるという問題がある。また、前記同種生体弁は、ドナー不足により大量確保が難しいという問題がある。

ところで、前記異種生体弁は、十分な数を供給でき、且つ、移植後に患者が抗凝固剤を一生飲み続けなくても良いことから、欠点とされている耐久性を向上させれば、他の代替弁より有用になることが期待できる。

そこで、ブタ等の動物から採取した異種生体弁に対し、移植後の免疫拒絶反応を抑制し、且つ、耐久性を向上させる次の処理方法が知られている（例えば、特開平６－２６１９３３号公報参照）。すなわち、先ず、胆汁酸や界面活性剤等の細胞除去溶液に異種生体弁を浸漬し、動物の内皮細胞、線維芽細胞等の動物の原細胞を除去する（脱細胞化処理）。その後、移植先人体の内皮細胞、線維芽細胞等の自己細胞を含む細胞含有溶液に、原細胞が除去された異種生体弁を浸漬させることで、前記自己細胞を異種生体弁に播種する（細胞播種処理）。

しかしながら、前述した処理方法にあっては、動物から採取した異種生体弁に対する脱細胞化処理及び細胞播種処理を効果的に行えず、当該各処理後の異種生

体弁に十分な生体適合性を付与させることできないという不都合がある。すなわち、前述の細胞播種処理では、異種生体弁の全域に自己細胞が均一に付着せず、異種生体弁に播種される自己細胞の数も十分ではない。

そこで、本発明者らは、前述の課題を解決するために、鋭意、実験研究を行った結果、前記細胞播種処理時において、脱細胞処理後の異種生体弁を前記細胞含有溶液内で上下方向に回転し、更に、当該細胞含有溶液に人体の血流に略相当する流れを付与したところ、前述の処理方法よりも、前記自己細胞が均一に付着し、その付着数が増大することを知見した。

発明の開示

本発明は、このような知見に基づいて案出されたものであり、その目的は、異種生体弁等の生体組織に、移植先の生体細胞を付着させ易くすることで、移植後における生体組織の生体適合性を高めることができる細胞播種方法を提供することにある。

前記目的を達成するため、本発明は、所定の生体組織を移植する際に、当該移植先の生体細胞を含む細胞含有溶液に前記生体組織を浸漬し、当該生体組織に前記生体細胞を付着させる細胞播種方法であって、

前記細胞含有溶液に対し、移植先の生体の血流に略相当する流れを付与し、当該流れの中に前記生体組織を置く、という手法を採っている。このような手法によれば、脱細胞化後の生体組織に付着する生体細胞の配向性が良くなり、当該生体細胞が活性化されることで、生体細胞をより高密度で生体組織に付着させることができ、当該生体組織を移植した後の生体適合性を高めることができる。

また、本発明は、所定の生体組織を移植する際に、当該移植先の生体細胞を含む細胞含有溶液に前記生体組織を浸漬し、当該生体組織に前記生体細胞を付着させる細胞播種方法であって、

前記細胞含有溶液に浸漬された生体組織を、その上下両側が反転する方向に回転させる、という手法を採ることもできる。このような手法によれば、重力の影響を排除した上で、生体細胞を生体組織に付着させることができ、前記重力の影響による生体細胞の付着ムラを無くし、生体組織の略全域に生体細胞を付着させ

ることができ、細胞播種効果を高めることができる。

更に、所定の生体組織を移植する際に、当該移植先の生体細胞を含む細胞含有溶液に前記生体組織を浸漬し、当該生体組織に前記生体細胞を付着させる細胞播種方法であって、

前記細胞含有溶液中で前記生体組織を所定時間静止させた後、前記細胞含有溶液に浸漬された生体組織を、その上下両側が反転する方向に回転させ、その後、前記細胞含有溶液に対し、移植先の生体の血流に略相当した流れを付与し、当該流れの中に前記生体組織を置く、という手法を採るとよい。このような手法によれば、細胞播種効果が相乗的に高まり、生体組織に対し、非常に良好となる生体適合性を付与することができる。

図面の簡単な説明

図１は本発明に適用される生体組織処理装置の概略構成図、図２は駆動ポンプの概略縦断面図、図３は前記生体組織処理装置を構成する保持装置の概略正面図、図４は前記保持装置のカバーの分解斜視図、図５は保持体の概略断面図、図６は図５中右側の分解断面図、図７は流入部の流路形成部材の概略分解斜視図、図８は図５中左側の分解断面図、図９は流出部の流路形成部材の概略分解斜視図、図１０（Ａ）は保持体を含む図３の一部分を抜粋した図、図１０（Ｂ）は（Ａ）の状態から全体が支持軸回りに１８０度回転した状態を示す図、図１１は実施例１、２及び比較例１のそれぞれの単位面積当りの原細胞残存数を対比して表した図表、図１２は実施例３で得られた生体組織の拡大顕微鏡写真を表す図、図１３は実施例４で得られた生体組織の拡大顕微鏡写真を表す図である。

発明を実施するための最良の形態

以下、本発明の実施の形態について図面を参照しながら説明する。

図１には、本実施形態に係る生体組織処理装置の概略構成図が示されている。この図において、生体組織処理装置１０は、生体組織である異種生体弁の脱細胞化処理や細胞播種処理を行う際に用いられる装置である。ここで、前記脱細胞化処理は、ブタ等の動物から採取した異種生体弁を人体に移植する前に、当該異種

生体弁を胆汁酸等の細胞除去溶液に浸漬することにより、前記動物の細胞（以下、「原細胞」と称する）を除去してコラーゲン等からなる基質のみにする処理である。一方、前記細胞播種処理は、移植先の人体の細胞（以下、「自己細胞」と称する）を含む細胞含有溶液に脱細胞化後の異種生体弁を浸漬することにより、前記基質に自己細胞を付着させる処理である。

この生体組織処理装置１０は、前記細胞除去溶液や前記細胞含有溶液を所定の回路によって循環させる循環装置１０Ａと、この循環装置１０Ａに付随して設けられ、前記異種生体弁を保持する保持装置１０Ｂとを備えて構成されている。なお、以下においては、特に明記しない限り、前記細胞除去溶液及び前記細胞含有溶液を各溶液と総称する。

前記循環装置１０Ａは、公知の吸送気装置１１と、この吸送気装置１１に繋がるポリウレタン製の駆動ポンプ１２と、この駆動ポンプ１２から吐出した各溶液が駆動ポンプ１２に戻るように配置された循環路１３とを備えて構成されている。

前記吸送気装置１１は、駆動ポンプ１２に対して吸送気可能に設けられた公知の構造を備えたものであり、ここでは、詳細な説明を省略する。

前記駆動ポンプ１２は、その内部に旋回渦流を発生させ、吐出時に拍動流を生成可能な拍動型ポンプである。すなわち、この駆動ポンプ１２は、図２に示されるように、本出願人によって既提案された構造（特願２００２－１６７８３６号等参照）が採用されており、流入ポート１５及び流出ポート１６が形成された略円錐状の外形をなす中空の上部構成体１７と、この上部構成体１７の下方に位置するとともに、略ドーム状の外形をなす中空の下部構成体１８と、これら各構成体１７，１８の内部空間Ｓ１，Ｓ２を仕切る可撓性のダイアフラム２０とを備えて構成されている。ここで、前記流入ポート１５は、上部構成体１７の周壁に連なる図２中右端側位置に設けられ、流出ポート１６は、上部構成体１７の頂部側となる図２中上端側位置に設けられている。

前記下部構成体１８には、吸送気装置１１に繋がる通気口２２が設けられており、下側の内部空間Ｓ２内には、圧縮空気が所定のタイミングで交互に吸送気されるようになっている。このように、内部空間Ｓ２内に圧縮空気が吸送気される

と、ダイアフラム２０の変形によって、上側の内部空間Ｓ１内の容積が増減し、これによって、流出ポート１６から吐出される各溶液に拍動流を生じさせる。この際、上側の内部空間Ｓ１内では、図２中破線で示されるように、流れの停滞域が発生し難い旋回渦流が発生するようになっている。なお、特に限定されるものではないが、本実施例においては、内部空間Ｓ２内に供給される空気の圧力（陽圧）は、１４０ｍｍＨｇ～２６０ｍｍＨｇ程度に設定される一方、内部空間Ｓ２内から吸引される空気の圧力（陰圧）は、－３０ｍｍＨｇ～－５０ｍｍＨｇ程度に設定される。

前記循環路１３は、図１に示されるように、駆動ポンプ１２の流出ポート１６から吐出した各溶液が、外気に非接触となる状態で流入ポート１５に流入する閉ループ状に設定されている。すなわち、循環路１３は、流出ポート１６から吐出した各溶液に流れ抵抗を付与する抵抗付与手段２３と、前記流出ポート１６に接続された上流側チューブ２４と、この上流側チューブ２４の下流側端部に接続された振幅調整手段としての調整チューブ２５と、この調整チューブ２５の下流側端部に接続された連結チューブ２６と、当該連結チューブ２６よりも下流側に配置され、且つ、駆動ポンプ１２の流入ポート１５に接続された下流側チューブ２７と、連結チューブ２６及び下流側チューブ２７の間に設けられた接続ポンプ２８とを備えて構成されている。なお、ここにおける各部材２４～２８の接続には公知のコネクタ２９が用いられている。また、以下においては、説明の便宜上、循環路１３のうち抵抗付与手段２３を境にして上流側を上流ラインＬ１と称し、同下流側を下流ラインＬ２と称する。

前記抵抗付与手段２３は、人体の末梢抵抗を想定して連結チューブ２６の途中一箇所に設けられたものであって、図示省略しているが、連結チューブ２６を締め付けるピンチ状部材により構成されている。つまり、抵抗付与手段２３による連結チューブ２６の締め付けにより、駆動ポンプ１２が拍動しても上流ラインＬ１内の最低血圧が０ｍｍＨｇとならず、人体の動脈内の血液の流れに擬似させるようになっている。ここで、連結チューブ２６の締め付け具合により、上流ラインＬ１内の平均脈圧を所定値に調整することができ、本実施形態では、当該平均脈圧として、人体の平均圧力に略相当する１００ｍｍＨｇ程度に調整されている

。なお、抵抗付与手段２３としては、前述したピンチ状部材の他に、前述した作用を奏する限りにおいて、可変絞り等他の部材を採用することもできる。

前記上流側チューブ２４、連結チューブ２６及び下流側チューブ２７は、特に限定されるものではないが、塩化ビニルによって形成されている。なお、後述するように、上流側チューブ２４の途中に、前記保持装置１０Ｂが設けられており、当該保持装置１０Ｂ内に保持された異種生体弁と下流側チューブ２７内に設けられた逆止弁３０とによって、前記各溶液を逆流させずに図１中矢印方向に確実に循環可能となっている。

前記調整チューブ２５は、抵抗付与手段２３よりも上流側に配置されて上流ラインＬ１の脈圧の振幅調整をするものである。すなわち、調整チューブ２５は、その肉厚を変えることで上流ラインＬ１における脈圧の振幅調整を行える軟質材料により形成されており、例えば、セグメント化ポリウレタンやシリコン等により形成されている。なお、本実施形態では、上流ラインＬ１における脈圧の振幅が、人体に近似するように、例えば、前記平均脈圧（１００ｍｍＨｇ）の±２０ｍｍＨｇとなるように設定されている。

