

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 公表特許公報 (A)

(11) 特許出願公表番号

特表2013-509258

(P2013-509258A)

(43) 公表日 平成25年3月14日 (2013.3.14)

|                                |               |             |
|--------------------------------|---------------|-------------|
| (51) Int.Cl.                   | F I           | テーマコード (参考) |
| <b>A 6 1 F 2/04 (2013.01)</b>  | A 6 1 F 2/04  | 4 C 0 8 1   |
| <b>A 6 1 F 2/06 (2013.01)</b>  | A 6 1 F 2/06  | 4 C 0 9 7   |
| <b>A 6 1 L 27/00 (2006.01)</b> | A 6 1 L 27/00 | Q           |
|                                | A 6 1 L 27/00 | P           |

審査請求 有 予備審査請求 未請求 (全 98 頁)

|               |                              |          |                                                                                               |
|---------------|------------------------------|----------|-----------------------------------------------------------------------------------------------|
| (21) 出願番号     | 特願2012-537051 (P2012-537051) | (71) 出願人 | 501102988                                                                                     |
| (86) (22) 出願日 | 平成22年10月28日 (2010.10.28)     |          | ユニバーシティ オブ ピッツバーグ オブ<br>ザ コモンウェルス システム オブ<br>ハイヤー エデュケーション                                    |
| (85) 翻訳文提出日   | 平成24年6月25日 (2012.6.25)       |          | アメリカ合衆国 ペンシルベニア 152<br>60, ピッツバーグ, サッカレイ ア<br>ンド オハラ ストリーツ, ガードナー<br>スチール カンファレンス センター<br>200 |
| (86) 国際出願番号   | PCT/US2010/054444            |          |                                                                                               |
| (87) 国際公開番号   | W02011/056705                | (71) 出願人 | 512106355                                                                                     |
| (87) 国際公開日    | 平成23年5月12日 (2011.5.12)       |          | ネオグラフト・テクノロジーズ, インコー<br>ポレーテッド                                                                |
| (31) 優先権主張番号  | 61/255,699                   |          | アメリカ合衆国マサチューセッツ州027<br>80, トーントン, コンスティテューショ<br>ン・ドライブ 470, スイート ビー                           |
| (32) 優先日      | 平成21年10月28日 (2009.10.28)     |          | 最終頁に続く                                                                                        |
| (33) 優先権主張国   | 米国 (US)                      |          |                                                                                               |

(54) 【発明の名称】 生体浸食性ラップおよびそのための使用

## (57) 【要約】

管状部材と、管状組織の円周に沿った生体浸食性ポリマーの拘束性繊維マトリックスとを含む、管状組織グラフトデバイスが提供される。マトリックスは、管状組織にエレクトロスピンニングされてもよい。一実施形態では、管状組織は、例えば、限定するものではないが、冠動脈バイパス処置における人工グラフトとして有用な伏在静脈などの静脈から得られる。管状組織グラフトデバイスを生成するために、管状組織の周囲に沿って生体浸食性ポリマーの繊維マトリックスを堆積するステップを含む、管状グラフトを調製する方法も提供される。静脈と、静脈の円周に沿って生体浸食性ポリマーの拘束性繊維マトリックスとを含む管状組織グラフトデバイスで冠動脈をバイパスするステップを含む、心臓バイパス法も提供される。

【選択図】 図 3 2

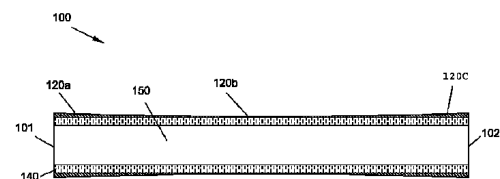


Fig. 32

## 【特許請求の範囲】

## 【請求項 1】

a. 管状部材と；

b. 前記管状部材の円周に沿って配置されたポリマーを含む拘束性繊維マトリックスとを含む、患者に使用されるグラフトデバイスであって、

前記グラフトデバイスの一部が、患者の評価から決定されたパラメータに適合しまたは修正されるように構成されているグラフトデバイス。

## 【請求項 2】

前記評価された患者パラメータが：年齢；性別；人種；血圧；血液検査情報；家族歴情報；ストレス試験データ；およびこれらの組合せからなる群から選択される、請求項 1 に記載のデバイス。

## 【請求項 3】

前記評価された患者パラメータが：血管形状情報、血管直径情報、または血管壁厚情報などの幾何学的情報；採取された血管の、弱くなったセクションに関する情報、血管の構造的性質に関する情報、または血管の弾性の試験から得られる情報などの機械的性質情報；およびこれらの組合せからなる群から選択される、請求項 1 に記載のデバイス。

## 【請求項 4】

前記管状部材が、採取された血管を含む、請求項 1 に記載のデバイス。

## 【請求項 5】

前記評価された患者パラメータが、採取された血管のパラメータを含む、請求項 4 に記載のデバイス。

## 【請求項 6】

前記グラフトデバイスの部分が、患者の評価から決定されたパラメータに適合しまたは修正されるように構成された製造プロセスパラメータを含む、請求項 1 に記載のデバイス。

