

(19)日本国特許庁(JP)

(12)特許公報(B2)

(11)特許番号
特許第7657015号
(P7657015)

(45)発行日 令和7年4月4日(2025.4.4)

(24)登録日 令和7年3月27日(2025.3.27)

(51)国際特許分類		F I	
A 6 1 K	35/35 (2015.01)	A 6 1 K	35/35
A 6 1 K	35/28 (2015.01)	A 6 1 K	35/28
A 6 1 P	29/00 (2006.01)	A 6 1 P	29/00
A 6 1 P	37/00 (2006.01)	A 6 1 P	37/00
請求項の数 4 (全16頁)			
(21)出願番号	特願2018-559219(P2018-559219)	(73)特許権者	512299978 リボジェムズ インターナショナル ソシ エタ ペル アチオニ イタリア国 イ - 2 0 1 2 9 ミラノ、ヴ ィアーレ ピアンカ マリア 2 4
(86)(22)出願日	平成29年5月12日(2017.5.12)	(74)代理人	100159905 弁理士 宮垣 丈晴
(65)公表番号	特表2019-514997(P2019-514997 A)	(74)代理人	100117422 弁理士 堀川 かおり
(43)公表日	令和1年6月6日(2019.6.6)	(72)発明者	トレモラーダ, カルロ フェルディナンド マリア イタリア, 2 0 1 2 4 ミラノ, ヴィアレ ピアンカ マリア 2 4
(86)国際出願番号	PCT/IB2017/052792	(72)発明者	ロシュトー, ビエール フランス, 7 5 0 1 4 パリス, リュ デ
(87)国際公開番号	WO2017/195156		最終頁に続く
(87)国際公開日	平成29年11月16日(2017.11.16)		
審査請求日	令和2年5月8日(2020.5.8)		
審判番号	不服2022-10716(P2022-10716/J 1)		
審判請求日	令和4年7月8日(2022.7.8)		
(31)優先権主張番号	102016000049360		
(32)優先日	平成28年5月13日(2016.5.13)		
(33)優先権主張国・地域又は機関			
最終頁に続く			

(54)【発明の名称】 脂肪およびその医学的使用

(57)【特許請求の範囲】

【請求項 1】

微小断片化脂肪を含み、急性期の敗血症によって引き起こされ、体温の変化、サイトカインストームおよびプロカルシトニン上昇からなる群から選択される疾患／症状の治療において使用するための組成物であって、

前記微小断片化脂肪は、脂肪組織を、酵素処理を用いずに微小断片化された微小断片化脂肪であり、かつ400～900μmの範囲のサイズを有し、間葉系幹細胞（MSC）および／または周皮細胞および／または脂肪幹細胞を含む脂肪クラスタを含有し、

前記間葉系幹細胞（MSC）および／または周皮細胞および／または脂肪幹細胞は、その天然／無傷の間質血管ニッチを維持する、組成物。

【請求項 2】

前記疾患／症状がプロスタグランジン合成に影響し、および／または非COX標的に媒介される、請求項1に記載の微小断片化脂肪を含む組成物。

【請求項 3】

前記微小断片化脂肪が、ヒト脂肪組織、個体の下腹部および／または側腹部領域からのヒト脂肪組織、あるいは単離／吸引脂肪組織に由来する、請求項1又は2に記載の微小断片化脂肪を含む組成物。

【請求項 4】

前記微小断片化脂肪が、腹腔内、筋肉内、肺泡性、経鼻、肺内、くも膜下腔内、篩板（篩骨篩板）経由、鼻腔経路を用いた経路、またはリンパ投与のためのものである、請求項

1 ~ 3のいずれか一項に記載の微小断片化脂肪を含む組成物。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、全身性疾患、好ましくは敗血症に関連するかあるいは敗血症によって引き起こされる全身性疾患の処置において使用するための、微小断片化(micro-fragmented)脂肪組織または微小断片化脂肪組織を含む組成物に関する。

さらに、微小断片化脂肪組織または微小断片化脂肪組織を含む組成物は、全身性疾患、炎症性疾患、免疫疾患、または慢性疾患を処置するために使用され、前記疾患は、敗血症疾患の結果であることが意図される。

好ましくは、微小断片化脂肪組織は、敗血症の急性期(初期)および後期の両方を処置するために有用である。

【背景技術】

【0002】

敗血症、または全身性炎症反応症候群は、感染によって誘発される生理学的、病理学的、および生化学的な異常の症候群であると定義され、血管漏出、組織損傷、多臓器障害につながる全身性の制御されない炎症反応をもたらす。さらに現在、利用可能な処置があまり有効ではないため、敗血症は症例の30%~40%において死に至る。

米国では、敗血症は年間200,000人を超える人々の死亡原因であることが報告されている。

従って、敗血症は医療の全体的なコストを著しく増大させる。

最近では、敗血症患者の管理は良くなっているが、敗血症関連の罹患率は上昇している。例えば、半数の症例において、生存患者の状態は後天性ニューロミオパチーにより複雑化され、患者は、筋力低下および筋肉消耗、エネルギー障害、ならびにタンパク質分解のために、長期間にわたる身体障害に直面することがある。

敗血症に関連する有害な影響は、部分的に、組織および臓器に損傷を与える制御されないサイトカインストームに起因する。さらに、炎症経路の広範な活性化は、多臓器不全、循環系の崩壊に進行し、かつ最終的には死に至る。

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0003】

上記で報告された事項を全て考慮して、特に敗血症に関するこれらの種類の全身性疾患を処置するための新規/代替の治療法を開発する必要性が依然として強く感じられている。

【課題を解決するための手段】

【0004】

本発明は、好ましくは腹腔内経路で、微小断片化脂肪組織を使用/投与することにより、上記で報告された必要性を解決する。

実際に、本出願人は、驚くことに、例えば、微小断片化脂肪組織により処置された敗血症患者が、敗血症に関連するかあるいは敗血症によって引き起こされる有害な影響の大部分の低減を示すことを見出した。より興味深いことに、微小断片化脂肪組織の使用/投与は、敗血症の急性期および後期の両方に特有の機能障害を回復させた。

微小断片化脂肪組織の使用/投与は、特に、臓器不全および/または傷害、筋力低下または認知機能障害などの敗血症に関連する長期にわたる影響の救済において有効である。

【0005】

実際に、本出願人は、微小断片化脂肪組織で処置したマウスにおいて、生存率の改善および敗血症スコアの持続的な低下を観察した。さらに、処置マウスは、体温および生物学的パラメータの正常化、炎症促進性サイトカインレベルの低下、ならびに抗炎症性サイトカインレベルの上昇を示した。さらに、処置マウスは、肝臓および肺における免疫細胞の浸潤の低下も示した。最後に、微小断片化脂肪組織の投与は、敗血症の後期に関連するニューロミオパチーおよび筋力低下/筋肉消耗の回復を可能にする。

10

20

30

40

50

【図面の簡単な説明】

【0006】

【図1】Lipogems（微小断片化脂肪組織）または生理食塩水を注射したCLPマウスにおける敗血症スコア（A～B）、ならびにLipogems（微小断片化脂肪組織）を注射したまたは注射しないLPS処置マウスにおける敗血症スコアおよび生存率（C～D）を示す。