前記接続ポンプ２８は、前記駆動ポンプ１２と同一の構成を備えた拍動流ポンプが用いられており、駆動ポンプ１２に対して同一若しくは同等の構成部分については同一符号を用いて説明を省略する。なお、接続ポンプ２８においても、流入ポート１５から各溶液が流入して当該溶液が流出ポート１６から排出される向きで取り付けられる。また、接続ポンプ２８の各通気口２２は外部に開放しており、各溶液の流れに応じて前記ダイアフラム２０が変位するようになっている。また、循環装置１０Ａ内に充填される溶液は、当該装置１０Ａが許容する最大充填量よりもやや少ない量となっており、接続ポンプ２８のダイアフラム２０の変位量は、物理的に許容される最大変位量よりも僅かに少なくなる。これによって、接続ポンプ２８は、その内部を血液が通過したときに、ダイアフラム２０の変位を許容して圧力損失を生じさせるダンパー効果が付与される。従って、接続ポンプ２８は、抵抗付与手段２３の下流側に配置されて下流ラインＬ２内の溶液の液圧を減衰させる脈圧減衰手段を構成することになる。本実施形態では、接続ポンプ２８を通過した血圧が、人体の左心房圧に相当する略１０ｍｍＨｇになるよ

うに設定されている。

なお、接続ポンプ２８を調整チューブ２５と連結チューブ２６との間に設けてもよい。

前記保持装置１０Ｂは、前記循環装置１０Ａ内を流れる溶液を導き、当該溶液に浸漬させた状態の異種生体弁を保持する装置である。本実施形態では、前記脱細胞化処理及び細胞播種処理を行う異種生体弁として、ブタの大動脈弁が適用されている。このため、保持装置１０Ｂは、人体の大動脈弁部分の血流状態に近い循環路１３の部位、すなわち、上流側チューブ２４の途中に接続されている。なお、以下においては、説明の便宜上、上流側チューブ２４のうち保持装置１０Ｂを境界として上流側を入口側チューブ２４Ａ、同下流側を出口側チューブ２４Ｂと称する。なお、保持装置１０Ｂは、処理対象となる生体組織毎に、当該生体組織を流れる血液の状態（圧力等）に近い循環路１３内の部位等を適宜選択して、自由に接続することができる。

この保持装置１０Ｂは、図３に示されるように、所定面Ｆに設置可能な平板状のベース３３と、このベース３３の上方に位置する装置本体３５と、ベース３３の左右両側に立設されて装置本体３５を支持する支持部材３６，３６とを備えて構成されている。

前記装置本体３５は、正面視六角形状をなす箱型のカバー３８と、このカバー３８の内部に設けられ、前記異種生体弁Ｖを保持する保持体３９と、この保持体３９を支持するとともに、カバー３８の内壁に沿って配置された平面視八角形状の枠部材４０と、カバー３８の背面側に設けられ、保持体３９に保持された異種生体弁Ｖに向かってマイクロ波を照射する照射装置４２（照射手段）と、枠部材４０の左右両側からカバー３８を貫通して各支持部材３６，３６方向に延びる支持軸４４，４４と、保持体３９に繋がる二本の導入チューブ４６及び排出チューブ４７とを備えて構成されている。

前記カバー３８は、図４に示されるように、所定形状の箱体を縦に二分したような構成となっており、手前側に位置する前カバー５１と、後部側に位置する後カバー５２とからなる。これら前カバー５１及び後カバー５２の突合せ部分は、前記支持軸４４，４４と交差する位置に形成されており、各突合せ部分の外縁側

には、当該外縁に略沿うフランジ面５４，５４がそれぞれ形成されている。これら各フランジ面５４，５４には、図示省略したボルト等の挿通穴５５が多数形成されており、各フランジ面５４，５４同士を面接触した状態で、前記ボルト等を使って前カバー５１及び後カバー５２を一体化できるようになっている。なお、その状態から前記ボルトを外せば、前カバー５１を後カバー５２から分離して取り外し可能となる。また、後カバー５２の内部中央付近には、前方に開放する枡型をなすマイクロ波の照射口５７が形成されている。この照射口５７は、前方の保持体３９（図１参照）に保持されている異種生体弁Ｖに略相対する位置に形成され、後側に設けられた前記照射装置４２からのマイクロ波が、照射口５７を通じて前方の保持体３９内の異種生体弁Ｖに照射されるようになっている。また、前カバー５１及び後カバー５２は、照射口５７から保持体３９に向かってマイクロ波が照射されたときに、当該マイクロ波が外部に漏出しないような形状及び構造となっている。なお、前カバー５１の前端側には、保持体３９の状態を透視可能とし、且つ、マイクロ波の外部への漏出を阻止可能な公知の材料の扉板５９が設けられている。

前記保持体３９は、図５に示されるように、同図中左右方向に延びるアクリル製の円筒部材６１と、この円筒部材６１の同図中右端側に位置する流入部６２と、同左端側に位置する流出部６３と、これら流入部６２及び流出部６３との間に位置する異種生体弁Ｖの設置空間６４とを備えて構成されている。この保持体３９では、後述するように、前記各溶液が流入部６２から円筒部材６１内に流入し、設置空間６４を通って流出部６３から外部に排出されるようになっている。

前記円筒部材６１は、延出方向両端側が開放しており、当該各開放部位に流入部６２及び流出部６３がセットされる。また、円筒部材６１の外周面には、設置空間６４に略相対する中央部分を除く全周に、アルミニウム薄板６６が貼り付けられている。このため、照射装置４２（図３参照）からのマイクロ波は、設置空間６４に略相対する円筒部材６１の周壁中央領域のみ透過し、当該領域内に前記マイクロ波を集中的に照射させることができるとともに、設置空間６４よりも外側に位置する部分の温度上昇を抑制することができる。

前記流入部６２は、図５及び図６に示されるように、円筒部材６１の外周面に

係合する端部材６８と、この端部材６８の内側に位置する流路形成部材６９とを備えている。

前記端部材６８は、図６中左側が開放する有底容器状に設けられており、同図中右端側に位置する底壁７１と、この底壁７１の周縁側に連なって当該底壁７１に対して略垂直方向（図６中左方）に延びる側壁７２とからなる。前記底壁７１は、その略中央に貫通穴７３が形成されている。前記側壁７２は、その開放側内周部分にねじ溝７４が形成されており、このねじ溝７４は、円筒部材６１の外周面に形成されたねじ溝７５に係合するようになっている。

前記流路形成部材６９は、図５～図７に示されるように、円錐に近似した形状をなす中空の円錐管７７と、この円錐管７７の内部に挿入される挿入管７８とからなる。

前記円錐管７７は、設置空間６４側に位置する円筒状の頂部７９と、この頂部７９から図６中右方に向かって次第に外側に拡開し、途中から同図中左右方向に延びる形状のスカート状部８０と、このスカート状部８０の図６中右端側に連なるフランジ状の裾部８１と、これら各部７９～８１の内側に形成されて、図６中左右方向に貫通する内部空間８３とを備えて構成されている。なお、以下において、流路形成部材６９に関する説明では、特に明記しない限り、「先端側」とは、円錐管７７の頂部７９側を意味し、「後端側」とは、円錐管７７の裾部８１側を意味する。

前記頂部７９の外周面には、一条のストッパ溝８５が周方向に沿って形成されている。このストッパ溝８５には、図５に示されるように、異種生体弁Ｖとしての大動脈弁を内部に含むブタの血管組織Ｂの端部側が被せられた上で、図示しない結束部材等でクランプされることで、血管組織Ｂにおける頂部７９からの離脱を規制可能となる。

前記スカート状部８０は、裾部８１側の領域の外径が円筒部材６１の内径と略同一に設定されており、裾部８１側の領域が円筒部材６１内に略ぴったりと収容されるようになっている。

前記裾部８１は、円環状に設けられ、その外径が端部材６８の側壁７２の内径と略同一に設定されることで、端部材６８内に略ぴったりと収容されるようにな

っている。また、裾部８１の内周面には、ねじ溝８７が形成されている。

前記内部空間８３は、図６中右端側が開放し、当該開放部分から挿入管７８の先端側が挿入される基部空間８９と、この基部空間８９に連通して先端側に形成された開放部９０に延びる主流路９１と、この主流路９１の周囲四箇所に設けられるとともに、基部空間８９に連通する副流路９２とを備えて構成されている。前記基部空間８９は、挿入管７８の先端形状に沿った内部形状に設けられて当該挿入管７８を略ぴったりと受容できるようになっている。前記主流路９１は、特に限定されるものではないが、頂部７９側から内部に向かって次第に内径が小さくなるテーパ穴状に形成されている。前記副流路９２は、図７に示されるように、スカート状部８０の傾斜面上において、略等間隔となる周方向四箇所位置で開放するようになっている。なお、本実施形態では、これら副流路９２の開口面積を総合した総開口面積が主流路９１の開口面積と略同一に設定されている。

前記挿入管７８は、図６に示されるように、球面状の外形をなす先端側の球面状部９４と、この球面状部９４よりも小さな外径を有し、当該球面状部９４に段差を介して連なる円筒状部９５と、この円筒状部９５の外周面に相対回転可能に挿通された外筒部９６と、この外筒部９６の後端側に連なるとともに、端部材６８の貫通穴７３の内径よりも小さな外径を有する円環状の鍔部９７と、球面状部９４及び円筒状部９５の内部に形成された内部空間９９とを備えて構成されている。前記外筒部９６の外周面には、ねじ溝１０１が形成されており、このねじ溝１０１は、前記裾部８１の内周部分に形成されたねじ溝８７に係合し、これによって、挿入管７８が円錐管７７に取り付けられる。

前記内部空間９９は、前記各溶液が通過する基部流路１０３と、この基部流路１０３に連通して球面状部９４の先端側で開放する先端穴１０４と、当該先端穴１０４の周囲四箇所に設けられるとともに、基部流路１０３に連通する側穴１０５とからなる。前記先端穴１０４は、挿入管７８の先端側が円錐管７７の内部空間８３内に受容されると、主流路９１に常時連通するようになっている。前記側穴１０５は、球面状部９４の表面上において、略等間隔となる周方向四箇所位置で開放するようになっている。これら側穴１０５は、挿入管７８が円錐管７７内に受容されたときに、それらの相対回転により、すべての副流路９２に完全に連

通する位置（最大連通位置）から、すべての副流路９２に対して完全に遮断する位置（遮断位置）まで回転変位可能となっている。従って、前記挿入管７８は、全ての副流路９２から流出する各溶液の総流量を、主流路９１から流出する各溶液の流量に略同一とする位置から、全ての副流路９２から流出する溶液の総流量を略ゼロにする位置まで、副流路９２から流出する各溶液の流量調整を可能とする可変絞り弁と同等の機能を有する。

前記流出部６３は、図５、図８及び図９に示されるように、前記流入部６２に対し、一部形状が異なるものの実質的に同一となる構成要素を備え、略同一の作用を奏するようになっている。

従って、以下では、流入部６２と同一若しくは同等の流出部６３の構成要素に対し、同一符号を用いて説明を省略若しくは簡略にし、流入部６２との相違点のみについて補足説明する。