## 【請求項 7】

前記製造プロセスパラメータが：一定のまたは可変の厚さなどの繊維マトリックス形状；繊維マトリックス材料または材料の組合せ；繊維マトリックスの半径方向の強度；繊維マトリックスの半径方向の剛性；繊維マトリックスの曲げ剛性；繊維直径、繊維分解速度；繊維マトリックス拡散特性；繊維マトリックス湿潤性；およびこれらの組合せからなる群から選択される、請求項 6 に記載のデバイス。

## 【請求項 8】

前記拘束性繊維マトリックスが、第 1 の機械的性質を有する第 1 の繊維と、異なる機械的性質を有する第 2 の繊維とを含む、請求項 6 に記載のデバイス。

## 【請求項 9】

前記第 1 の繊維および前記第 2 の繊維が、同時に送達され、順次送達され、または同時にかつ順次送達される、請求項 8 に記載のデバイス。

## 【請求項 10】

湿式スピニング；乾式スピニング；ゲルスピンニング；または溶融スピニングの 1 つまたは複数によって生成された繊維を含む、請求項 1 に記載のデバイス。

## 【請求項 11】

前記グラフトデバイスの一部が、閉ループ製造プロセスで構成される、請求項 1 に記載のデバイス。

## 【請求項 12】

前記閉ループプロセスが：マトリックスの厚さ；デバイス温度および／または室温などの温度；室内湿度；繊維堆積速度；繊維堆積持続時間；溶媒濃度；流体粘度、電界強度；マンドレル回転速度；ノズル並進速度；ターゲットからのノズルの距離；堆積される材料のタイプ；およびこれらの組合せからなる群から選択されたパラメータを監視し調節する、請求項 11 に記載のデバイス。

## 【請求項 13】

前記繊維マトリックスが、その長さ、円周、または長さおよび円周の両方に沿って変化する少なくとも1つの性質を含む、請求項11に記載のデバイス。

【請求項14】

前記閉ループ製造プロセスが、その間にパラメータが測定される繊維堆積休止事象を含む、請求項11に記載のデバイス。

【請求項15】

前記測定されたパラメータが：デバイスまたはマトリックスの厚さ；デバイスまたはマトリックスの剛性；堆積されたポリマーの量；繊維マトリックス中の溶媒の定量化；穿刺の存在；静脈の焼けなどの管状部材の存在または焼け；およびこれらの組合せからなる群から選択される、請求項14に記載のデバイス。

10

【請求項16】

表3に列挙される群から選択された仕様またはプロセスパラメータを含む、請求項1に記載のデバイス。

【請求項17】

採取された血管が、採取された伏在静脈を含む、請求項4に記載のデバイス。

【請求項18】

前記管状部材が人工グラフトを含む、請求項1に記載のデバイス。

【請求項19】

前記人工グラフトが：固体；編組み；編上げ；および巻き付けられた材料からなる群から選択される、請求項18に記載のデバイス。

20

【請求項20】

前記人工グラフトがチューブまたはコイルを含む、請求項18に記載のデバイス。

【請求項21】

前記管状部材が金属構造を含む、請求項1に記載のデバイス。

【請求項22】

前記金属構造が：Nitinol；ステンレス鋼；エルジロイ；タンタル；MP35N；再吸収金属、特にマグネシウム；およびこれらの組合せからなる群から選択された材料を含む、請求項21に記載のデバイス。

【請求項23】

前記管状部材が、編み組まれた構造を含む、請求項1に記載のデバイス。

30

【請求項24】

前記編み組まれた構造が：固体；編組み；編上げ；および巻き付けられた材料の、チューブまたはコイルからなる群から選択される、請求項23に記載のデバイス。

【請求項25】

前記繊維マトリックスが、少なくとも生体浸食性部分を含む、請求項1に記載のデバイス。

【請求項26】

前記少なくとも生体浸食性部分が、非線形分解になるように構成される、請求項25に記載のデバイス。

【請求項27】

前記繊維マトリックスが、前記繊維マトリックスの長さに沿って変化する厚さを含む、請求項1に記載のデバイス。

40

【請求項28】

前記繊維マトリックスが、その長さに沿ってステップ型形状を含む、請求項27に記載のデバイス。

【請求項29】

前記繊維マトリックスが、その長さに沿ってテーパ型形状を含む、請求項27に記載のデバイス。

【請求項30】

前記繊維マトリックスが、前記繊維マトリックスの円周の少なくとも一部に沿って変化する

50

する厚さを含む、請求項 1 に記載のデバイス。

【請求項 3 1】

前記繊維マトリックスが、前記繊維マトリックスの長さに沿って変化する半径方向の力を含む、請求項 1 に記載のデバイス。

【請求項 3 2】

前記繊維マトリックスが、前記繊維マトリックスの長さ、前記繊維マトリックスの円周、または前記繊維マトリックスの長さおよび円周の両方に沿って変化する少なくとも 1 つのパラメータを含む、請求項 1 に記載のデバイス。