【図2】生理食塩水またはLipogems（微小断片化脂肪組織）を注射したCLPマウスの生存率（A）および体温（B）を示す。

【図3】生理食塩水またはLipogems（微小断片化脂肪組織）を注射したCLPマウスにおけるアラニンアミノトランスフェラーゼ（ALT）、アスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ（AST）、アルカリホスファターゼ（AP）、クレアチンキナーゼ（CK）および乳酸デヒドロゲナーゼ（LDH）の血漿レベル（A）；白血球数（B～C）を示す。

10

【図4】Lipogems（微小断片化脂肪組織）を注射したまたは注射しないCLPマウスにおける炎症促進性サイトカインレベルを示す。

【図5】Lipogems（微小断片化脂肪組織）を注射したまたは注射しないCLPマウスの肝臓および腎臓中のF4/80+、B220+およびCD3+細胞の数を示す。

【図6】Lipogems、Lipogems+インドメタシン、Lipogems+SC-560およびLipogems+LS-398（Lipogems=微小断片化脂肪組織）を注射したCLPマウスの炎症性スコア（A）、生存率（B）、白血球数（C）、および炎症促進性サイトカインレベル（D）を示す。

20

【発明を実施するための形態】

【0007】

本発明の第1の態様は、全身性疾患または全身性状態、好ましくは敗血症に関連するかあるいは敗血症によって引き起こされる全身性疾患または全身性状態の処置において使用するための微小断片化脂肪組織または微小断片化脂肪組織を含む組成物に関する。

言い換えれば、本発明によると、微小断片化脂肪組織は、全身性疾患または全身性状態、好ましくは敗血症に関連するかあるいは敗血症によって引き起こされる全身性疾患または全身性状態に関連する健康への有害な影響、好ましくは敗血症に関連するかあるいは敗血症によって引き起こされる長期にわたる影響を改善する（回復させるおよび/または救済する）ために有用である。

30

従って、本発明の第1の態様は、全身性状態または全身性疾患、好ましくは、敗血症に関連するかあるいは敗血症によって引き起こされる疾患/状態を処置するための方法に関し、前記方法は、それを必要としている個体に、有効量の微小断片化脂肪組織または微小断片化脂肪組織を含む組成物を投与する少なくとも1つのステップを含む。

疾患または状態は、好ましくは、全身性疾患/状態、炎症性疾患/状態、免疫疾患/状態、または慢性疾患/状態であり、前記疾患/状態は、敗血症疾患/状態によって引き起こされることが意図される。

【0008】

好ましい実施形態によると、疾患または状態は、プロスタグランジン合成および/または非COX標的に関係している。従って、状態または疾患は、非COX標的に媒介される。

40

言い換えれば、疾患または状態は、COX、好ましくはCOX-2経路に関与しない。実際、これらの酵素の阻害薬は、本発明の治療効果を損なわない。

【0009】

これに関連して、全身性状態または全身性疾患は、いくつかの臓器および組織、あるいは身体全体にも影響を与える状態または疾患であると定義される。

これに関連して、敗血症は全身性炎症反応症候群も意味する。

これに関連して、敗血症または全身性炎症反応症候群は、血管漏出、組織損傷および/または多臓器障害につながる全身性の制御されない炎症反応をもたらす感染を意味する。特に、敗血症の後期には、これらの影響は、敗血症患者のニューロミオパチー、筋力低下

50

、エネルギー障害、タンパク質分解、筋肉消耗、かつ最後には死さえも引き起こし得る。

これに関連して、敗血症に関係する健康への有害な影響は、好ましくは、ニューロミオパチー、エネルギー障害、タンパク質分解、筋肉消耗、急性の腎臓および肝臓傷害、多臓器不全、ならびに恐らく死から選択される。

【0010】

好ましくは、急性期の損傷効果は、体温の変化、サイトカインストーム（大幅で急速な増大）およびPCT（プロカルシトニン）の上昇から選択される。

後期の有害な影響（または長期にわたる敗血症の影響）は、好ましくは、臓器不全および/または傷害、急性肺損傷、ショック、腎不全、筋力損失および/または低下、認知機能障害（不眠症、悪夢、鮮明な幻覚およびパニック発作、極度の疲労、集中力低下、精神機能の低下、自尊心および自信の喪失）、ならびに多臓器不全症候群（MODS）から選択される。

10

好ましくは、微小断片化脂肪組織は、非酵素的な微小断片化脂肪組織である。言い換えれば、本発明において使用/投与される脂肪は、どんな酵素処理も用いずに微小断片化されている。

【0011】

本発明のさらに好ましい実施形態によると、微小断片化脂肪組織、好ましくは、吸引脂肪組織は、Lipogems（登録商標）デバイスを用いることにより、より好ましくは特許出願の国際公開第2011/145075号パンフレットに完全に開示されているプロセスに従って得られる。

20

好ましくは、単離された脂肪はLipogems（登録商標）デバイスに導入され、軽度の機械力を用いて、かつ溶液、好ましくは生理食塩水の存在下で、小さい組織クラスタに漸進的に縮小（断片化）される。

好ましくは、微小断片化脂肪は、50～5000μm、好ましくは100～3000μm、より好ましくは200～2500μm、より好ましくは300～1500μm、より好ましくは400～900μmの範囲のサイズを有する脂肪クラスタを含有する。

より好ましくは、これらの脂肪クラスタは、間葉系幹細胞（MSC）および/または周皮細胞、好ましくは、周皮細胞関連MSCおよび/または脂肪幹細胞および/または内皮細胞および/または線維芽細胞および/または脂肪細胞を含む。脂肪クラスタ内へのこれらの細胞はそのニッチを維持し、これは、細胞がその天然/無傷の間質血管ニッチを維持することを意味する。従って、有利に、これらの細胞は、間質によって、栄養および/またはシグナル伝達に関して支持される。さらに、これらは、移植の間に侵襲性環境から、かつ任意の物理的および化学的な外部侵襲（例えば、機械的、酸素など）から保護される。

30

【0012】

本発明の好ましい実施形態によると、非微小断片化組織、すなわち本出願および特許出願の国際公開第2011/145075号パンフレットに開示される微小断片化プロセスを受けなかった脂肪組織、好ましくは吸引脂肪組織と比べて、微小断片化脂肪組織、好ましくは微小断片化吸引脂肪組織は、微小血管の含量がより高く、好ましくは、CD31+細胞の含量がより高く、より好ましくは、CD31+細胞の含量が5～10倍高い。

【0013】

40

本発明のさらに好ましい実施形態によると、非微小断片化組織、すなわち本出願および特許出願の国際公開第2011/145075号パンフレットに開示される微小断片化プロセスを受けなかった脂肪組織、好ましくは吸引脂肪組織と比べて、微小断片化脂肪組織、好ましくは微小断片化吸引脂肪組織は、より大きい血管の含量および/または周皮細胞、すなわちNG2陽性細胞の数がより多い。