流出部６３の端部材６８は、ナット状に設けられており、その略中央に図８中左右方向に貫通するねじ穴１０７が形成されている。

流出部６３の円錐管７７は、スカート状部８０に連なる裾部８１の形状が流入部６２に対して相違する。すなわち、ここでの裾部８１は、スカート状部８０の最大外径よりも小さな外径をなすねじ筒状に形成されており、その外周部分が、端部材６８のねじ穴１０７が係合するようになっている。また、円錐管７７には、図示しない温度センサ等を挿通させるための案内路１０９が形成されている。この案内路１０９は、内部空間８３の外側に形成されており、裾部８１の後端側からスカート状部８０の傾斜面に貫通する第１の案内路１０９Ａと、この第１の案内路１０９Ａの途中から主流路９１に向かって延びる第２の案内路１０９Ｂとからなる。なお、これら案内路１０９Ａ，１０９Ｂの全部若しくは何れか一方を省略することも可能である。

流出部６３の挿入管７８は、その全体形状が流入部６２に対して相違する。すなわち、ここでの挿入管７８は、前記球面状部９４の代わりに、円筒状部９５が先端側に向かって延設されたような形状に設けられている。ここで、前記先端穴１０４は、円筒状部９５の先端側に設けられ、前記側穴１０５は、円筒状部９５の先端側の外周面四箇所に周方向に略等間隔で設けられている。

なお、図５、図６及び図８中、黒塗りの部材は、シール用のＯリングである。

前記枠部材４０は、図３に示されるように、その内側で保持体３９を回転可能に支持するようになっている。すなわち、各端部材６８，６８の略中央から外側に突出した前記各挿入管７８，７８は、管ナット１１１，１１１を介して回転管１１２，１１２に連結されるようになっている。当該回転管１１２，１１２は、枠部材４０の一部に取り付けられた図示しないベアリング内を通って枠部材４０の外方にそれぞれ突出するようになっている。ここで、保持体３９は、枠部材４０の内側で、各回転管１１２，１１２が図３中斜め４５度方向に延出する向きで取り付けられており、回転管１１２，１１２を中心として回転（自転）可能となる。ここで、枠部材４０の外面のうち、図３中右上の流出部６３側の回転管１１２が突出する部位近傍には、モータ、歯車等からなる自転用駆動手段１１４が設けられ、当該自転用駆動手段１１４の作動によって、保持体３９が枠部材４０の内側で自転するようになっている。また、各回転管１１２，１１２は、枠部材４０側に固定された回転継手１１５を介して、導入チューブ４６、排出チューブ４７にそれぞれ接続されている。ここでの回転継手１１５は、接続対象となる二つの管状部材（回転管１１２，１１２とチューブ４６，４７）を相対回転可能に連結して当該管状部材の内部を連通させる公知の継手が用いられている。これにより、自転用駆動手段１１４の作動によって各回転管１１２，１１２が回転されても、当該回転力が各チューブ４６，４７に伝達されないようになっている。

前記照射装置４２は、マイクロ波の発生源として図示しないマグネトロンを利用した公知の装置であり、ここでは詳細な説明を省略する。

前記支持軸４４は、中空のパイプ状をなし、その内部に導入チューブ４６及び排出チューブ４７の端部が収容されるようになっている。すなわち、支持軸４４，４４の外周面のうち、各支持部材３６，３６の内側近傍に位置する部位に、スロット穴１１７が形成されており、当該スロット穴１１７に、各回転管１１２，１１２から延びる各チューブ４６，４７が収容されるようになっている。

前記支持部材３６は、支持軸４４，４４を回転可能に支持する内側の第１支持部１２０と、この第１支持部１２０の外側に設けられ、前述した回転継手１１５と同様の構造の回転継手１２１を支持する継手支持部１２２とにより構成されて

いる。ここで、図３中左側の支持部材３６に支持された回転継手１２１は、同左側の支持軸４４の内部に挿入された排出チューブ４７と前記出口側チューブ２４Ｂとを相対回転可能に接続するようになっている。一方、図３中右側の支持部材３６に支持された回転継手１２１は、同右側の支持軸４４の内部に挿入された導入チューブ４６と前記入口側チューブ２４Ａとを相対回転可能に接続するようになっている。更に、図３中右側の支持部材３６には、モータ、歯車等からなる公転用駆動手段１２４が設けられており、当該公転用駆動手段１２４の動作によって、各支持軸４４，４４を回転させることができるようになっている。このように、各支持軸４４，４４が回転すると、当該支持軸４４，４４回りに枠部材４０とともに保持体３９が回転（公転）する。なお、支持軸４４に収容される導入チューブ４６及び排出チューブ４７は、前記公転時にベース３３に干渉しないように、当該ベース３３と支持軸４４との間の空間内を通過するような長さ及び配置となっている。このような公転によって、図１０に示されるように、同図中（Ａ）の状態から支持軸４４が１８０度回転（半回転）すると、同（Ｂ）に示されるように、枠部材４０が回転して保持体３９の上下両側が反転することになる。つまり、保持体３９は、前述した自転用駆動手段１１４による自転動作の他に、公転用駆動手段１２４による公転動作も可能で、当該公転動作時には、保持された血管組織Ｂの上下両側を反転させる方向に回転する。なお、図３中符号１２５は、公転用駆動手段１２４の作動スイッチである。また、溶液の温度上昇を抑制するために、導入チューブ４６の周囲を冷却する冷却手段を設けてもよい。

次に、以上のように構成された保持装置１０Ｂに対する異種生体弁Ｖのセット手順と当該セット時の保持装置１０Ｂの作用について説明する。

先ず、図３の状態から、回転管１１２と回転継手１１５の接合部位を外した上で、保持体３９に対して管ナット１１１を回転移動させることで保持体３９を回転管１１２，１１２から取り外し、各端部材６８，６８を外して、流入部６２及び流出部６３を円筒部材６１から取り出す。そして、図５に示されるように、流入部６２及び流出部６３の各頂部７９，７９を相対させた状態で、当該各頂部７９，７９に大動脈弁Ｖを含むブタの血管組織Ｂの両端側を嵌め込み、ストッパ溝８５，８５上で図示省略した結束部材を使ってそれぞれクランプする。ここでは

、血管組織Ｂが、一方向弁である大動脈弁Ｖにより、図５中右から左への各溶液の流れを許容する向きでセットされる。その後、血管組織Ｂを介して相互に連結された流入部６２及び流出部６３を再び円筒部材６１の中に戻し、当該円筒部材６１に各端部材６８，６８を取り付け、図３に示されるように、保持体３９を再び回転管１１２，１１２に取り付けて血管組織Ｂのセットが完了する。

次に、脱細胞化処理を行う場合、前記細胞除去溶液が導入チューブ４６側から回転管１１２を通って流入部６２の挿入管７８内に供給される。この際、図５に示されるように、流入部６２及び流出部６３の双方において、挿入管７８，７８は、その側穴１０５と円錐管７７の副流路９２とが完全に連通する位置にある。すると、流入部６２側に供給された細胞除去溶液は、当該流入部６２の先端穴１０４及び主流路９１を通って血管組織Ｂ内に入り、その内部の大動脈弁Ｖを通過して流出部６３の主流路９１に送り込まれる他、それと略同一の流量で、流入部６２の側穴１０５及び副流路９２を通って、血管組織Ｂの外側をバイパスするように円筒部材６１の内部空間から流出部６３の副流路９２に送り込まれる。そして、流出部６３の主流路９１及び副流路９２に流れた細胞除去溶液は、流出部６３の挿入管７８内から図３の回転管１１２を通って排出チューブ４７側に排出される。従って、流入部６２及び流出部６３にそれぞれ設けられた主流路９１及び先端穴１０４は、管状の生体組織（血管組織Ｂ）の内側を介して連通する第１の流路を構成し、流入部６２及び流出部６３にそれぞれ設けられた副流路９２及び側穴１０５は、前記生体組織（血管組織Ｂ）の外側を介して連通する第２の流路を構成することになる。

また、以上の脱細胞化処理を行う場合には、前記照射装置４２及び自転用駆動手段１１４が作動し、保持体３９に保持された血管組織Ｂに向かってマイクロ波を照射しながら、保持体３９を自転させる。これによって、血管組織Ｂの周方向全域に亘ってムラ無く脱細胞化処理を行うことが可能になる。この際、第１及び第２の案内路１０９Ａ，１０９Ｂ（図５等参照）に図示しない温度センサを挿入し、血管組織Ｂの内外における溶液温度を計測しながら行うとよい。すなわち、この場合には、血管組織Ｂの内外両側で温度差が生じないように、当該内外両側で細胞除去溶液が略同一流量で流れるが、第１及び第２の案内路１０９Ａ，１０

９Ｂに図示しない温度センサを挿入することで、前記内外両側で温度差が生じていないかの確認を行うことができる。なお、照射装置４２は、前記内外両側の温度が人間の体温程度（例えば、３７℃）より上昇したときに、マイクロ波の照射を自動停止する一方、前記体温程度より下降したときに、マイクロ波の照射を自動的に開始するようになっている。また、本実施形態の照射装置４２は、周波数が２．４５ＧＨｚ、出力が０Ｗ～１２００Ｗ程度のマイクロ波を照射可能となるものを用いている。なお、温度センサは、排出チューブ４７の途中に形成した穴から前記第１の流路内に導くように配置してもよい。

一方、前記細胞播種処理を行う場合には、照射装置４２によるマイクロ波の照射及び保持体３９の自転が停止する。そして、保持体３９内の各挿入管７８，７８は、図５の状態から、鍔部９７を回転して緩めた上で、円筒状部９５を回転することで、側穴１０５（図５等参照）と副流路９２とが完全に遮断する位置に変えられる。以上のようにした後、前記細胞含有溶液が流入部６２の挿入管７８内に供給され、流入部６２の先端穴１０４及び主流路９１を通って血管組織Ｂ内に入り、その内部の大動脈弁Ｖを通過して流出部６３の主流路９１に送り込まれ、流出部６３の挿入管７８側から排出される。この際、各挿入管７８，７８が前記遮断位置にあるため、前述の脱細胞化処理の時と異なり、血管組織Ｂの外側には、細胞含有溶液が全く流れない。

また、以上の細胞播種処理を行う場合には、図３の公転用駆動手段１２４が作動して、保持体３９が枠部材４０とともに支持軸４４，４４回りに回転し、これにより、保持体３９は、図１０に示されるように、天地を逆転する方向に回転される。このような保持体３９の公転により、重力の影響を排して、細胞含有溶液中の自己細胞を血管組織Ｂにムラ無く付着させることができる。

次に、前記生体組織処理装置１０を使った脱細胞方法及び細胞播種方法について図１等を用いて説明する。

先ず、ブタ等の動物から大動脈弁Ｖを含む血管組織Ｂを採取する。そして、前述したように、当該血管組織Ｂを保持装置１０Ｂにセットして、生体組織処理装置１０内に細胞除去溶液を注入し、当該細胞除去溶液を循環させる。ここで、細胞除去溶液として、例えば、デオキシコール酸（胆汁酸）、ドデシル硫酸ナトリ

ウム（ＳＤＳ）、トリトンＸ－１００等の界面活性剤が用いられる。このとき、生体組織処理装置１０内では、次のようにして、細胞除去溶液が人体の血流に近似した流れの状態で循環することになる。