【請求項 3 3】

前記少なくとも 1 つのパラメータが：繊維直径または繊維マトリックス多孔度の少なくとも 1 つを含む、請求項 3 2 に記載のデバイス。

10

【請求項 3 4】

前記少なくとも 1 つのパラメータが：引裂き強さ；歪み抵抗；または生分解性パラメータの少なくとも 1 つを含む、請求項 3 2 に記載のデバイス。

【請求項 3 5】

前記繊維マトリックスが、第 1 の部分および第 2 の部分を含み、前記少なくとも 1 つのパラメータが、前記第 1 の部分に第 1 の値を、前記第 2 の部分に異なる値を含む、請求項 3 2 に記載のデバイス。

【請求項 3 6】

前記少なくとも 1 つのパラメータが、比較的連続的に変化する、請求項 3 2 に記載のデバイス。

20

【請求項 3 7】

前記デバイスが、吻合接続を支持するように構成された部分を含み、前記少なくとも 1 つのパラメータが、前記吻合接続部分では異なる、請求項 3 2 に記載のデバイス。

【請求項 3 8】

前記少なくとも 1 つのパラメータが、患者の評価から決定されたパラメータに適合または修正されるように変化する、請求項 3 2 に記載のデバイス。

【請求項 3 9】

前記少なくとも 1 つのパラメータが、患者への移植後に前記グラフトデバイスの性能が最適化されるように変化する、請求項 3 2 に記載のデバイス。

30

【請求項 4 0】

前記性能が、長期間にわたる開存度を含む、請求項 3 9 に記載のデバイス。

【請求項 4 1】

前記グラフトデバイスの部分が終端部分を含む、請求項 1 に記載のデバイス。

【請求項 4 2】

前記終端部分が、吻合接続を支持するように構成され配置される、請求項 4 1 に記載のデバイス。

【請求項 4 3】

前記グラフトデバイスの部分が中間部分を含む、請求項 1 に記載のデバイス。

【請求項 4 4】

40

前記管状部材の円周に沿って配置された足場アセンブリをさらに含む、請求項 1 に記載のデバイス。

【請求項 4 5】

前記足場アセンブリが：ステント；浸漬カバー；人工グラフト；およびこれらの組合せからなる群から選択される、請求項 4 4 に記載のデバイス。

【請求項 4 6】

前記足場アセンブリが、前記繊維マトリックスの外側に位置決めされる、請求項 4 4 に記載のデバイス。

【請求項 4 7】

前記足場アセンブリが、前記繊維マトリックスの内側に位置決めされる、請求項 4 4 に

50

記載のデバイス。

【請求項 4 8】

前記足場アセンブリが、前記管状部材の外側に位置決めされる、請求項 4 7 に記載のデバイス。

【請求項 4 9】

前記足場アセンブリが、前記管状部材の内側に位置決めされる、請求項 4 4 に記載のデバイス。

【請求項 5 0】

前記足場アセンブリが、前記繊維マトリックスによって提供される半径方向の力の支持とは異なる半径方向の力の支持を提供するように、構成され配置される、請求項 4 4 に記載のデバイス。

10

【請求項 5 1】

前記足場アセンブリが単層構造を含む、請求項 4 4 に記載のデバイス。

【請求項 5 2】

前記足場アセンブリが多層構造を含む、請求項 4 4 に記載のデバイス。

【請求項 5 3】

前記多層構造が第 1 の層および第 2 の層を含み、前記第 1 の層が第 2 の層に撚り合わされている、請求項 5 2 に記載のデバイス。

【請求項 5 4】

a. 患者の評価から患者パラメータを決定するステップと；

20

b. 管状部材を提供するステップと；

c. 前記管状部材の円周に沿って配置されたポリマーを含む拘束性繊維マトリックスを付着させるステップであって、前記拘束性繊維マトリックスの一部が前記患者パラメータに適応しまたは修正されるように付着されているステップとを含む、患者に使用されるグラフトデバイスを製造する方法。

【請求項 5 5】

患者パラメータが：グラフトデバイスを使用するための解剖学的位置；管状部材の特性；およびこれらの組合せからなる群から選択される、請求項 5 4 に記載の方法。

【請求項 5 6】

管状部材の特性が、管状部材の直径；管状部材の壁厚；および管状部材の弾性の 1 つまたは複数を含む、請求項 5 5 に記載の方法。

30

【請求項 5 7】

厚さ；材料；半径方向の強度；曲げ剛性；繊維直径；繊維分解速度；拡散特性；湿潤性、およびこれらの組合せの 1 つまたは複数が最適化されて前記患者パラメータに適合しまたは修正されるように、前記拘束性繊維マトリックスの部分が付着される、請求項 5 4 に記載の方法。

【請求項 5 8】

前記拘束性繊維マトリックスの 1 つまたは複数の領域が、ラプラスの法則に従い使用される間に所定量の円周方向の応力をもたらす平均厚さを有する、請求項 5 7 に記載の方法。