【0014】

従って、本発明の微小断片化脂肪組織、好ましくは微小断片化吸引脂肪組織は、好ましくは、

- 50～5000μmの範囲のサイズを有する組織のクラスタ；ならびに/または
- 間葉系幹細胞（MSC）および/もしくは周皮細胞、好ましくは周皮細胞関連MS

50

C および / もしくは脂肪幹細胞および / もしくは内皮細胞および / もしくは線維芽細胞および / もしくは脂肪細胞 ; ならびに / または

- 好ましくは、血液残渣および炎症促進性の油性物質が存在しないことを含む。

【 0 0 1 5 】

これらの細胞、好ましくは脂肪間葉系幹細胞は、C D 4 4、C D 7 3、C D 9 0、C D 1 0 5、C D 1 4 6 および C D 1 6 6 から選択される少なくとも1つ、好ましくは全てのマーカーを発現し、好ましくは、O C T 4、S O X 2、N A N O G、b - チューブリン I I I、N E S T I N、N E U R O D 1、M U S A S H I 1、P A X 6、および S O X 3 から選択される少なくとも1つのマーカー、より好ましくは全てのマーカーも発現する。より好ましくは、これらの細胞は、ネスチン、b - チューブリン I I I、G F A P、および O 4 を同時発現する。

10

制御された脂肪断片化は、デバイス内に含有される1つまたは複数の断片化 / 脱凝集 (d i s a g g r e g a t i o n) 手段の使用によって可能にされる。

好ましくは、この手段は金属手段、より好ましくは金属ビーズであり、前記ビーズは、好ましくは、0 , 1 ~ 3 0 ミリメートル、好ましくは1 ~ 2 0 m m、より好ましくは5 ~ 1 0 m m、より好ましくは7 , 5 ~ 8 , 5 m m の範囲のサイズを有する。

デバイスの制御された振とうにより、脂肪組織全体を通る断片化 / 分離 (d i s g r e g a t i o n) 手段の緩やかな移動が可能になり、従って、穏やかな脂肪の断片化 / 分離が可能になる。

20

好ましくは、断片化 / 分離は、流動する生理食塩水緩衝液中、より好ましくは、油および血液残渣の除去を可能にする生理食塩水緩衝液の連続的な流れの中で実施される。

【 0 0 1 6 】

脂肪の断片化 / 分離ステップは、好ましくは、1 5 ~ 2 0 分を要する。従って、本発明の微小断片化脂肪組織は、穏やかで無酵素、無菌の手術中の迅速な操作を用いることにより得られる。

本発明の脂肪組織は、好ましくは、ヒトに由来する。

好ましい実施形態によると、脂肪組織はヒト脂肪組織であり、より好ましくは、個体の下腹部および / または側腹部領域からのヒト脂肪組織、より好ましくは単離 / 吸引脂肪組織である。

30

しかしながら、前記脂肪組織は、任意の有用な身体領域から単離することもできる。

好ましくは、脂肪組織、好ましくは微小断片化脂肪組織は、自家性または異種性である。

本発明の好ましい実施形態によると、敗血症を患っている個体は人間である。

本発明のさらに好ましい実施形態によると、敗血症は院内感染であるか、あるいは敗血症は細菌、真菌またはウイルス感染に関連する。

【 0 0 1 7 】

好ましくは、本発明に従う敗血症状態 / 疾患は炎症促進性分子の誤制御を伴い、前記分子は、好ましくは、I L - 1 a、I L - 1 b、I L - 2、I L - 5、I L - 6、I L - 1 2、I L - 1 7、G M - C S F、I F N - g、M I P - 1 a、M I P - 1 b、R A N T E S、プロカルシトニン (P C T) 分子およびクレアチンキナーゼ (C K) および T N F - a から選択されるが、これらに限定されない。

40

好ましくは、本発明に従う敗血症状態 / 疾患は抗炎症性分子の誤制御を伴い、前記分子は、好ましくは、I L - 4、I L - 1 0、I L - 1 3 および G - C S F から選択されるが、これらに限定されない。

実際に、敗血症患者における微小断片化脂肪投与の後、抗炎症性分子は上方制御され、炎症促進性分子は下方制御される。

従って、微小断片化脂肪は、好ましくは I L - 1 a、I L - 1 b、I L - 2、I L - 5、I L - 6、I L - 1 2、I L - 1 7、G M - C S F、I F N - g、M I P - 1 a、M I P - 1 b、R A N T E S から選択されるがこれらに限定されない炎症促進性分子を減少させるため、かつ / あるいは好ましくは I L - 4、I L - 1 0、I L - 1 3 および G - C S

50

F から選択される抗炎症性分子を増加させるために使用 / 投与することができる。

【0018】

本発明の好ましい実施形態によると、全身性疾患または状態、好ましくは、敗血症または敗血症に関連する（によって引き起こされる）状態の処置において使用するための微小断片化脂肪は、腹腔内、筋肉内、肺胞性、経鼻、肺内、くも膜下腔内、篩板（篩骨篩板（*lamina cribra*））經由（好ましくは、鼻腔経路を用いる）、またはリンパ投与のためのものである。最も好ましい投与経路は腹腔内経路である。好ましくは、微小断片化脂肪組織または微小断片化脂肪組織を含む組成物はそれ自体で投与されるか、あるいはさらなる分子、好ましくは抗炎症薬および / または抗菌薬と組み合わせて投与される。

【0019】

好ましい実施形態によると、投与は、さらなる処置：

- 感染部位における手術；および / または
- 好ましくは電解質の注射による、血行動態の再平衡化；および / または
- 心臓作用性（*Cardiotropes*）および / または血管作用性（*vasoactives*）（例えば、カテコールアミンなど）分子の投与、および / または
- 好ましくは低用量のコルチコ療法（*corticotherapy*）；および / または
- 好ましくは換気により援助される、呼吸、；および / または
- 血液透析および / またはインスリン療法、および / または
- 輸血

に関連するか、あるいはこれらに従う。

好ましくは、使用 / 投与は、現在の臨床業務の投薬に従って敗血症症状が現れてから最初の 6 時間（医学界ではゴールデンアワーと呼ばれる）以内に行われる。あるいは、使用 / 投与は、敗血症症状が現れてから数日および / または数週間後に行われる。

【実施例】

【0020】

マウスおよび収容条件

全てのプロトコルは、動物愛護に関するフランスおよびヨーロッパの法令、ならびに公衆衛生サービスの推奨を順守するために監督当局のパスツール研究所により審査された。

使用したマウスは、6 ~ 10 週齢のオス C57BL / 6 RJ RJ であった。いずれかの所与の時点の炎症性スコアが 21 よりも高ければ、あるいは呼吸数または品質に起因するポイントが 322 を超えて増大したら、マウスを安楽死させた。特定されない限り、実験ごとに使用した動物の総数は、非 CLP 対照については 5 匹、実験点 CLP については 7 匹、および CLP + *Lipogems*（登録商標）群については 7 匹であった。実験は常に、独立して 2 回繰り返した。LPS 負荷については、対照として $n = 4$ の動物、LPS として $n = 8$ の動物、および LPS + *Lipogems*（登録商標）群として $n = 8$ の動物を使用した。12 : 12 の明 / 暗サイクルにおいて、温度および湿度が制御された病原体を含まない施設内にマウスを収容した。食物および飲料を自由に与えた。全体を通して、良好な実践実験研究のための ARRIVE ガイドラインに従った。