図示しない所定のスイッチを投入すると、図１の吸送気装置１１が作動し、駆動ポンプ１２の拍動によって、循環路１３内を細胞除去溶液が循環する。すなわち、駆動ポンプ１２から吐出した細胞除去溶液は、人体の一般的な大動脈圧に略相当する圧力で上流ラインＬ１内を流れ、当該上流ラインＬ１の途中に設けられた保持装置１０Ｂ内を通って、人体の末梢抵抗に相当する抵抗付与手段２３に達する。そして、当該抵抗付与手段２３を通過した細胞除去溶液は、接続ポンプ２８を通過した後、人体の左心房圧に略相当する略１０ｍｍＨｇの圧力となって駆動ポンプ１２に流入する。

この際、保持装置１０Ｂでは、保持体３９に保持された血管組織Ｂの内外両側を流れる細胞除去溶液は、人体の大動脈内を流れる血流に略相当する流れが付与されるとともに、前述したように、保持体３９の自転により、血管組織Ｂを回転させながらマイクロ波が照射される。これにより、動物から採取した血管組織Ｂは、各種の原細胞（内皮細胞、線維芽細胞、平滑筋細胞）が除去され、コラーゲン等からなる基質のみになる。なお、本実施形態では、照射するマイクロ波の条件を、周波数２．４５ＧＨｚ、出力１００Ｗ～５００Ｗ程度としているが、本発明は、これに限らず、血管組織Ｂに対し、人体に影響を与える変性を生じさせず、且つ、所定の脱細胞効果が得られる限りにおいて、出力を所定の範囲内で変えることができるとともに、他の周波数の電磁波、音波等を照射することも可能である。また、細胞除去溶液に付与される流れとしては、人体の血流に擬似しない拍動流としてもよい。

そして、生体組織処理装置１０内から細胞除去溶液を排出した後、当該生体組織処理装置１０内に生理食塩水を注入し、当該生理食塩水を循環させることで装置１０内を洗浄し、生体組織処理装置１０内から生理食塩水を排出する。そして、フィブロネクチン等の結合剤を保持体３９内の前記第１の流路内に直接注入し、流入部６２、流出部６３の開放端側をそれぞれ閉塞することで、保持体３９に保持された脱細胞化後の血管組織Ｂを所定時間結合剤に浸漬させる。その後、結

合剤を保持体３９内から外部に排出し、保持体３９内に前記細胞含有溶液を注入する。ここで、細胞含有溶液は、移植対象者の自己細胞（内皮細胞、線維芽細胞、及び／又は平滑筋細胞）を採取して、所定時間培養し、所定の培養液を添加することで得られる。この培養液としては、細胞播種処理に使用可能な培養液であれば何でも良く、Ｍ１９９（Ｍｅｄｉｕｍ１９９培地　Ｌｉｆｅ　Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ製）を例示できる。そして、結合剤の場合と同様にして、脱細胞化後の血管組織Ｂを細胞含有溶液に所定時間浸漬させてから、循環装置１０Ａを作動させ、生体組織処理装置１０内に、人体の血流に略相当する流れで細胞含有溶液を循環させる。これによって、人体の大動脈内を流れる血液と略相当する流れの細胞含有溶液中に、脱細胞化後の血管組織Ｂが置かれ、当該血管組織Ｂに自己細胞が播種されることになる。ここで、公転用駆動手段１２４（図３参照）は、循環装置１０Ａによる拍動流生成前に作動することで、細胞含有溶液に浸漬された状態の血管組織Ｂが上下方向に回転し、これにより、細胞含有溶液が重力の影響を排して血管組織Ｂの略全域でムラ無く付着される。なお、このような公転動作は、細胞含有溶液の拍動流生成時に引き続き行ってもよい。

従って、このような実施形態によれば、従来の処理方法よりも、脱細胞化効果及び細胞播種効果を大幅に高めることができるばかりか、血管組織Ｂを保持体３９に保持させたままで、脱細胞化処理及び細胞播種処理を一連の作業で行うことができ、移植に伴う異種生体弁の加工処理を簡単且つ短時間で行うことができるという効果を得る。しかも、このような一連の処理作業を一つの密閉回路で行うことができ、前記異種生体弁の汚染を防止して、清潔性を保つことができるという効果をも得る。

次に、本発明者らは、本発明に基づく脱細胞効果及び細胞播種効果を実証するための実験を行った。

（１）脱細胞効果の実験

［実施例１］

実施例１では、細胞除去溶液として、３７℃の胆汁酸を用いた。そして、この胆汁酸を循環装置１０Ａ内に注入し、人間の大動脈内での血液の流れ（拍動流）に略相当する状態の流れを胆汁酸に付与し、その流れの中で、大動脈弁を含むブ

タの血管組織を２４時間放置した。このときの循環装置１０Ａの条件は、平均流量を毎分５リットルとし、駆動ポンプ１２の拍動数を毎分７０回とし、胆汁酸の最高液圧、最低液圧を、人間の一般的な最高脈圧、最低脈圧に略相当させて平均液圧を約９０ｍｍＨｇとした。そして、処理後の血管組織を電子顕微鏡で拡大した状態で撮像し、血管組織に残存する原細胞（内皮細胞及び線維芽細胞）の単位面積（１ｍｍ^2）当りの平均数をカウントした。

その結果、図１１に示されるように、原細胞は、前記単位面積当り約８５０個残存した。

［実施例２］

実施例２では、前記実施例１の条件に加え、前記保持装置１０Ｂを使って血管組織を回転させながら所定のマイクロ波を照射した。ここでは、周波数が２．４５ＧＨｚのマイクロ波を使い、出力及び照射時間の三通りの組み合わせについて行った。すなわち、出力１００Ｗで８時間照射した場合、出力５００Ｗで１２時間照射した場合、及び出力５００Ｗで２４時間照射した場合について行った。また、何れの場合も、血管組織の回転速度（自転速度）を毎分４回転とした。そして、実施例１の場合と同様に、血管組織に残存する原細胞の単位面積（１ｍｍ^2）当りの平均数をカウントした。

その結果、図１１に示されるように、出力１００Ｗ、８時間照射の場合は、原細胞が前記単位面積当り約３８０個残存した。一方、出力５００Ｗ、１２時間照射の場合、及び出力５００Ｗ、２４時間照射の場合は、何れも原細胞の残存が見られなかった。また、原組織に含有されているタンパク質は略除去された。一方何れの場合も、コラーゲン、エラスチンには障害が略見られなかった。

［比較例１］

以上の実施例１，２に対する比較例としては、所定の容器内に入れられた流れのない胆汁酸に、前記血管組織を２４時間浸漬させた。そして、実施例１等の場合と同様に、血管組織に残存する原細胞の単位面積（１ｍｍ^2）当りの平均数をカウントした。

その結果、図１１に示されるように、原細胞は、前記単位面積当り約９７０個残存した。

なお、以上の実施例１，２及び比較例１で用いた血管組織は、脱細胞化処理前の初期状態で、原細胞が単位面積（１mm^2）当り約１８８０個存在していた。

以上の結果、実施例１，２の方が、比較例１よりも原細胞が大幅に除去され、高い脱細胞効果が得られることが理解されよう。特に、拍動流下の胆汁酸に血管組織を浸漬させたのみの場合（実施例１）よりも、更にマイクロ波を照射した場合の方が、より高い脱細胞効果が得られ、出力を１００Wから５００Wとすると原細胞が残存しなくなる。なお、今回、説明を省略しているが、流れのない胆汁酸に浸漬された血管組織に、前述のマイクロ波を与えることもでき、この場合にあっても、比較例１よりも高い脱細胞効果が得られる。

（２）細胞播種効果の実験

［実施例３］

実施例３では、先ず、脱細胞化処理後の血管組織に対し、生理食塩水を使って１時間程度洗浄してから、フィブロネクチンに４時間浸漬させた。それと前後して、移植対象の生体から自己細胞（内皮細胞）を採取して細胞含有溶液を生成した。ここでの細胞含有溶液は、採取した自己細胞を、前記Ｍ１９９を使って培養皿上で５日間培養した後、培養された自己細胞をトリプシンによって培養皿から剥がし、Ｍ１９９に含有させることで得られた。ここで、培養時には、前記Ｍ１９９に、ＦＢＳ（Ｆｅｔａｌ　Ｂｏｖｉｎｅ　Ｓｅｒｕｍ　ＩＷＫ－５００、Ｉｗａｋｉ製）、抗生物質（ペニシリン／ストレプトマイシン混液）、及びＦＧＦ－２（Ｐｅｐｒｏ　Ｔｅｃｈ　Ｅｃ　Ｌｔｄ製）を添加した。

その後、前記細胞含有溶液に血管組織を約４時間浸漬させながら、当該血管組織を上下方向に回転させた。そして、細胞播種処理後の血管組織を電子顕微鏡で拡大した状態で撮像し、血管組織に播種された自己細胞（内皮細胞）の状態を観察した。

その結果、図１２に示されるように、自己細胞が血管組織の略全域に播種された。なお、ここでは、自己細胞が、血管組織の単位面積（１mm^2）当り、平均約８５０個付着した。また、血管組織の単位面積（１mm^2）に対する自己細胞の面積比（密度）は、平均約１８％であった。

［実施例４］

実施例４では、前記実施例３と同様の工程を経た後、実施例１と同様の流れ条件により、前記細胞含有溶液を循環装置１０Ａ内で循環させた。

具体的に、流れのない細胞含有溶液に血管組織を静止状態で約４８時間浸漬させた後で、当該血管組織を上下方向に約４時間回転させた。そして、当該細胞含有溶液に人間の大動脈内での血流に略相当する状態の流れを付与し、その流れの中に血管組織を１時間放置した。その後、実施例３の場合と同様に、血管組織に播種された自己細胞の状態を観察した。

その結果、図１３に示されるように、自己細胞が血管組織の略全域に亘って均等に播種されている他、細胞含有溶液の流れ方向に自己細胞が規則正しく配列され、実施例３よりも自己細胞が増殖して高密度になった。なお、ここでは、自己細胞が、血管組織の単位面積（１mm^2）当り、平均約２１７０個付着した。また、血管組織の単位面積（１mm^2）に対する自己細胞の面積比（密度）は、平均約６３％であった。

［実施例５］

実施例５は、前記実施例４に対し、細胞含有溶液中の血管組織の静止と、当該血管組織の上下方向の回転とを逆順で処理したものである。すなわち、本実施例では、細胞含有溶液に浸漬された血管組織を上下方向に約４時間回転させた後で、当該血管組織を細胞含有溶液に静止状態で４８時間浸漬させてから、当該細胞含有溶液に人間の大動脈内での血流に略相当する状態の流れを付与し、その流れの中に血管組織を１時間放置した。その他の条件は、前記実施例４と同様とした。そして、実施例４の場合と同様に、血管組織に播種された自己細胞の状態を観察した。

その結果、実施例４の場合と同様に自己細胞が増殖して高密度になった他、実施例４の場合よりも、自己細胞が全体的にムラなく播種された。

［実施例６］

実施例６では、前記実施例５に対して、当該実施例５と同一条件の細胞含有溶液の流れ中に血管組織を放置する時間を４８時間とした。その他の条件は、実施例５と同一にした。

その結果、播種した細胞が増殖して血管組織の略全面を覆うようになった。

［実施例７］

実施例７は、前記実施例６に対して、細胞含有溶液の流れ条件を変えたものであり、その他の条件は実施例６と同一にした。すなわち、本実施例では、細胞含有溶液の平均流量を毎分２リットルとし、細胞含有溶液の平均液圧を約２０ｍｍＨｇとした。