40

【請求項 5 9】

前記管状部材が、採取された血管である、請求項 5 4 に記載の方法。

【請求項 6 0】

前記患者パラメータが、採取された血管のパラメータを含む、請求項 5 9 に記載の方法。

【請求項 6 1】

前記管状部材の円周に沿って配置されたポリマーが生体浸食性である、請求項 5 4 に記載の方法。

【請求項 6 2】

a. 管状部材と；

50

b. 前記管状部材の円周に沿って配置されたポリマーを含む拘束性繊維マトリックスと  
;

c. 前記管状部材の円周に沿って配置された足場アセンブリと  
を含む、患者に使用されるグラフトデバイス。

【請求項 6 3】

前記足場アセンブリが：ステント；浸漬カバー；人工グラフト；およびこれらの組合せからなる群から選択される、請求項 6 2 に記載のデバイス。

【請求項 6 4】

前記足場アセンブリが、前記繊維マトリックスの外側に位置決めされる、請求項 6 2 に記載のデバイス。

【請求項 6 5】

前記足場アセンブリが、前記繊維マトリックスの内側に位置決めされる、請求項 6 2 に記載のデバイス。

【請求項 6 6】

前記足場アセンブリが、前記管状部材の外側に位置決めされる、請求項 6 5 に記載のデバイス。

【請求項 6 7】

前記足場アセンブリが、前記管状部材の内側に位置決めされる、請求項 6 2 に記載のデバイス。

【請求項 6 8】

前記足場アセンブリが、前記繊維マトリックスによって提供される半径方向の力の支持とは異なる半径方向の力の支持を提供するように構成され配置される、請求項 6 2 に記載のデバイス。

【請求項 6 9】

前記足場アセンブリが単層構造を含む、請求項 6 2 に記載のデバイス。

【請求項 7 0】

前記足場アセンブリが多層構造を含む、請求項 6 2 に記載のデバイス。

【請求項 7 1】

前記多層構造が、第 1 の層および第 2 の層を含み、前記第 1 の層が前記第 2 の層に撚り合わされている、請求項 7 0 に記載のデバイス。

【請求項 7 2】

前記グラフトデバイスの一部が、前記患者の評価から決定されたパラメータに適合したまたは修正されるように構成される、請求項 6 2 に記載のデバイス。

【請求項 7 3】

前記評価された患者パラメータが：年齢；性別；人種；血圧；血液検査情報；家族歴情報；ストレス試験データ；およびこれらの組合せからなる群から選択される、請求項 7 2 に記載のデバイス。

【請求項 7 4】

前記評価された患者パラメータが：血管形状情報、血管直径情報、または血管壁厚情報などの幾何学的情報；採取された血管の、弱くなったセクションに関する情報、血管の構造的性質に関する情報、または血管の弾性の試験から得られる情報などの機械的性質情報；およびこれらの組合せからなる群から選択される、請求項 7 2 に記載のデバイス。

【請求項 7 5】

前記管状部材が、採取された血管を含む、請求項 7 2 に記載のデバイス。

【請求項 7 6】

前記評価された患者パラメータが、採取された血管のパラメータを含む、請求項 7 5 に記載のデバイス。

【請求項 7 7】

前記グラフトデバイスの部分が、前記患者の評価から決定されたパラメータに適合したまたは修正されるように構成された製造プロセスパラメータを含む、請求項 7 2 に記載のデ

10

20

30

40

50

バイス。

【請求項 78】

前記製造プロセスパラメータが：一定のまたは可変の厚さなどの繊維マトリックス形状；繊維マトリックス材料または材料の組合せ；繊維マトリックスの半径方向の強度；繊維マトリックスの半径方向の剛性；繊維マトリックスの曲げ剛性；繊維直径；繊維分解速度；繊維マトリックス拡散特性；繊維マトリックス湿潤性；およびこれらの組合せからなる群から選択される、請求項 77 に記載のデバイス。

【請求項 79】

前記繊維マトリックスが、第 1 の機械的性質を有する第 1 の繊維と、異なる機械的性質を有する第 2 の繊維とを含む、請求項 78 に記載のデバイス。

10

【請求項 80】

前記第 1 の繊維および第 2 の繊維が、同時に送達され、順次送達され、または同時にかつ順次送達される、請求項 79 に記載のデバイス。

【請求項 81】

湿式スピニング；乾式スピニング；ゲルスピニング；または熔融スピニングの 1 つまたは複数によって生成された繊維を含む、請求項 62 に記載のデバイス。

【請求項 82】

前記グラフトデバイスの一部が、閉ループ製造プロセスで構成される、請求項 62 に記載のデバイス。

【請求項 83】

前記閉ループプロセスが：マトリックスの厚さ；デバイス温度および／または室温などの温度；室内湿度；繊維堆積速度；繊維堆積持続時間；溶媒濃度；流体粘度；電界強度；マンドレル回転速度；ノズル並進速度；ターゲットからのノズルの距離；堆積される材料のタイプ；およびこれらの組合せからなる群から選択されたパラメータを監視し調節する、請求項 82 に記載のデバイス。