【0021】

盲腸結紮穿刺（CLP）およびリポ多糖（LPS）注射

本研究において 2 つの敗血症マウスモデルを使用した：

1. 盲腸結紮穿刺 20（CLP）モデル

これは、6 ~ 10 週齢のオス C57BL / 6 RJ RJ における炎症のモデルとして CLP により誘発される腹膜炎で構成された。CLP モデルは盲腸の穿孔からなり、糞便物質が腹膜腔へ放出されるようになり、複数細菌感染により誘発される免疫応答の増悪が生じる。輸液蘇生と共に CLP を受けるマウスは、第 1 の（早期）高心拍出量段階を示し、やがて第 2 の（後期）低心拍出量段階に進行する。手術の前に、ケタミン（*Imalgene 1000* 100 mg / Kg *Merrial*）およびキシラジン（*Rompun* 2 % 20 mg / Kg *Bayer*）により動物を腹腔内で麻酔した。開腹手術の後、4 . 0 縫

10

20

30

40

50

合系により盲腸を第3遠位において (a t t h e d i s t a l t h i r d) 結紮し、遠位部分を21ゲージ針で2回穿孔した。全てのマウス群に水分を補給し、手術後4日間、鎮痛薬 (ブプレノルフィン (B u p r e n o r p h i n) A x i e n c e 0.3mg / kg) で1日2回処置した。

2. L P S 投与

マウスの体重に応じて補正される0.9%NaCl中に保存された10mg/mlの源液から10mg/kgに達するようにLPSを腹腔内に投与した。この群は、主目的 (炎症性スコアおよび生存率) に対するLipogems (登録商標) の効果のみを確認するために実施した。

【0022】

両方のモデルにおいて、対照動物は、同じ用量のケタミン (I m a l g e n e 1000100mg/kg Merial) およびキシラジン (R o m p u n 2% 20mg/kg Bayer) により腹腔内で麻酔しただけであった。全ての外科的処置は、午前中に無菌フード下で実行した。

【0023】

Lipogems (登録商標) の収集

各患者は、手術組織の調査のための使用に対する異議なしのインフォームドコンセントに署名した (そうでない場合は、破壊することになる) 。個人データ保護承認のためのフランス国家当局 (F r e n c h N a t i o n a l A u t h o r i t y f o r P e r s o n a l D a t a P r o t e c t i o n a p p r o v a l) の後に設定された、将来を見越して保持されるデータベース上に患者のデータを集めた (C o m m i s s i o n N a t i o n a l e I n f o r m a t i q u e e t l i b e r t e : C N I L . h t t p s : / / w w w . c n i l . f r . R e g i s t r a t i o n n u m b e r 1922081-02.02.2016) 。

【0024】

- ヒト脂肪組織の収集

伝統的な外科的脂肪吸引から得られる技術を用いる脂肪組織収集のためのドナー部位として下腹部または側腹部領域を選択した。1×2mmの複数の楕円孔がそれに沿って配置された鈍い13Gカニューレを、脂肪組織収集のために使用した。10ccのシリンジと接続したこの使い捨てカニューレにより、数回のカニューレストロークで高速かつ非侵襲的な脂肪組織の収集が可能になる。選択領域から生理食塩水および1:1000エピネフリンによるチューメセント (t u m e s c e n t) 浸潤の10分後に脂肪組織を収集した。

【0025】

- Lipogems (登録商標) デバイスによる脂肪組織の処理

収集した脂肪組織をLipogems (登録商標) 閉鎖系において直ちに処理した。微小断片化、洗浄、および過剰の機械的プロセスは生理溶液中に完全に浸漬された系で行われ、体積の減少を可能にすると共に細胞生成物に対する任意の外傷性作用を最小限にするために空気存在が回避される。得られた生成物は、無傷の間質血管ニッチ内に保持された周皮細胞 / M S C を含有し、移植後にレシピエント組織とすぐに相互作用することができる。精製Lipogems (登録商標) 脂肪組織を60ccのシリンジ内に採取し、過剰の生理食塩水を除去するために、重力により穏やかにデカントするように配置した。次に、Lipogems (登録商標) 生成物をいくつかの1ccシリンジに移し、レシピエントマウスの腹腔内に再注入した。

【0026】

シクロオキシゲナーゼ阻害薬

マウスにシクロオキシゲナーゼ阻害薬の注射を受けさせた (L i p o g e m s (登録商標) を送達するときに腹腔内に注射した) 。インドメタシン (10mg/kgで使用されるCOX酵素の非選択的阻害薬 ; S i g m a - A l d r i c h , I 7378 , U S A) 、またはSC-560 (6mg/kgで使用されるCOX1の選択的阻害薬 ; S i g m a - A l d r i c h , S 2064 , U S A) 、またはNS-398 (6mg/kgで使用され

10

20

30

40

50

るCOX2の選択的阻害薬；Sigma-Aldrich, N194、USA)のいずれかにより注射を実施した。注射は8時間ごとに24時間実施した。全ての注射は体重補正され、0.9%NaCl中で注射前に新たに調製された10mg/ml溶液から開始された。対照群には同体積の0.9%NaClを注射した。この実験セットのために、n=8の敗血症CLPマウス、n=8の敗血症CLP+Lipogems（登録商標）マウス、およびn=5の対照（非敗血症の注射なしマウス）を使用した。独立した実験を2回繰り返した。

【0027】

Luminex（登録商標）（マルチプレックスイムノアッセイ）

ヘパリンコートしたEppendorfチューブおよびシリンジ内に心臓内穿刺から血液を採取した。血液を4で10分間、1500rpmで回転させ、上澄み（血漿）を採取して凍結した。凍結血漿を解凍し、Luminex（登録商標）複合サイトカインおよびケモカイン分析（Bio-Plex（登録商標）Pro™ Mouse Cytokine Standard 23-Plex, Group IおよびStandard 9-Plex, Group II）のために処理した。炎症性サイトカインの研究は、対照マウス、敗血症（CLP）マウス、Lipogems（登録商標）を注射した敗血症マウスにおいて行った。この実験セットのために、n=7の敗血症CLPマウス、n=7の敗血症CLP+Lipogems（登録商標）マウスおよびn=5の対照（非敗血症の注射なしマウス）を使用した。

【0028】

ヘマトキシリンおよびエオシン（H&E）染色および免疫組織化学的検査

H&E分析のために、臓器を4%ホルムアルデヒド中で2日間固定し、60でパラフィン中に包埋した。次に組織を50μmの切片にし、一晚乾燥させた。切片をヘマトキシリン中に30秒間浸漬させた。アルコール酸およびアンモニア水で洗浄した後、エオシン中に15秒間浸漬させた。各ステップの後、蒸留水で切片をすすいだ。次に、増大する濃度（70%、80%、95%、および100%）のアルコールによる処理で、切片を脱水した。最後に、切片をキシレンで処理し、ガラススリップで被覆した。