その結果、実施例６と略同様の効果が得られた。つまり、本発明の細胞播種方法を用いれば、移植先患者の血流等の状態や移植先の心臓弁の部位を考慮して、細胞含有溶液の流れ条件を変えたとしても、播種された自己細胞が増殖して血管組織のほぼ全面を覆うようになる。総じて、体内を循環する血液の量が異なる大人や子供、使用される血圧が異なる各種心臓弁等においても、その使用状態に合わせた最適な生体弁を作成することができる。

［比較例２］

以上の実施例３～７に対する比較例としては、実施例３に対して、血管組織を上下方向に回転せずに静止状態とした。そして、実施例３等の場合と同様に、血管組織に播種された自己細胞の状態を観察した。

その結果、血管組織に播種された自己細胞にムラが見られ、それによって、血管組織に播種された自己細胞の数も前記実施例３～７の場合に比べ大幅に減少した。

以上の結果、実施例３～７の方が、比較例２よりも自己細胞が大幅に多く付着し、高い細胞播種効果が得られた。特に、拍動流下の細胞含有溶液に血管組織を浸漬させると、細胞の配向性が良好となり、細胞の活性化等によって細胞の機能をより発揮させ、より多くの細胞播種が可能となる。

なお、本発明にあっては、前記実施形態で説明した大動脈弁を含む血管組織の他に、血液が接触するその他の生体組織に対する細胞播種処理にも適用可能である。また、異種生体弁に対する処理の他に、同種生体弁に対する処理にも本発明を適用できる。

また、本発明に係る細胞播種方法は、前記実施形態での生体組織処理装置１０の利用が必須ではなく、同様の手法で細胞播種処理を行える限りにおいて、種々の装置や手段を用いて行うことができる。要するに、細胞播種処理時に、生体組

織を浸漬させる溶液に対し、人体の血流に略相当する流れを付与し、及び／又は、上下方向に反転する方向に生体組織を回転させる限り、使用する装置は何でも良い。

以上説明したように、本発明によれば、異種生体弁等の生体組織に、移植先の生体細胞を付着させ易くすることができ、移植後における生体組織の生体適合性を高めることができる

産業上の利用可能性

本発明は、人間を含む動物から採取した生体弁を所定の人体に移植可能に加工することに利用できる。

請求の範囲

1．所定の生体組織を移植する際に、当該移植先の生体細胞を含む細胞含有溶液に前記生体組織を浸漬し、当該生体組織に前記生体細胞を付着させる細胞播種方法であって、

前記細胞含有溶液に対し、移植先の生体の血流に略相当する流れを付与し、当該流れの中に前記生体組織を置くことを特徴とする細胞播種方法。

2．所定の生体組織を移植する際に、当該移植先の生体細胞を含む細胞含有溶液に前記生体組織を浸漬し、当該生体組織に前記生体細胞を付着させる細胞播種方法であって、

前記細胞含有溶液に浸漬された生体組織を、その上下両側が反転する方向に回転させることを特徴とする細胞播種方法。

3．所定の生体組織を移植する際に、当該移植先の生体細胞を含む細胞含有溶液に前記生体組織を浸漬し、当該生体組織に前記生体細胞を付着させる細胞播種方法であって、

前記細胞含有溶液中で前記生体組織を所定時間静止させた後、前記細胞含有溶液に浸漬された生体組織を、その上下両側が反転する方向に回転させ、その後、前記細胞含有溶液に対し、移植先の生体の血流に略相当した流れを付与し、当該流れの中に前記生体組織を置くことを特徴とする細胞播種方法。

FIG.1

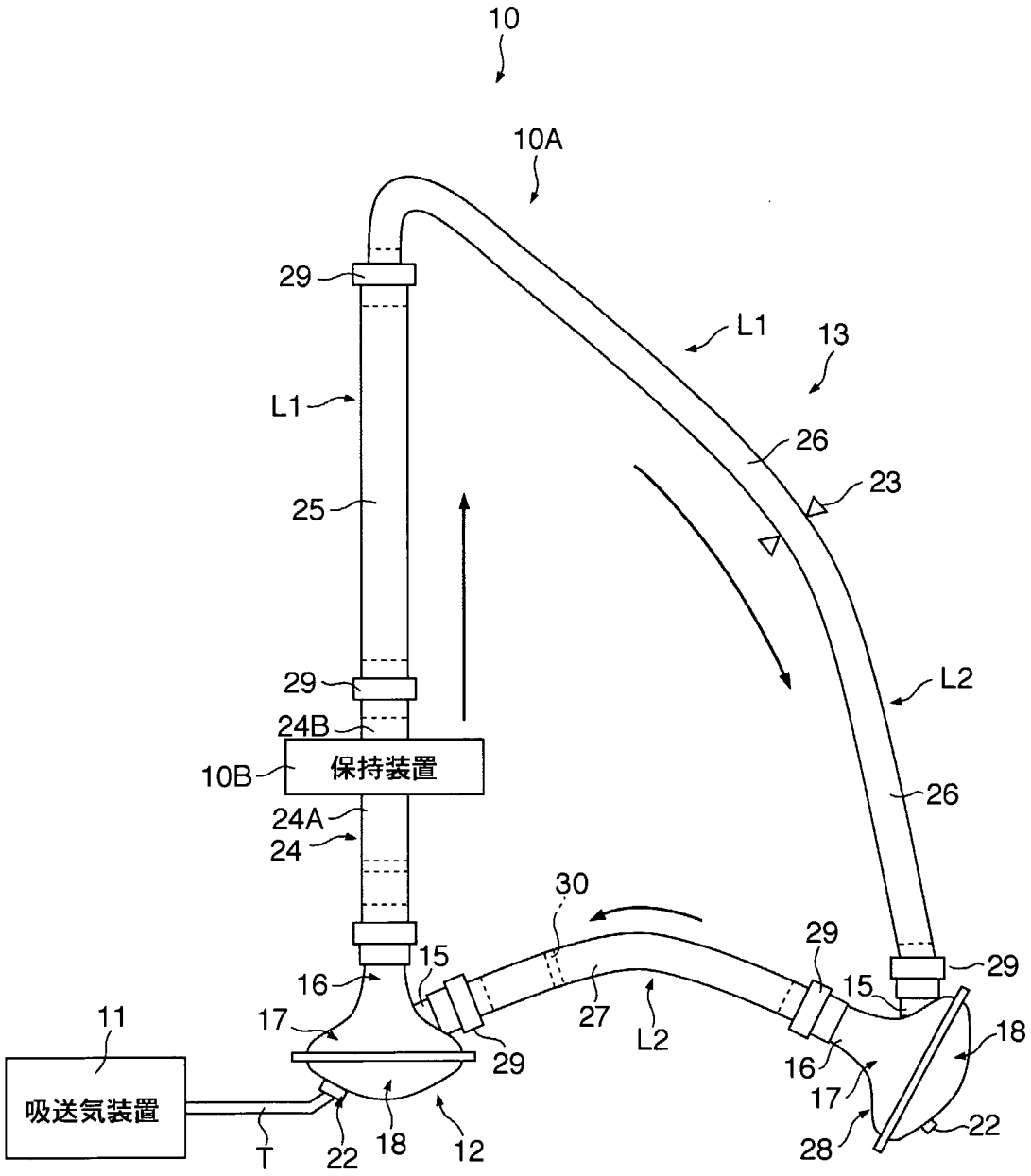

10
10A
29
L1
13
L1
26
23
25
29
L2
24B
10B
保持装置
26
24A
24
30
29
15
16
15
29
11
17
27
L2
18
29
16
17
吸送気装置
28
22
T
22
18
12