20

【請求項 84】

前記繊維マトリックスが、その長さ、円周、または長さおよび円周の両方に沿って変化する少なくとも 1 つの性質を含む、請求項 82 に記載のデバイス。

【請求項 85】

前記閉ループ製造プロセスが、その間にパラメータが測定される繊維堆積休止事象を含む、請求項 82 に記載のデバイス。

30

【請求項 86】

前記測定されたパラメータが：デバイスまたはマトリックスの厚さ；デバイスまたはマトリックスの剛性；堆積されたポリマーの量；繊維マトリックス中の溶媒の定量化；穿刺の存在；静脈の焼けなどの管状部材の存在または焼け；およびこれらの組合せからなる群から選択される、請求項 85 に記載のデバイス。

【請求項 87】

表 3 に列挙される群から選択された仕様またはプロセスパラメータを含む、請求項 62 に記載のデバイス。

【請求項 88】

前記管状部材が、採取された血管を含む、請求項 62 に記載のデバイス。

40

【請求項 89】

前記採取された血管が、採取された伏在静脈を含む、請求項 88 に記載のデバイス。

【請求項 90】

前記管状部材が人工グラフトを含む、請求項 62 に記載のデバイス。

【請求項 91】

前記人工グラフトが：固体；編組み；編上げ；および巻き付けられた材料のチューブまたはコイルからなる群から選択される、請求項 90 に記載のデバイス。

【請求項 92】

前記管状部材が金属構造を含む、請求項 62 に記載のデバイス。

50

## 【請求項 93】

前記金属構造が：Nitinol；ステンレス鋼；エルジロイ；タンタル；MP35N；再吸収金属、特にマグネシウム；およびこれらの組合せからなる群から選択された材料を含む、請求項 92 に記載のデバイス。

## 【請求項 94】

前記管状部材が編組み構造を含む、請求項 62 に記載のデバイス。

## 【請求項 95】

前記編組み構造が：固体；編組み；編上げ；および巻き付けられた材料のチューブまたはコイルからなる群から選択される、請求項 94 に記載のデバイス。

## 【請求項 96】

前記繊維マトリックスが少なくとも生体浸食性部分を含む、請求項 62 に記載のデバイス。

## 【請求項 97】

前記少なくとも生体浸食性部分が、非線形分解となるように構成される、請求項 96 に記載のデバイス。

## 【請求項 98】

前記繊維マトリックスが、前記繊維マトリックスの長さに沿って変化する厚さを含む、請求項 62 に記載のデバイス。

## 【請求項 99】

前記繊維マトリックスが、その長さに沿ってステップ型形状を含む、請求項 98 に記載のデバイス。

## 【請求項 100】

前記繊維マトリックスが、その長さに沿ってテーパ型形状を含む、請求項 98 に記載のデバイス。

## 【請求項 101】

前記繊維マトリックスが、前記繊維マトリックスの円周の少なくとも一部に沿って変化する厚さを含む、請求項 62 に記載のデバイス。

## 【請求項 102】

前記繊維マトリックスが、前記繊維マトリックスの長さに沿って変化する、半径方向の力を含む、請求項 62 に記載のデバイス。

## 【請求項 103】

前記繊維マトリックスが、前記繊維マトリックスの長さ、前記繊維マトリックスの円周、または前記繊維マトリックスの長さおよび円周の両方に沿って変化する少なくとも 1 つのパラメータを含む、請求項 62 に記載のデバイス。

## 【請求項 104】

前記少なくとも 1 つのパラメータが：繊維直径または繊維マトリックス多孔度の少なくとも 1 つを含む、請求項 103 に記載のデバイス。

## 【請求項 105】

前記少なくとも 1 つのパラメータが：引裂き強さ；歪み抵抗；または生分解性パラメータの少なくとも 1 つを含む、請求項 103 に記載のデバイス。

## 【請求項 106】

前記繊維マトリックスが第 1 の部分および第 2 の部分を含み、前記少なくとも 1 つのパラメータが、前記第 1 の部分に第 1 の値を、前記第 2 の部分に異なる値を含む、請求項 103 に記載のデバイス。

## 【請求項 107】

前記少なくとも 1 つのパラメータが、比較的連続的に変化する、請求項 103 に記載のデバイス。

## 【請求項 108】

前記デバイスが、吻合接続を支持するように構成された部分を含み、前記少なくとも 1 つのパラメータが、前記吻合接続部分で異なっている、請求項 103 に記載のデバイス。