免疫染色のために、標準技術を使用して、凍結した連続の10μm切片を調製した。全ての組織をパラホルムアルデヒド4%で15分間固定し、PBSで洗浄した。次に組織をPBS中で0.5%Triton X 100および3%BSA（ウシ血清アルブミン）と共に30分間インキュベートした。徹底的に洗浄した後、一次抗体を37のPBS中で1時間インキュベートした。次に切片をPBSで洗浄し、室温で50分間、二次抗体に曝露した（Histofine、正しい宿主に向けられたシンプルステインMax POペルオキシダーゼポリマー）。全ての免疫組織化学染色と同時に負の対照（一次抗体なしの染色）を実施した。組織学カウントのために、n=4の対照、n=5の敗血症マウス（CLP）、またはn=5の敗血症（CLP）+Lipogems（登録商標）注射を使用した。カウントは二重盲検で手作業により行った。使用した抗体リストは、次の：抗CD3、Dako#A0452；抗CD4 Pharmingen#550280；抗F4/80 Invitrogen RM2600；抗CD45R（B220）Invitrogen#A14748；抗ビオチン化 Jackson#712065150であった。

【0029】

測定

主要エンドポイント

主要エンドポイントは、CLPの24時間後の炎症性スコアの評価であった（表1）。比較および確認の目的で、このスコアは、10mg/kgの腹腔内LPS注射マウスにおいても24時間後に計算した。

【0030】

二次エンドポイント

測定した二次エンドポイントには、炎症後21日目までの生存および体温、アスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ（ASAT）、アラニンアミノトランスフェラーゼ（AL

10

20

30

40

50

A T)、アルカリホスファターゼ (A P)、乳酸デヒドロゲナーゼ (L D H) およびクレアチンキナーゼ (C K) の血漿レベル、白血球数、ならびに C L P 後 2 4 時間および 2 1 日目までの炎症促進性および抗炎症性サイトカインの血漿レベル、C L P の 6 時間後の肝臓および腎臓中の F 4 / 8 0 +、B 2 2 0 + および C D 3 + 細胞の数が含まれた。

【0031】

データ分析

サンプルサイズは、有意な結果を得るために、これまでの実験および最小 n 値を基準とした。骨髓間葉系幹細胞の注射後に動物の死において変動性の低い重要な違いが以前に観察された。高グレード C L P の誘発後に 6 5 % の死が生じ、骨髓間葉系幹細胞の注射後に 5 % に低下した。α = 5 % および 9 0 % の検出力で、n 値 = 7 になった。脂肪由来の間葉系幹細胞が骨髓由来の間葉系幹細胞よりも効率的であり得る証拠 (研究室および文献に基づいて、骨髓由来間葉系幹細胞に対して脂肪間葉系幹細胞で観察された、より高いサイトカインの降下のように実験的な証拠) が得られている。従って、n = 8 で十分なはずある。体温、サイトカイン量および白血球数 (平均 ± S D で表される) を除いて、各条件についてデータは中央値 [I Q R] で表される。* P < 0 . 0 5 ; ** P < 0 . 0 1 ; *** P < 0 . 0 0 1 ; n s、各対照と比べて統計的に非有意。

【0032】

一重盲検 (敗血症スコア、体温、L u m i n e x) または二重盲検 (臨床生物学、組織学的検査) のいずれかでデータ分析を実施した。G r a p h P a d P r i s m ソフトウェアを使用し、適切な試験 (指定されない限り、ノンパラメトリック M a n n - W h i t n e y) および有意性のための最低 9 5 % の信頼区間を用いて統計分析を実施した; 図面に表示される P 値は < 0 . 0 5 (*), < 0 . 0 1 (**), および < 0 . 0 0 1 (***) である。図面は、試験した全ての動物の中央値 ± 信頼区間を示すか、あるいは他の実験について表示される通りである。全ての動物を分析に含めた。

【0033】

敗血症マウスにおける炎症反応に対する L i p o g e m s (登録商標) の効果

主要エンドポイント

第 1 に、C L P または L P S の腹腔内注射のいずれかの 2 4 時間後の炎症性スコアを調べた。

L i p o g e m s (登録商標) を注射した C L P マウスの敗血症スコア (9 [8 - 1 2] ; p = 0 . 0 0 6) は、生理食塩水を注射した C L P マウス (1 7 [1 4 - 2 0] 図 1 A) と比べて、有意に低下することが観察された。生理食塩水を注射した C L P マウスでは、炎症性スコアは 5 日間高いままであり (約 1 6)、敗血症の誘発後 7 日目と 9 日目との間に急激に低下した。生理食塩水を注射した敗血症マウス群では、敗血症の誘発後 2 1 日目にスコアは 7 [5 - 9] に達した (図 1 B)。敗血症の誘発の 2 1 日後に、L i p o g e m s (登録商標) を注射した敗血症群の炎症性スコアは 3 [2 - 5] であり、敗血症未処置対照群または生理食塩水を注射した敗血症群の 5 [3 - 6] よりも低かった (p = 0 . 0 3 ; 図 1 B)。

【0034】

第 2 に、L P S 処置マウスにおける炎症の 2 4 時間後の炎症性スコアを調べた。L P S 注射の 2 4 時間後に、L i p o g e m s (登録商標) を注射した炎症性マウスの 1 0 [9 - 1 1] に対して、炎症性マウス (L P S のみを注射) の炎症性スコアは 1 6 [1 5 - 2 0] に達した (p = 0 . 0 0 0 6、図 1 C)。L P S 負荷されたマウスは 2 日以内に限界 (2 1 の炎症性スコアを有すると定義される) に達した (生存期間中央値) (図 1 C, D)。

【0035】

二次エンドポイント

L i p o g e m s (登録商標) を腹腔内注射したマウスの生存率は、生理食塩水を注射した敗血症マウスと比べて統計的に有意に改善された (6 5 % 対 2 5 % の生存マウス、炎症の誘発の 6 0 日後 p = 0 . 0 3 ; 図 2 A)。L i p o g e m s (登録商標) を注射し

10

20

30

40

50

たCLPマウスは、生理食塩水を注射した敗血症マウスと比べて、より高い体温およびその体温のより小さい降下を有した（それぞれ、 36.3 ± 0.6 対 34.9 ± 0.98 ）炎症の誘発の24時間後、 $P = 0.004$ 、図2B）。体温の差は、炎症後14日目まで保持された。炎症後19日目に、両方の群の体温は正常値に戻った（CLPおよびLipogems（登録商標）を注射したCLPでは 36.9 ± 0.38 であるのに対し、対照では 37.2 ± 0.3 、 $p = 0.34$ 、図2B）。

炎症の48時間後のLipogems（登録商標）を注射したマウスの生存率は、生理食塩水を注射したLPSマウスでは生存期間中央値がわずかに2[1-3]日であるのに対して、71%であった（7匹の動物のうち5匹、その生存期間中央値は5[3-6]日（生存期間中央値）、図1D）（ $p = 0.009$ ；図1D）。

アスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ（ASAT）、アラニンアミノトランスフェラーゼ（ALAT）、アルカリホスファターゼ（AP）、乳酸デヒドロゲナーゼ（LDH）およびクレアチンキナーゼ（CK）の血漿レベルは、非炎症性対照群と比較して、CLPマウスにおいて炎症の24時間後に統計的に高かった（図3A）。Lipogems（登録商標）を注射した場合、CLPマウスは、対照に近い生物学的パラメータを示した（図3A）。CLPの24時間後に、白血球数の初期降下が観察された。これは、CLPマウスにLipogems（登録商標）を注射したときには観察されなかった（図3B、 $p = 0.0722$ ）。CLPの誘発後の後期の時点では任意の試験条件の群の間で、白血球数の違いは検出されなかった（図3C、 $p > 0.05$ ）。