FIG.2

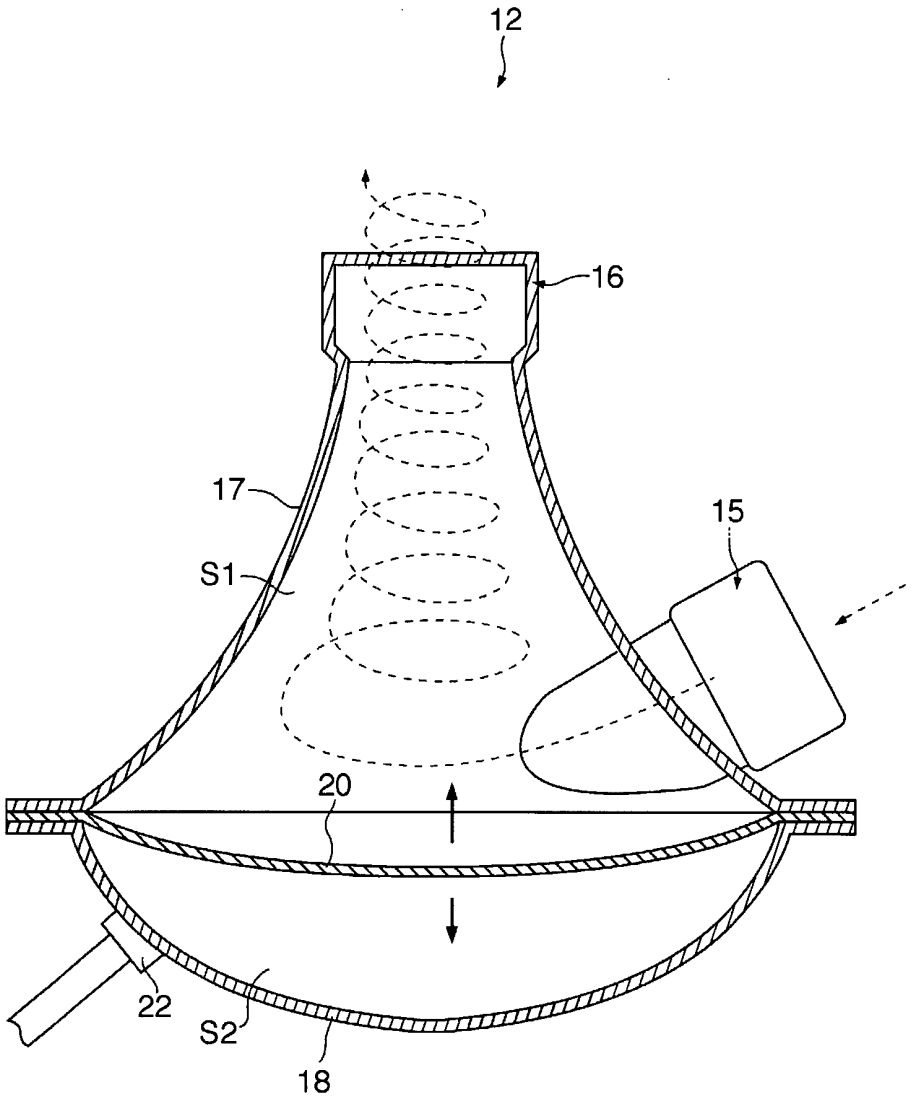


FIG.3

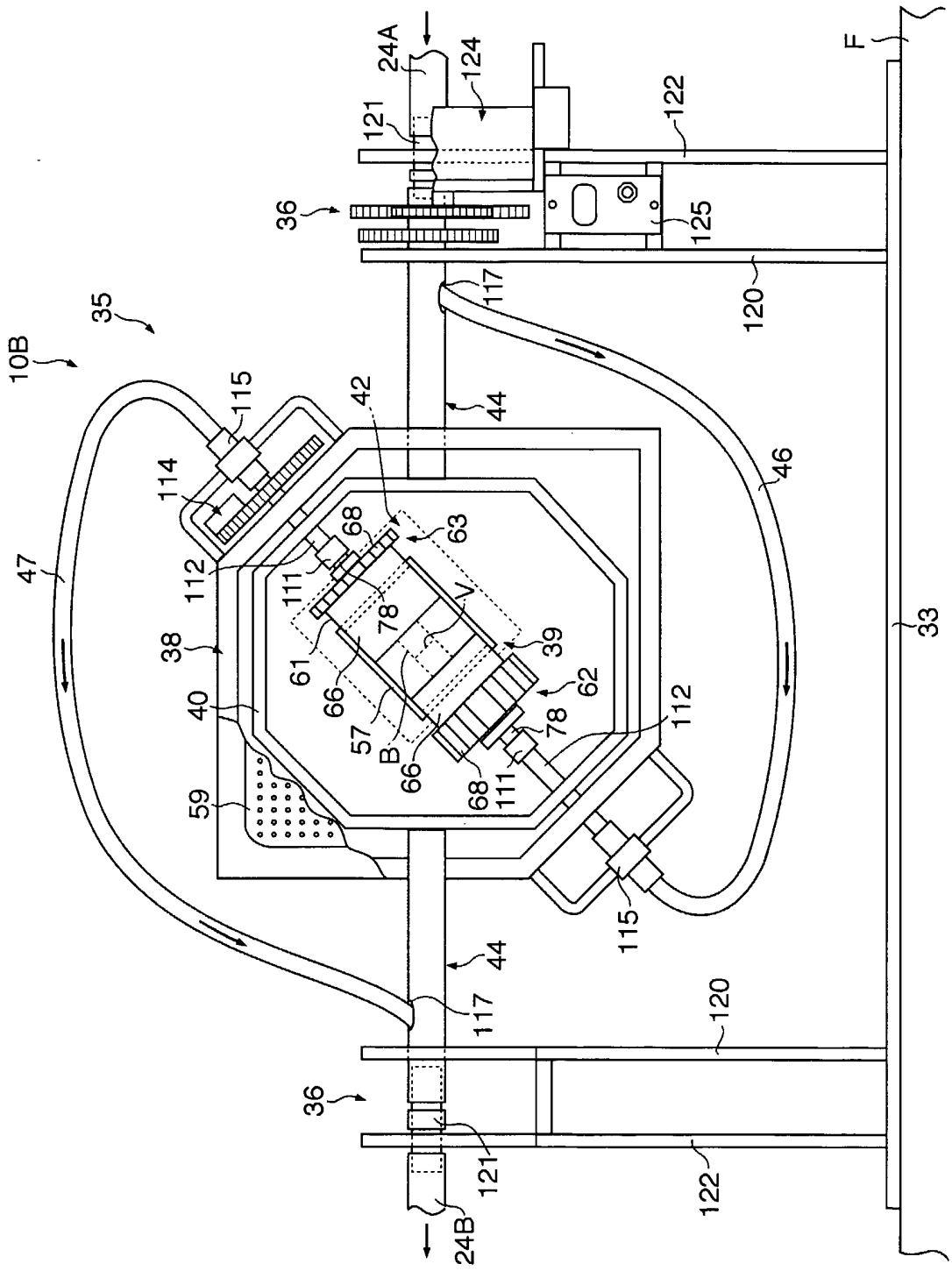

F
24A
124
121
122
36
125
35
10B
117
120
115
42
44
114
46
68
63
47
112
111
78
V
38
39
61
62
66
40
57
B
112
59
68
111
78
115
44
117
120
36
121
122
24B