10

20

30

40

50

**【請求項 1 0 9】**

前記少なくとも 1 つのパラメータが、前記患者の評価から決定されたパラメータに適合しまたは修正されるように変化する、請求項 1 0 3 に記載のデバイス。

**【請求項 1 1 0】**

前記少なくとも 1 つのパラメータが、患者への移植後に前記グラフトデバイスの性能が最適化されるように変化する、請求項 1 0 3 に記載のデバイス。

**【請求項 1 1 1】**

前記性能が、長期間にわたる開存度を含む、請求項 1 1 0 に記載のデバイス。

**【請求項 1 1 2】**

前記グラフトデバイスの部分が終端部分を含む、請求項 6 2 に記載のデバイス。

10

**【請求項 1 1 3】**

前記終端部分が、吻合接続を支持するように構成され配置される、請求項 1 1 2 に記載のデバイス。

**【請求項 1 1 4】**

前記グラフトデバイスの部分が、中間部分を含む、請求項 6 2 に記載のデバイス。

**【請求項 1 1 5】**

a. ある長さおよびある円周を含む管状部材と；

b. 前記管状部材の長さおよび円周に沿って配置されたポリマーを含む拘束性繊維マトリックスと

を含み、

20

前記繊維マトリックスは、前記繊維マトリックスの長さ、前記繊維マトリックスの円周、または前記繊維マトリックスの長さおよび円周の両方に沿って変化する少なくとも 1 つのパラメータを含む、患者に使用されるグラフトデバイス。

**【請求項 1 1 6】**

前記少なくとも 1 つのパラメータが：繊維直径または繊維マトリックス多孔度の少なくとも 1 つを含む、請求項 1 1 5 に記載のデバイス。

**【請求項 1 1 7】**

前記少なくとも 1 つのパラメータが：引裂き強さ；歪み抵抗；または生分解パラメータの少なくとも 1 つを含む、請求項 1 1 5 に記載のデバイス。

**【請求項 1 1 8】**

前記繊維マトリックスが第 1 の部分および第 2 の部分を含み、前記少なくとも 1 つのパラメータが、前記第 1 の部分に第 1 の値を、前記第 2 の部分に異なる値を含む、請求項 1 1 5 に記載のデバイス。

30

**【請求項 1 1 9】**

前記少なくとも 1 つのパラメータが、比較的連続的に変化する、請求項 1 1 5 に記載のデバイス。

**【請求項 1 2 0】**

前記デバイスが、吻合接続を支持するように構成された部分を含み、前記少なくとも 1 つのパラメータが、前記吻合接続部分で異なっている、請求項 1 1 5 に記載のデバイス。

**【請求項 1 2 1】**

前記少なくとも 1 つのパラメータが、前記患者の評価から決定されたパラメータに適合しまたは修正されるように変化する、請求項 1 1 5 に記載のデバイス。

40

**【請求項 1 2 2】**

前記少なくとも 1 つのパラメータが、患者への移植後に前記グラフトデバイスの性能が最適化されるように変化する、請求項 1 1 5 に記載のデバイス。

**【請求項 1 2 3】**

前記性能が、長期間にわたる開存度を含む、請求項 1 2 2 に記載のデバイス。

**【請求項 1 2 4】**

前記グラフトデバイスの部分が、前記患者の評価から決定されたパラメータに適合しまたは修正されるように構成される、請求項 1 1 5 に記載のデバイス。

50

## 【請求項 1 2 5】

前記評価された患者パラメータが：年齢；性別；人種；血圧；血液検査情報；家族歴情報；ストレス試験データ；およびこれらの組合せからなる群から選択される、請求項 1 2 4 に記載のデバイス。

## 【請求項 1 2 6】

前記評価された患者パラメータが：血管形状情報、血管直径情報、または血管壁厚情報などの幾何学的情報；採取された血管の、弱くなったセクションに関する情報、血管の構造的性質に関する情報、または血管の弾性の試験から得られる情報などの機械的性質情報；およびこれらの組合せからなる群から選択される、請求項 1 2 4 に記載のデバイス。

## 【請求項 1 2 7】

前記管状部材が、採取された血管を含む、請求項 1 2 4 に記載のデバイス。

## 【請求項 1 2 8】

前記評価された患者パラメータが、採取された血管のパラメータを含む、請求項 1 2 7 に記載のデバイス。

## 【請求項 1 2 9】

前記グラフトデバイスの部分が、前記患者の評価から決定されたパラメータに適合しまたは修正されるように構成された製造プロセスパラメータを含む、請求項 1 2 4 に記載のデバイス。

## 【請求項 1 3 0】

前記製造プロセスパラメータが：一定のまたは可変の厚さなどの繊維マトリックス形状；繊維マトリックス材料または材料の組合せ；繊維マトリックスの半径方向の強度；繊維マトリックスの半径方向の剛性；繊維マトリックスの曲げ剛性；繊維直径；繊維分解速度；繊維マトリックス拡散特性；繊維マトリックス湿潤性；およびこれらの組合せからなる群から選択される、請求項 1 2 9 に記載のデバイス。