【0036】

サイトカインストームおよび臓器免疫浸潤に対するLipogems（登録商標）の効果

敗血症CLPマウスの血漿中、全てのサイトカインレベルは穿刺の24時間後に上昇した（図3、表I）。以下の炎症促進性サイトカインレベルは、未処置のCLPマウスと比べて、Lipogems（登録商標）を注射したCLPマウスにおいて有意に低下した：IL-1a、IL-1b、IL-2、IL-5、IL-6、IL-12、IL-17、GM-CSF、IFN- γ 、MIP-1a、MIP-1b、RANTES、TNF-a（図4、表I）。炎症促進性IL-6に注目すると、未処置のCLP敗血症マウスと比較して、Lipogems（登録商標）を注射した敗血症マウスにおけるそのレベルの低下が観察された（ $29628 \text{ pg} / \mu\text{l} \pm 6166$ に対して、 $9139 \text{ pg} / \mu\text{l} \pm 4307$ 、 $p = 0.0079$ 、図4、表I）。反対に、以下の抗炎症性サイトカインは増大することが分かった：IL-4、IL-10、G-CSF（図4、表I）。抗炎症性IL-4に注目すると、未処置のCLPマウスと比べて、Lipogems（登録商標）を注射したCLPマウスの血漿レベルの有意な増大が観察された（ $16.91 \text{ pg} / \mu\text{l} \pm 1.6$ に対して、 $23.96 \text{ pg} / \mu\text{l} \pm 3.6$ 、 $p = 0.008$ 、図4、表I）。敗血症の誘発の21日後に、未処置の敗血症マウスと、Lipogems（登録商標）を注射した敗血症マウスとの間に差は見出されなかった。

【0037】

10

20

30

40

50

【表 1】

	対照(生理食塩水)	敗血症24時間(CLP)	敗血症24時間+Lipogems
IL-1a	29,87±8,9	144,5±22,5	77,01±13,33 **
IL-1b	131,8±96,15	2542±475	1619±136 **
IL-2	11,6±2,1	25,65±2,9	15,81±3,6 **
IL-3	10,14±4,5	18±9,5	15,14±3,1 ns
IL-4	9,68±1,4	16,91±1,6	23,96±3,6 **
IL-5	13,33±4,4	204±116	52,83±17,7 **
IL-6	12,6±5	29628±6166	9139±4307 **
IL-10	77,49±45,5	679,5±201	1256±485 ns
IL-12	303,2±252	8085±3506	2364±939 **
IL-13	245,4±75	387,7±146	475±188 ns
IL-17	16,14±21,7	524,8±288	149,7±98,4 *
エオタキシン	469,3±63,44	4707±2181	5067±1160 ns
G-CSF	78,34±49,7	27813±6620	46441±10888 *
GM-CSF	135,2±22	346±43	221,4±69,9 **
IFN-g	13,78±8,2	131,4±103	476,5±158 *
MCP-1	107,3±90,8	26054±20324	46103±17760 ns
MIP 1a	31,09±10,1	1636±339,2	1047±183,5 *
MIP 1b	12,97±9,4	6066±4072	1565±1051 **
RANTES	56,96±49,8	1913±708	748±379 *
TNFa	198±102	683,8±114,1	420,8±126 *

【0038】

敗血症の誘発の6日後に、対照マウスと比べて、炎症性CLPマウスの肝臓におけるF4/80+、B220+およびCD3+細胞数の増大も観察された。Lipogems(登録商標)の注射の後、未処置のCLPマウスと比較して、F4/80(図5A、p=0.033); B220(図5B、p=0.024); CD3(図5C; p=0.035)の数の有意な減少が観察された。また腎臓も、Lipogems(登録商標)注射の後、試験した全ての免疫細胞型の全体的な減少を示した: F4/80(図5D、p=0.0014); B220(図5E p=0.05); CD3(図5F、p=0.03)。対照と炎症性動物とを比較すると、炎症後に検出可能なGr1陽性細胞は見出されず、従って、これらのマーカーは我々の分析に含まれないことが決定された。

【0039】

CLPの24時間後のLipogems(登録商標)効果に対するシクロオキシゲナーゼ阻害薬の効果

Lipogems(登録商標)効果がCOX経路により媒介されるかどうかを理解するために、選択されたCOX阻害薬を同時投与してこれまでのプロトコルを繰り返した。詳細には、CLPにより炎症を誘発し、敗血症の誘発の2時間後にLipogems(登録商標)を注射し、CLPの24時間後にマウスを殺した。Lipogems(登録商標)+インドメタシンの注射またはLipogems(登録商標)+NS-398の注射の24時間後(それぞれ、炎症性スコア=16.50[15-18]; p=0.001および16.00[12-19] p=0.001)に、炎症性スコアは未処置の敗血症マウ

スと比較して変化しないことが見出された(図6A)。しかしながら、Lipogems(登録商標)の効果は、SC-560との同時注射の後に影響を受けなかった(炎症性スコア: 9[8-12] Lipogems(登録商標)単独に対して、10[8-15] Lipogems(登録商標)+SC-560; $p=0.65$ 図6A)。Lipogems(登録商標)を、インドメタシン(生存率中央値26[22-29]日; $p=0.12$)またはNS-398(生存率中央値21[18-24]日; $p=0.09$)のいずれかと同時注射すると、より低い生存率が観察された。Lipogems(登録商標)単独、またはLipogems(登録商標)+SC-560を動物に注射したときに、統計的差異は検出されなかった(生存率中央値60[55-67]日; $p=0.04$ 、図6B)。

Lipogems(登録商標)+インドメタシン(3986 $\pm$ 1172の白血球/ml; $p=0.02$)またはNS-398(4068 $\pm$ 551の白血球/ml、 $p=0.01$)のいずれかを同時注射すると、Lipogems(登録商標)注射単独の場合(6307 $\pm$ 516の白血球/ml、図6C)と比較して白血球数はCLPの3日後に低下した。Lipogems(登録商標)とSC-560(6025 $\pm$ 597の白血球/ml、 $p=0.095$ 図6C)を同時注射したとき、白血球数の差は観察されなかった。Lipogems(登録商標)単独の場合と比べて、敗血症(CLP)マウスにLipogems(登録商標)+インドメタシンを注射すると炎症促進性サイトカインIL-1、IL-2、IL-5、IL-6、IL-17、IFN- γ 、MIP-1、TNF- α の血漿レベルが増強された(図6D、表II)。例えば、IL-6レベルは、Lipogems(登録商標)+インドメタシンを注射した炎症性マウスでは14225 pg/ μ l $\pm$ 1078であったのに対して、Lipogems(登録商標)を注射した炎症性マウスの血漿中では9151 pg/ μ l $\pm$ 897であった($p=0.028$ 、図6D、表II)。特定のシクロオキシゲナーゼ-1阻害薬SC-560を用いると、Lipogems(登録商標)のみを注射したCLPマウスと比べて、IL-17の血漿レベルだけが増大したが、他の炎症促進性サイトカインは全て変化しなかった(表II)。例えば、IL-6は8548 pg/ μ l $\pm$ 971の濃度を有し、Lipogems(登録商標)注射された炎症性マウスの9151 pg/ μ l $\pm$ 897と差はなかった($p=0.48$ 、表II)。