FIG.4

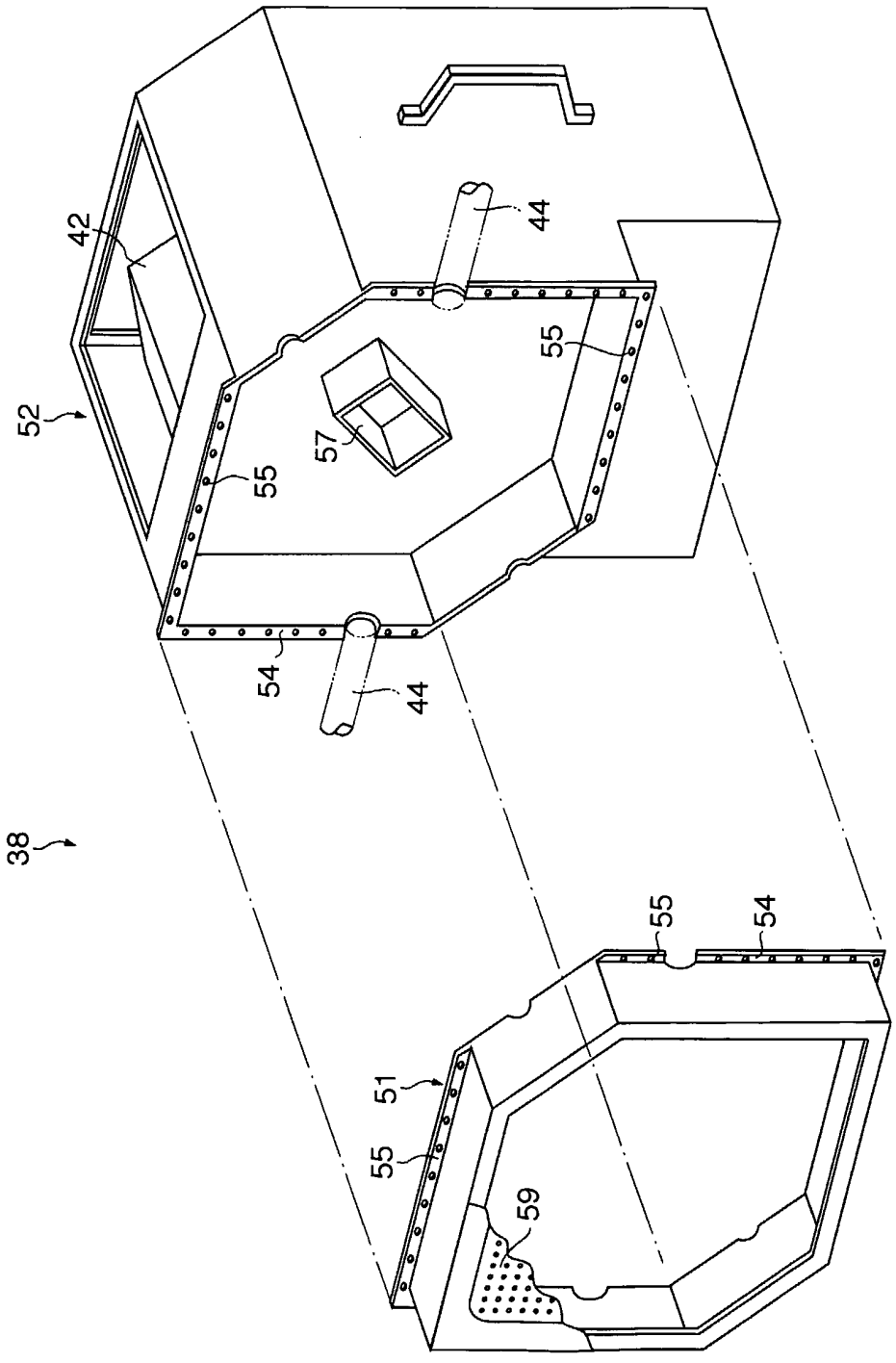


FIG.5

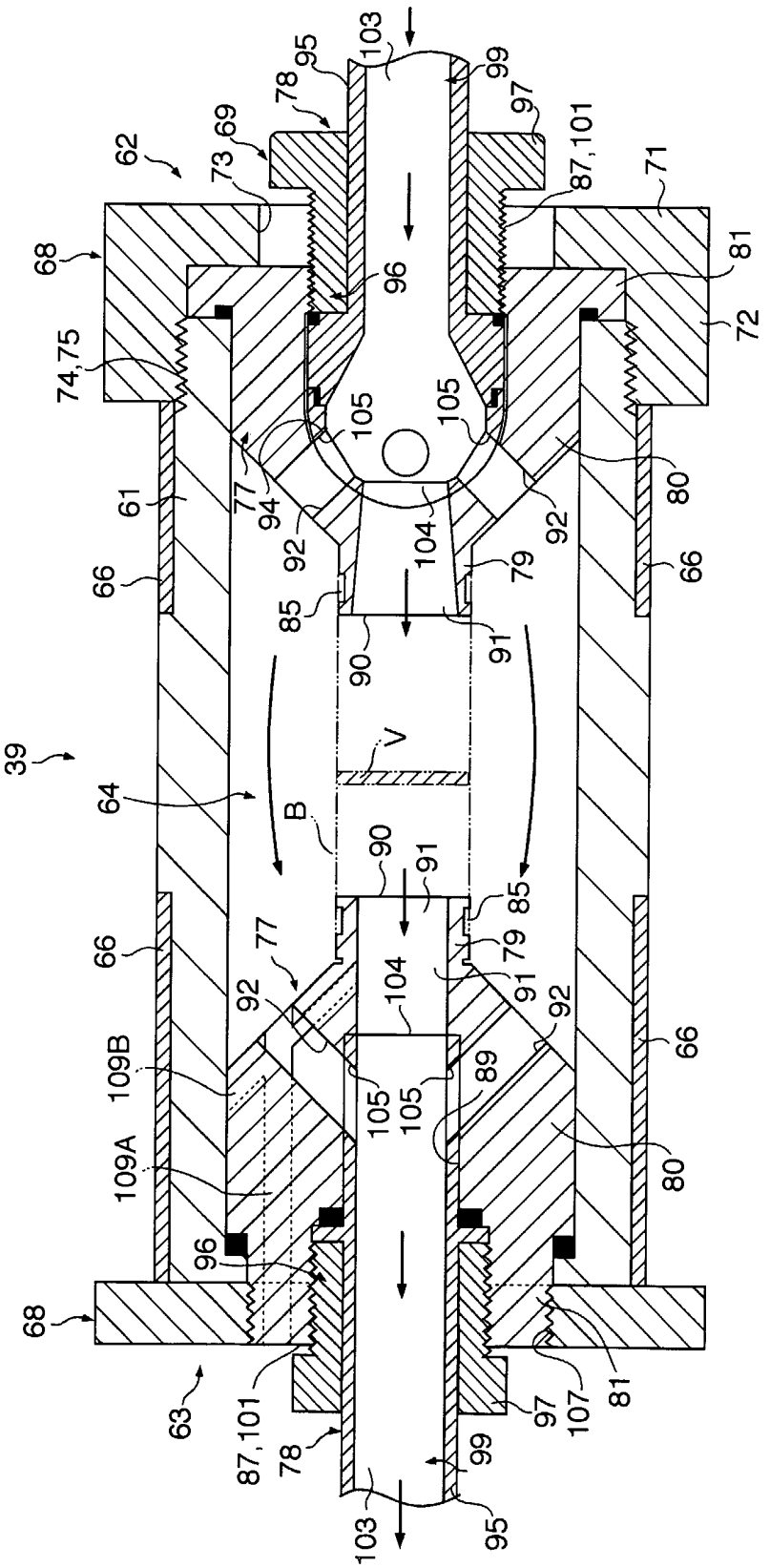

39
62
63
64
66
68
69
71
72
73
74,75
77
78
79
80
81
85
87,101
89
90
91
92
94
95
96
97
99
103
104
105
107
109A
109B
V
B

FIG.6

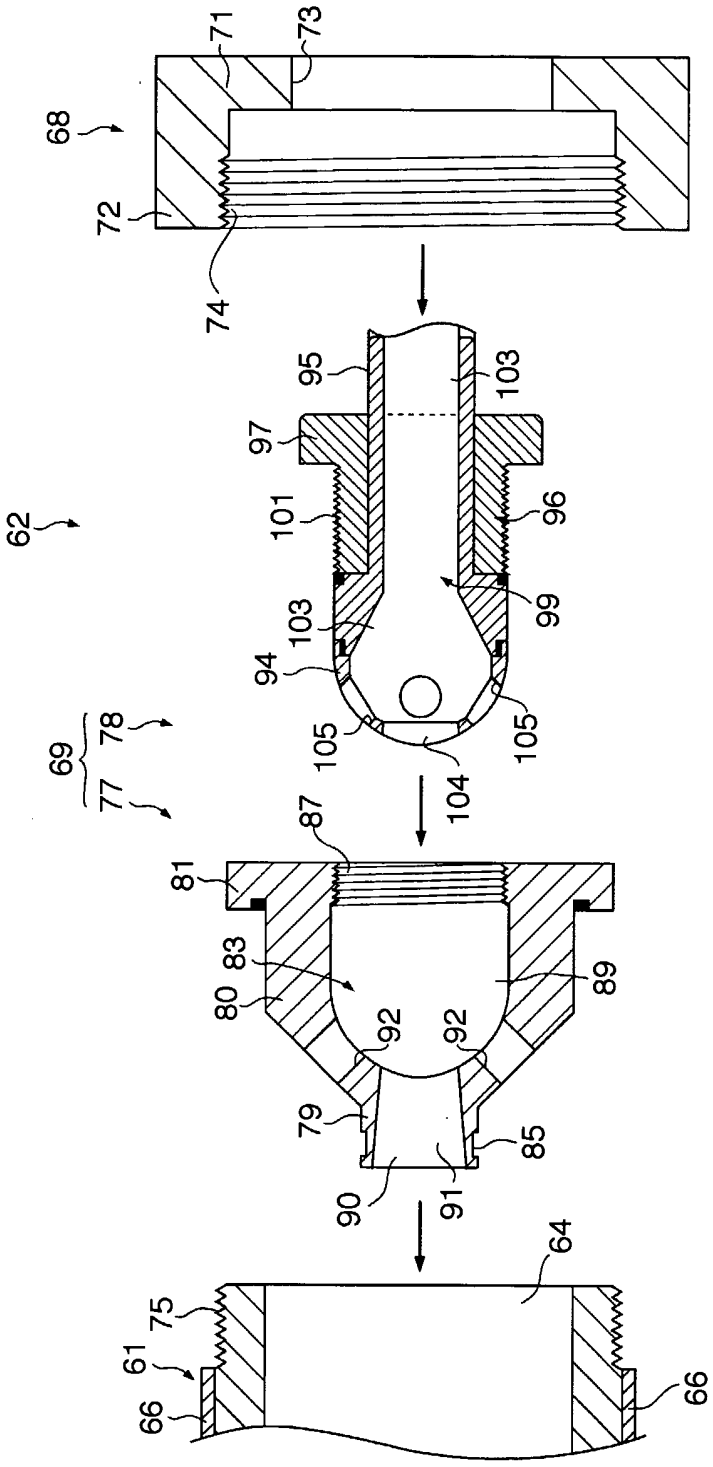

71
73
68
72
74
95
103
97
101
96
62
99
103
94
105
105
69
78
77
104
87
81
83
89
80
92
92
79
85
90
91
64
75
61
66
66