## 【請求項 1 3 1】

前記繊維マトリックスが、第 1 の機械的性質を有する第 1 の繊維と、異なる機械的性質を有する第 2 の繊維とを含む、請求項 1 3 0 に記載のデバイス。

## 【請求項 1 3 2】

前記第 1 の繊維および第 2 の繊維が、同時に送達され、順次送達され、または同時にかつ順次送達される、請求項 1 3 1 に記載のデバイス。

## 【請求項 1 3 3】

湿式スピニング；乾式スピニング；ゲルスピニング；または溶融スピニングの 1 つまたは複数によって生成された繊維を含む、請求項 1 1 5 に記載のデバイス。

## 【請求項 1 3 4】

前記グラフトデバイスの一部が、閉ループ製造プロセスで構成される、請求項 1 1 5 に記載のデバイス。

## 【請求項 1 3 5】

前記閉ループプロセスが：マトリックスの厚さ；デバイス温度および／または室温などの温度；室内湿度；繊維堆積速度；繊維堆積持続時間；溶媒濃度；流体粘度；電界強度；マンドレル回転速度；ノズル並進速度；ターゲットからのノズルの距離；堆積される材料のタイプ；およびこれらの組合せからなる群から選択されたパラメータを監視し調節する、請求項 1 3 4 に記載のデバイス。

## 【請求項 1 3 6】

前記繊維マトリックスが、その長さ、円周、または長さおよび円周の両方に沿って変化する少なくとも 1 つの性質を含む、請求項 1 3 4 に記載のデバイス。

## 【請求項 1 3 7】

前記閉ループ製造プロセスが、その間にパラメータが測定される繊維堆積休止事象を含む、請求項 1 3 4 に記載のデバイス。

## 【請求項 1 3 8】

前記測定されたパラメータが：デバイスまたはマトリックスの厚さ；デバイスまたはマ

10

20

30

40

50

トリックスの剛性；堆積されたポリマーの量；前記繊維マトリックス中の溶媒の定量化；穿刺の存在；静脈の焼けなどの管状部材の存在または焼け；およびこれらの組合せからなる群から選択される、請求項 1 3 7 に記載のデバイス。

【請求項 1 3 9】

表 3 に列挙される群から選択された仕様またはプロセスパラメータを含む、請求項 1 1 5 に記載のデバイス。

【請求項 1 4 0】

前記管状部材が、採取された血管を含む、請求項 1 1 5 に記載のデバイス。

【請求項 1 4 1】

前記採取された血管が、採取された伏在静脈を含む、請求項 1 4 0 に記載のデバイス。

10

【請求項 1 4 2】

前記管状部材が人工グラフトを含む、請求項 1 1 5 に記載のデバイス。

【請求項 1 4 3】

前記人工グラフトが：固体；編組み；編上げ；および巻き付けられた材料のチューブまたはコイルからなる群から選択される、請求項 1 4 2 に記載のデバイス。

【請求項 1 4 4】

前記管状部材が金属構造を含む、請求項 1 1 5 に記載のデバイス。

【請求項 1 4 5】

前記金属構造が：N i t i n o l ；ステンレス鋼；エルジロイ；タンタル；M P 3 5 N ；再吸収金属、特にマグネシウム；およびこれらの組合せからなる群から選択された材料を含む、請求項 1 4 4 に記載のデバイス。