【0040】

Lipogems(登録商標)+NS-398選択的シクロオキシゲナーゼ-2阻害薬を同時注射すると類似の結果が得られ、CLP後およびLipogems(登録商標)のみを注射した群と比べて、CLPの24時間後にIL-1、IL-2、IL-6、IL-17、TNF- α の血漿レベルが増大した(図6D、表II)。IL-6に注目すると、Lipogems(登録商標)およびNS-398をマウスに同時注射したとき、CLPの24時間後に12464 pg/ μ l $\pm$ 2346の血漿濃度が観察された。これは、CLPおよびLipogems(登録商標)単独注射マウスよりも高かった(9151 pg/ μ l $\pm$ 897; $p=0.028$ 、図6F)。Lipogems(登録商標)およびインドメタシンを炎症性マウスに注射すると、CLPの24時間後にIL-4およびIL-10およびIL-13の血漿レベルの低下が検出された(図6D、表II)。同様に、CLPおよびLipogems(登録商標)注射マウスにインドメタシンを同時注射すると、IL-10の血漿濃度は2364 pg/ μ l $\pm$ 2100であった。これは、CLPおよびLipogems(登録商標)のみで観察された濃度(8839 pg/ μ l $\pm$ 1442; $p=0.028$ 、図6D、表II)よりも低かった。SC-560の注射は抗炎症性サイトカインのレベルを変化させなかった(IL-10の場合、8120 pg/ μ l $\pm$ 952.2、 $p=0.48$ 、図6D、表II)が、NS-398の注射は、抗炎症性サイトカインIL-4、IL-10、IL-13の血漿レベルを低下させた(IL-10の場合、2052 pg/ μ l $\pm$ 1158、 $p=0.03$ 、図6D、表II)。

【0041】

10

20

30

40

【表 2】

	敗血症24時間+Lipogems	敗血症24時間+Lipogems +インドメタシン	敗血症24時間+Lipogems +SC-560	敗血症24時間+Lipogems +NS-398
IL-1a	422.1±188	6788±8234 *	475.8±193 ns	10495±3695 *
IL-1b	585.4±336	16546±16711 *	332±199 ns	2845±1415 *
IL-2	492.4±219	8535±7453 *	1737±621 ns	10598±2503 *
IL-3	4164±996	3658±2120	4178±971 ns	8049±1252 ns
IL-4	27232±2168	4320±2038 *	19957±14525 ns	9299±2024 *
IL-5	3477±1018	8083±875 *	3672±2466 ns	6519±1132 ns
IL-6	9151±897	14225±1078 *	8548±971 ns	12464±2346 *
IL-10	8839±1442	2364±2100 *	8120±952 ns	2052±1158 *
IL-12	1788±1243	5181±2683 ns	4308±1800 ns	3899±2280 ns
IL-13	15284±2847	4905±2538 *	11836±3373 ns	2711±1185 *
IL-17	4562±2144	28917±15527 ns	4079±1741*	14195±6154 ns
エオタキシン	17223±20109	8321±4862 ns	9403±557 ns	7418±427 ns
G-CSF	10672±7550	3793±816 ns	5749±911 ns	2063±1221 ns
IFN-g	4528±1830	24465±7231 *	9345±3392 ns	13140±9227 ns
MCP-1	4034±1626	18650±11861 ns	5723±2317 ns	6785±2252 ns
MIP 1a	2185±341	5198±1512 ns	2189±1686 ns	3846±538 ns
MIP 1b	263.7±259	859.7±111 *	455.8±284 ns	569±75 ns
RANTES	3727±2359	14678±1006 *	3565±704 ns	10655±1498 *
TNFA	4282±1007	16016±5019 *	5166±2422 ns	9437±1720 *

10

【 0 0 4 2 】

結論

上記に例示されたデータは、微小断片化脂肪（Lipogems（登録商標））の腹腔内投与が、敗血症、特に急性期の敗血症の有害な影響を効率的に低減することを示す。

20

実際、データは、微小断片化脂肪で処置した敗血症マウスの生存率の改善および敗血症スコアの持続的な低下を実証する。加えて、マウスの体温は37℃に近く、炎症促進性サイトカインのレベルは低下するが、抗炎症性サイトカインのレベルは上昇する。吸引脂肪組織の腹腔内投与などの敗血症マウスのさらなる処置は同じ結果を示さなかった。

さらに、上記に報告されたデータは、Lipogems（登録商標）微小断片化脂肪がプロスタグランジン経路により作用することを実証する。特に、COX-2の酵素活性はその抗炎症性効果に不可欠である。実際、インドメタシン（強力なプロスタグランジン合成の抑制因子）の投与は、敗血症マウスにおけるLipogems（登録商標）微小断片化脂肪の投与の効果を遮断する。従って、Lipogems（登録商標）微小断片化脂肪は、プロスタグランジン合成および非COX標的に影響を与える。

30

【 0 0 4 3 】

敗血症マウスへの微小断片化脂肪組織の注射の長期にわたる効果

Lipogems抽出による微小断片化脂肪は、敗血症の急性期の炎症を減少させることが示された。敗血症の長期にわたる影響の1つは、1) 5年間持続し得る筋力低下、および2) 認知機能障害であり得る。敗血症の誘発の数日後にLipogems（微小断片化脂肪組織）がマウスに注射されると、ミクログリア細胞（脳の免疫細胞）はあまり損なわれないことが実験的に実証された。特に、Lipogems注射は、敗血症マウスの前頭皮質および海馬におけるミクログリア細胞の脱分岐（deramification）を低減し、従って、敗血症の慢性期におけるLipogems注射はミクログリア細胞の挙動を改善する。

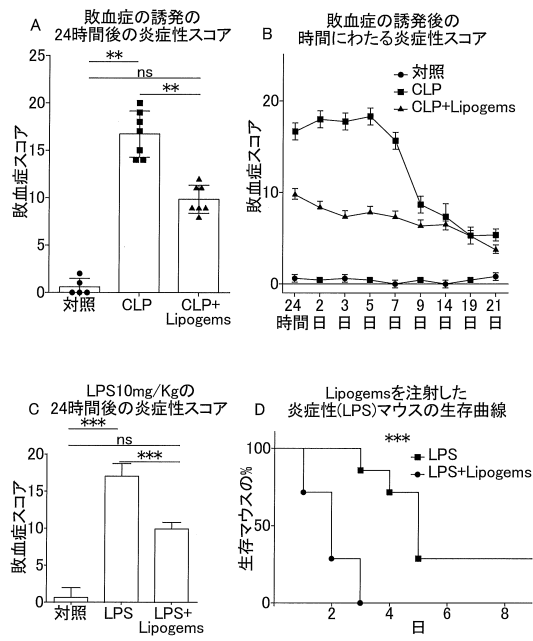
40

結論として、微小断片化脂肪の注射は、敗血症に関連する/敗血症によって引き起こされる認知機能障害を防止または改善/低減することが示された。

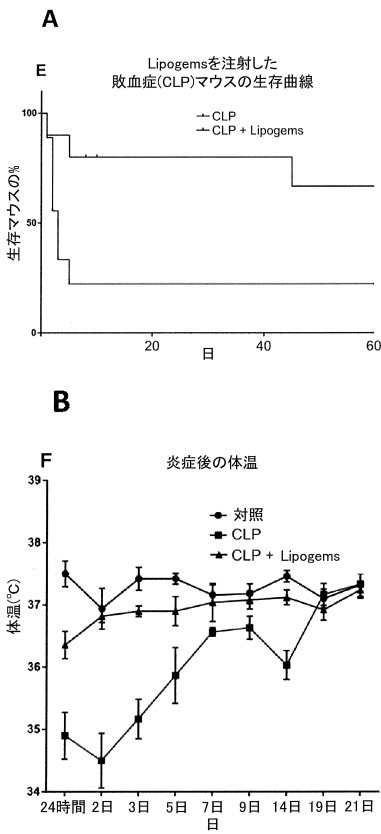
さらに、Pax7+細胞の数を測定し、Lipogemsの後期投与の後に敗血症マウスにおけるサテライト細胞の低減を見出した。