FIG.7

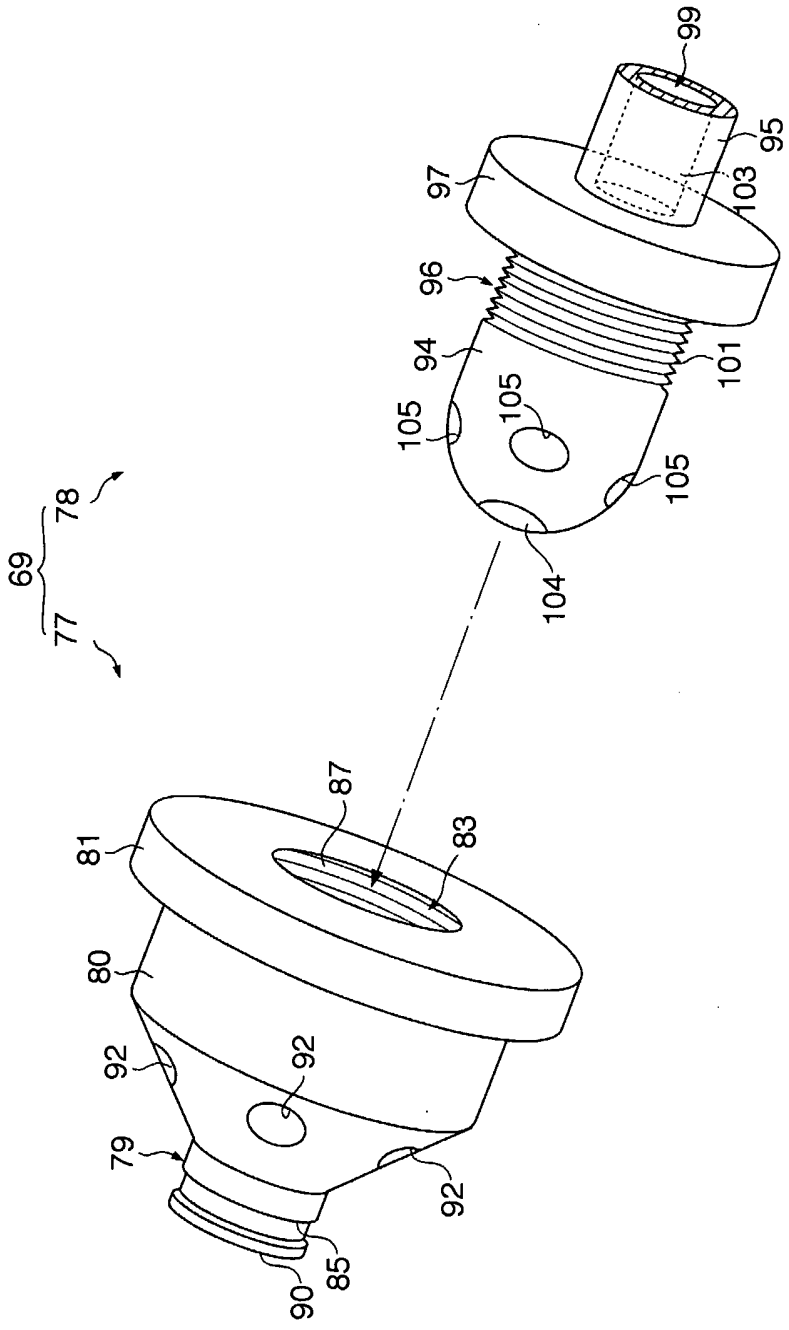

99
95
97
103
96
94
101
105
105
105
104
69
78
77
87
83
81
80
92
92
79
92
85
90

FIG.8

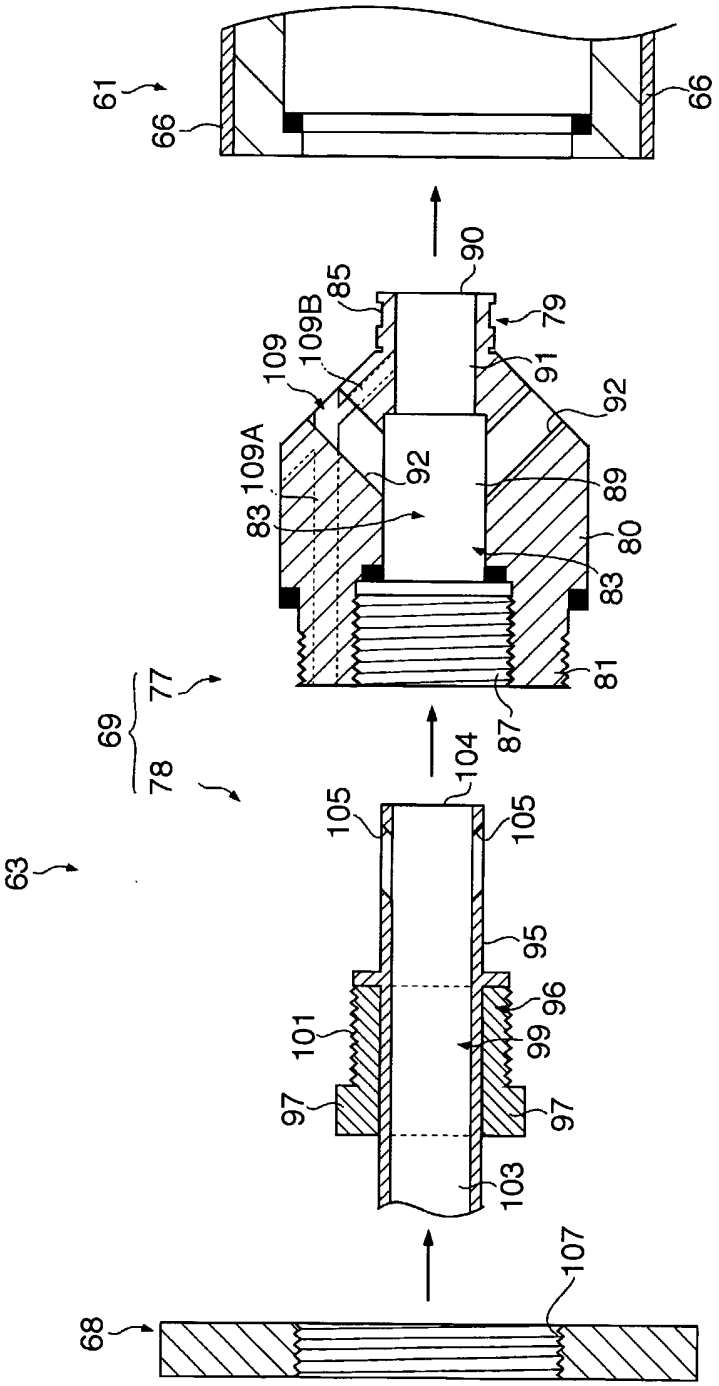

61
66
66
90
85
109B
109
79
91
92
109A
83
92
89
80
83
81
87
69
77
78
104
105
105
63
95
96
101
99
97
97
103
107
68

FIG.9

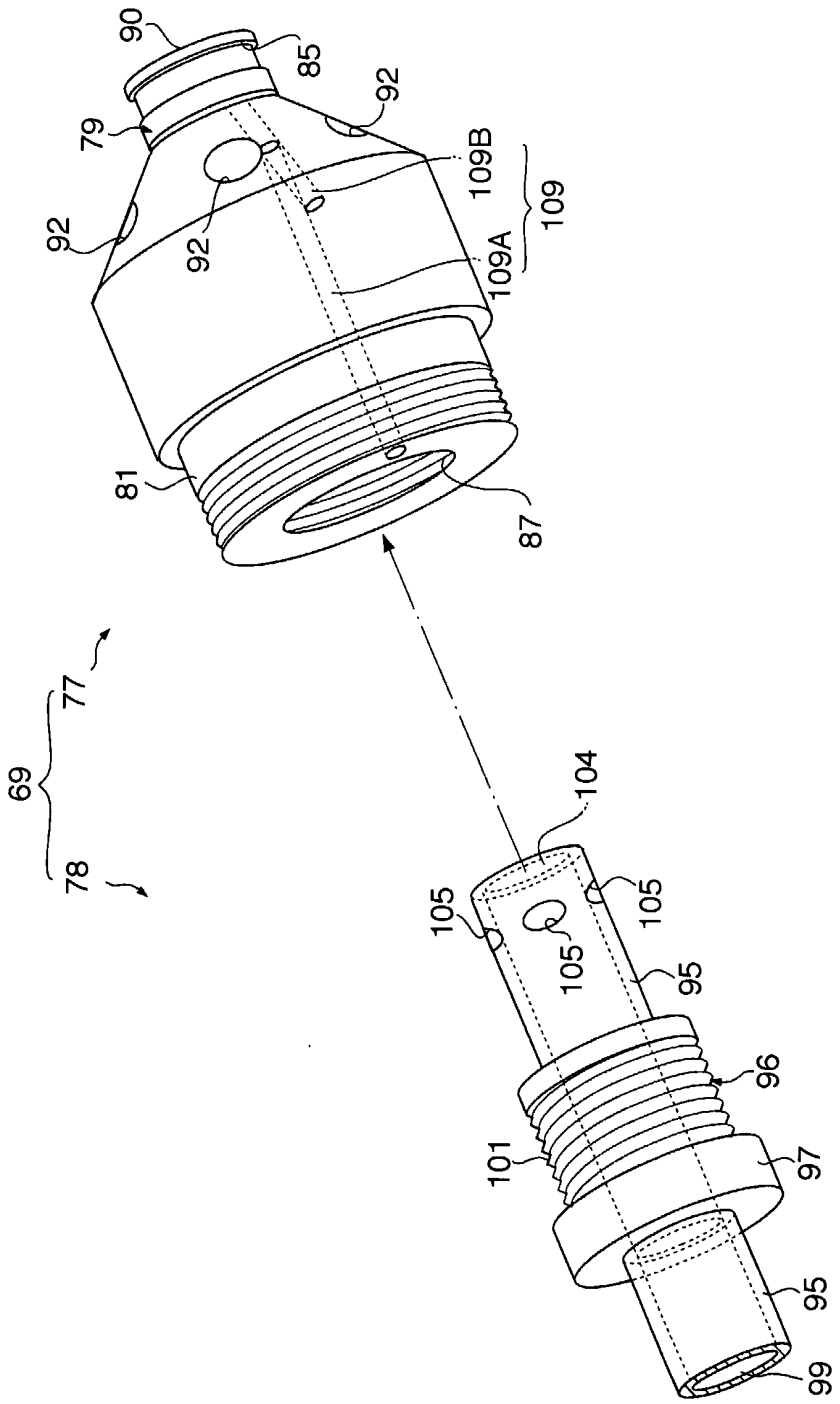
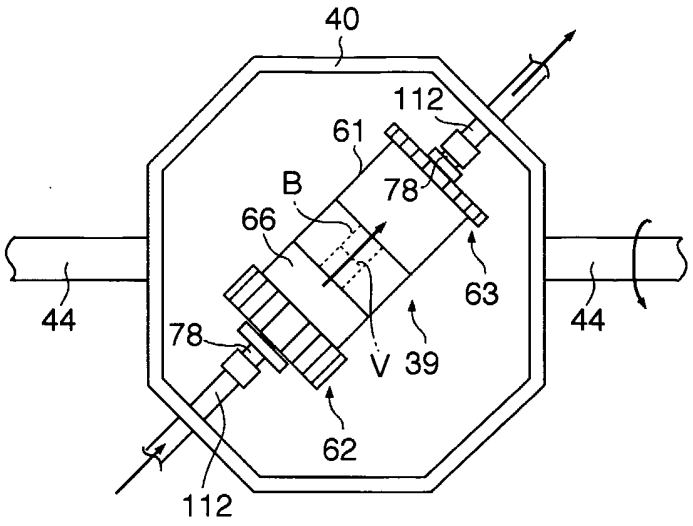

90
85
92
79
109B
109
92
92
109A
81
87
77
69
78
104
105
105
105
95
96
101
97
95
99

FIG.10

(A)


40
112
61
B
78
66
63
44
44
78
V
39
62
112

(B)

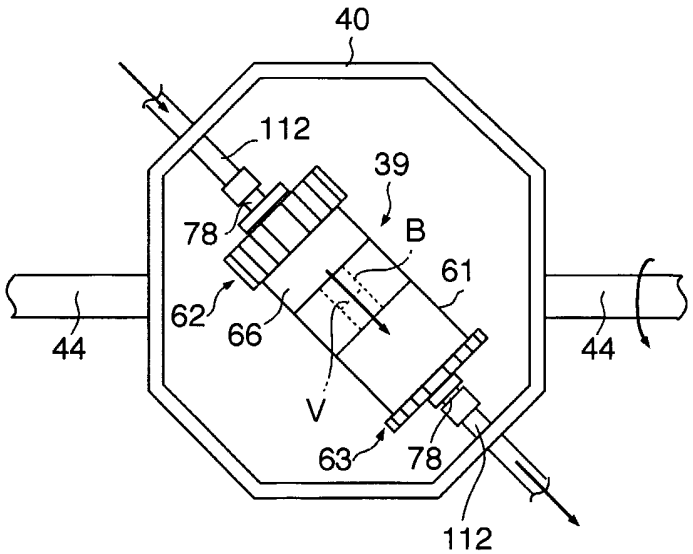

40
112
39
78
B
61
62
66
44
44
V
63
78
112

FIG.11

条件		単位面積当たりの残存数（個数／mm^2）
実施例1		850
実施例2	100W 8時間	380
	500W 12時間	0
	500W 24時間	0
比較例1		970
未処理		1880

FIG.12



FIG.13



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/JP2004/006666

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
Int.Cl[7] A61F2/02, A61L27/00, A61K35/12

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)
Int.Cl[7] A61F2/00-2/48, A61L27/00, A61K35/12, C12M3/00

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

Jitsuyo Shinan Koho	1940-1996	Toroku Jitsuyo Shinan Koho	1994-2004
Kokai Jitsuyo Shinan Koho	1971-2004	Jitsuyo Shinan Toroku Koho	1996-2004

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

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X Y	Kiyotaka IWASAKI et al., "Daidomyakuben Okikaeyo o Mezashita Buta Soshikiben no Datsusaiboka Shuho no Kento oyobi in vitro Hakudoka deno Saibo Hashuyo Bioreactor no Kaihatsu", The Japan Society of Mechanical Engineers Kanto Shibu Dai 9 Ki Sokai Koenkai Koen Ronbunshu, 13 March, 2003 (13.03.03), pages 83 to 84	1,2 3
X Y	JP 11-504216 A (ADVANCED TISSUE SCIENCES, INC.), 20 April, 1999 (20.04.99), Full text; all drawings & WO 96/34090 A1	1 2,3

[X] 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
"T" 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 10 August, 2004 (10.08.04)	Date of mailing of the international search report 24 August, 2004 (24.08.04)
Name and mailing address of the ISA/ Japanese Patent Office Facsimile No.	Authorized officer Telephone No.

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (January 2004)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/JP2004/006666

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X Y	JP 2001-517062 A (ADVANCED TISSUE SCIENCES, INC.), 02 October, 2001 (02.10.01), Full text; all drawings & WO 96/39814 A1 & US 5846828 A	1 2,3
Y	JP 2003-116519 A (Yasuhiko TABATA), 22 April, 2003 (22.04.03), Par. Nos. [0015], [0041] (Family: none)	2,3

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/JP2004/006666

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.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

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:

The invention of claim 1 relates to a method of sowing cells wherein "living organism tissue is placed in the flow approximately equal to the bloodstream of transplant recipient living body".

The invention of claim 2 relates to a method of sowing cells wherein "the living organism tissue immersed in the cell-containing solution is rotated".

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 an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
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.

☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

国際調査報告

国際出願番号　PCT／JP2004／006666

A.　発明の属する分野の分類（国際特許分類（IPC））
Int. Cl[7]　A61F　2／02
A61L27／00
A61K35／12

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（IPC））
Int. Cl[7]　A61F　2／00－2／48
A61L27／00，A61K35／12
C12M　3／00

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　1940－1996年
日本国公開実用新案公報　1971－2004年
日本国登録実用新案公報　1994－2004年
日本国実用新案登録公報　1996－2004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

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	関連する請求の範囲の番号
X Y	岩崎清隆他，大動脈弁置換用を目指したブタ組織弁の脱細胞化手法の検討及び in vitro 拍動化での細胞播種用バイオリアクターの開発，日本機械学会関東支部第９期総会講演会講演論文集，2003.03.13，p.83-84	1,2 3
X Y	JP 11-504216 A（アドバンスト　ティシュー　サイエンシズ，インコーポレーテッド），1999.04.20，全文，全図 &WO 96/34090 A1	1 2,3

☒ 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	国際調査報告の発送日
10．08．2004	24. 8. 2004

国際調査機関の名称及びあて先	特許庁審査官（権限のある職員）	3E	9623
日本国特許庁（ISA／JP） 郵便番号100－8915 東京都千代田区霞が関三丁目４番３号	寺澤　忠司 電話番号　03－3581－1101　内線　3344		

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	関連する請求の範囲の番号
X Y	JP 2001-517062 A（アドバンスト　ティシュー　サイエンシズ，インコーポレーテッド），2001.10.02，全文，全図 &WO 96/39814 A1　&US 5846828 A	1 2,3
Y	JP 2003-116519 A（田畑　泰彦） 2003.04.22，段落【0015】、【0041】（ファミリーなし）	2,3

国際調査報告

国際出願番号　ＰＣＴ／ＪＰ２００４／００６６６６

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（ＰＣＴ１７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．☐ 請求の範囲 _____ は、この国際調査機関が調査をすることを要しない対象に係るものである。つまり、

2．☐ 請求の範囲 _____ 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．☐ 請求の範囲 _____ 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の国際調査機関は認めた。

請求の範囲１に係る発明は、「移植先の生体の血流に略相当する流れの中に生体組織を置く」細胞播種方法に関するものである。
請求の範囲２に係る発明は、「細胞含有溶液に浸漬された生体組織を回転させる」細胞播種方法に関するものである。

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の範囲について作成した。

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の範囲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ので、この国際調査報告は、手数料の納付のあった次の請求の範囲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ので、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の範囲について作成した。

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なかった。