【図面】

【図 1】



【図 2】



10

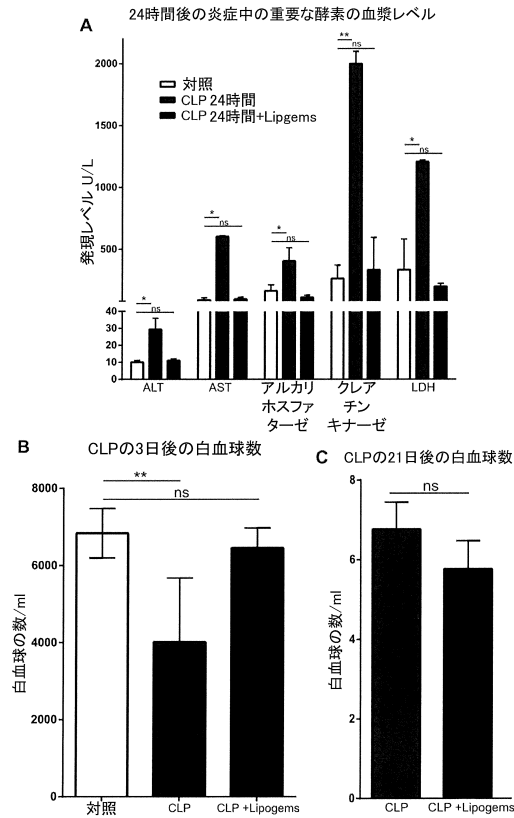
20

30

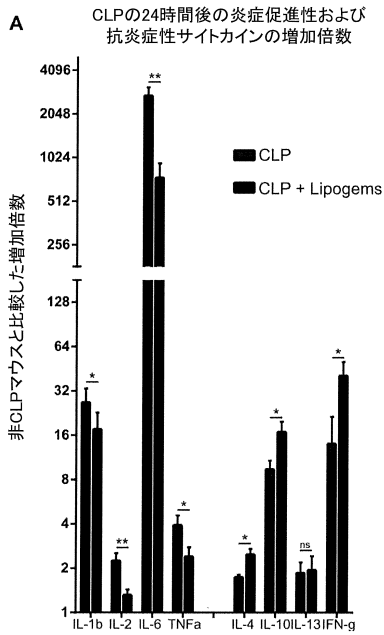
40

50

【図 3】



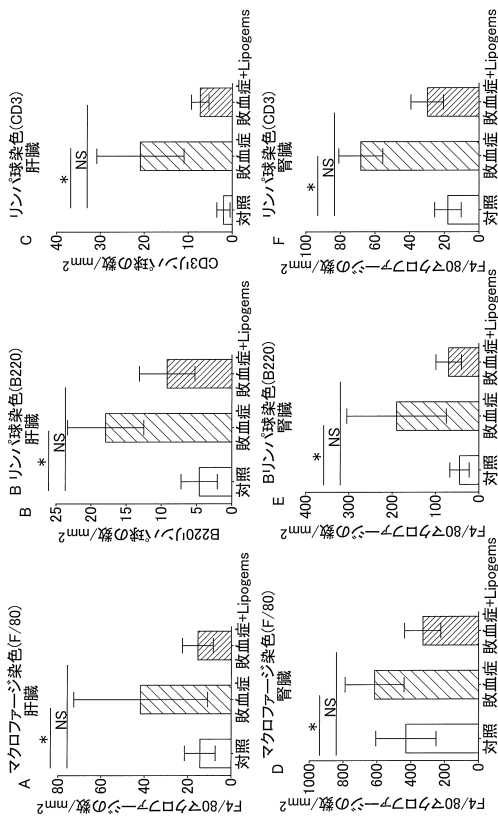
【図 4】



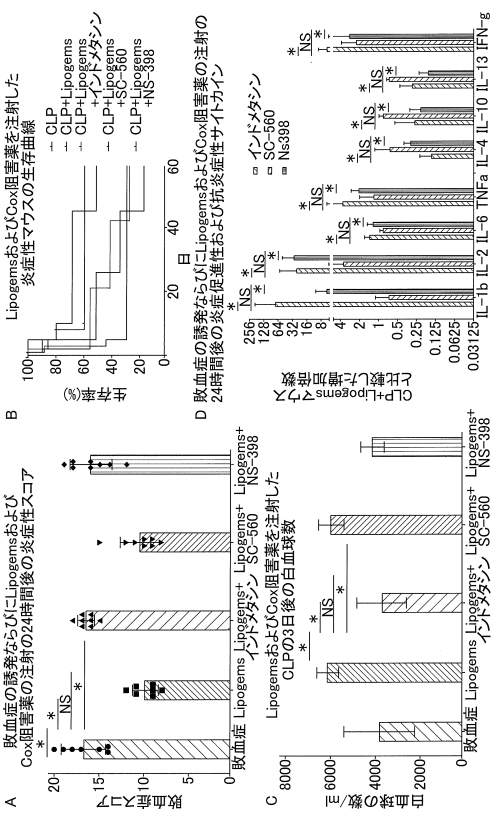
10

20

【図 5】



【図 6】



30

40

50

 フロントページの続き

イタリア(IT)
 イド 63

合議体

審判長 富永 みどり

審判官 山村 祥子

審判官 松波 由美子

(56)参考文献 特表 2013 - 526868 号公報 (JP, A)

FANUEL MESSAGGIO, MESENCHYMAL STEM CELLS FROM HUMAN ADIPOSE TISSUE, [ONLINE], UNIVERSITA DEGLI STUDI DI MILANO, 2013年01月, <http://web.archive.org/>にて2016.4.18収録時のファイルを取得 [検索日 2021.05.14]インターネット URL:<http://lipogems.eu/docs/pubblicazioni/Messaggio-2013.pdf>

GONZALEZ-REY E; ET AL, HUMAN ADULT STEM CELLS DERIVED FROM ADIPOSE TISSUE PROTECT AGAINST EXPERIMENTAL COLITIS AND SEPSIS, GUT, 英国, BRITISH MEDICAL ASSOCIATION, 2009年07月, VOL:58, NR:7, PAGE(S):929 - 939, <http://dx.doi.org/10.1136/gut.2008.168534>

(58)調査した分野 (Int.Cl., DB名)

A61K35/00

Caplus / MEDLINE / EMBASE / BIOSIS (STN)

JSTPlus / JMEDPlus / JST7580 (JDreamII)