20

【請求項 1 4 6】

前記管状部材が編組み構造を含む、請求項 1 1 5 に記載のデバイス。

【請求項 1 4 7】

前記編組み構造が：固体；編組み；編上げ；および巻き付けられた材料のチューブまたはコイルからなる群から選択される、請求項 1 4 6 に記載のデバイス。

【請求項 1 4 8】

前記繊維マトリックスが少なくとも生体浸食性部分を含む、請求項 1 1 5 に記載のデバイス。

【請求項 1 4 9】

前記少なくとも生体浸食性部分が、非線形分解となるように構成される、請求項 1 4 8 に記載のデバイス。

30

【請求項 1 5 0】

前記繊維マトリックスが、前記繊維マトリックスの長さに沿って変化する厚さを含む、請求項 1 1 5 に記載のデバイス。

【請求項 1 5 1】

前記繊維マトリックスが、その長さに沿ってステップ型形状を含む、請求項 1 5 0 に記載のデバイス。

【請求項 1 5 2】

前記繊維マトリックスが、その長さに沿ってテーパ型形状を含む、請求項 1 5 0 に記載のデバイス。

40

【請求項 1 5 3】

前記繊維マトリックスが、前記繊維マトリックスの円周の少なくとも一部に沿って変化する厚さを含む、請求項 1 1 5 に記載のデバイス。

【請求項 1 5 4】

前記繊維マトリックスが、前記繊維マトリックスの長さに沿って変化する、半径方向の力を含む、請求項 1 1 5 に記載のデバイス。

【請求項 1 5 5】

前記グラフトデバイスの部分が終端部分を含む、請求項 1 1 5 に記載のデバイス。

【請求項 1 5 6】

50

前記終端部分が、吻合接続を支持するように構成され配置される、請求項 1 5 5 に記載のデバイス。

【請求項 1 5 7】

前記グラフトデバイスの部分が、中間部分を含む、請求項 1 1 5 に記載のデバイス。

【請求項 1 5 8】

前記管状部材の円周に沿って配置された足場アセンブリをさらに含む、請求項 1 1 5 に記載のデバイス。

【請求項 1 5 9】

前記足場アセンブリが：ステント；浸漬カバー；人工グラフト；およびこれらの組合せからなる群から選択される、請求項 1 5 8 に記載のデバイス。

10

【請求項 1 6 0】

前記足場アセンブリが、前記繊維マトリックスの外側に位置決めされる、請求項 1 5 8 に記載のデバイス。

【請求項 1 6 1】

前記足場アセンブリが、前記繊維マトリックスの内側に位置決めされる、請求項 1 5 8 に記載のデバイス。

【請求項 1 6 2】

前記足場アセンブリが、前記管状部材の外側に位置決めされる、請求項 1 6 1 に記載のデバイス。

【請求項 1 6 3】

20

前記足場アセンブリが、前記管状部材の内側に位置決めされる、請求項 1 5 8 に記載のデバイス。

【請求項 1 6 4】

前記足場アセンブリが、前記繊維マトリックスによって提供される半径方向の力の支持とは異なる半径方向の力の支持を提供するように、構成され配置される、請求項 1 5 8 に記載のデバイス。

【請求項 1 6 5】

前記足場アセンブリが単層構造を含む、請求項 1 5 8 に記載のデバイス。

【請求項 1 6 6】

前記足場アセンブリが多層構造を含む、請求項 1 5 8 に記載のデバイス。

30

【請求項 1 6 7】

前記多層構造が第 1 の層および第 2 の層を含み、前記第 1 の層が第 2 の層に撚り合わされている、請求項 1 6 6 に記載のデバイス。

【請求項 1 6 8】

管状部材と；

前記管状部材の円周に沿って配置されたポリマーを含む拘束性繊維マトリックスとを含む、患者に使用されるグラフトデバイスであって、

前記グラフトデバイスの一部が閉ループ製造プロセスで構成されるデバイス。

【請求項 1 6 9】

前記閉ループプロセスが：マトリックスの厚さ；デバイス温度および／または室温などの温度；室内湿度；繊維堆積速度；繊維堆積持続時間；溶媒濃度；流体粘度；電界強度；マンドレル回転速度；ノズル並進速度；ターゲットからのノズルの距離；堆積される材料のタイプ；およびこれらの組合せからなる群から選択されたパラメータを監視し調節する、請求項 1 6 8 に記載のデバイス。

40

【請求項 1 7 0】

前記繊維マトリックスが、その長さ、円周、または長さおよび円周の両方に沿って変化する少なくとも 1 つの性質を含む、請求項 1 6 8 に記載のデバイス。

【請求項 1 7 1】

前記閉ループ製造プロセスが、その間にパラメータが測定される繊維堆積休止事象を含む、請求項 1 6 8 に記載のデバイス。

50

## 【請求項 172】

前記測定されたパラメータが：デバイスまたはマトリックスの厚さ；デバイスまたはマトリックスの剛性；堆積されたポリマーの量；前記繊維マトリックス中の溶媒の定量化；穿刺の存在；静脈の焼けなどの前記管状部材の存在または焼け；およびこれらの組合せからなる群から選択される、請求項 171 に記載のデバイス。

## 【請求項 173】

前記グラフトデバイスの部分が、前記患者の評価から決定されたパラメータに適合しまたは修正されるように構成される、請求項 168 に記載のデバイス。

## 【請求項 174】

前記評価された患者パラメータが：年齢；性別；人種；血圧；血液検査情報；家族歴情報；ストレス試験データ；およびこれらの組合せからなる群から選択される、請求項 173 に記載のデバイス。

10

## 【請求項 175】

前記評価された患者パラメータが：血管形状情報、血管直径情報、または血管壁厚情報などの幾何学的情報；採取された血管の、弱くなったセクションに関する情報、血管の構造的性質に関する情報、または血管の弾性の試験から得られる情報などの機械的性質情報；およびこれらの組合せからなる群から選択される、請求項 173 に記載のデバイス。

## 【請求項 176】

前記管状部材が、採取された血管を含む、請求項 173 に記載のデバイス。

## 【請求項 177】

前記評価された患者パラメータが、採取された血管のパラメータを含む、請求項 176 に記載のデバイス。

20

## 【請求項 178】

前記グラフトデバイスの部分が、前記患者の評価から決定されたパラメータに適合しまたは修正されるように構成された製造プロセスパラメータを含む、請求項 173 に記載のデバイス。

## 【請求項 179】

前記製造プロセスパラメータが：一定のまたは可変の厚さなどの繊維マトリックス形状；繊維マトリックス材料または材料の組合せ；繊維マトリックスの半径方向の強度；繊維マトリックスの半径方向の剛性；繊維マトリックスの曲げ剛性；繊維直径；繊維分解速度；繊維マトリックス拡散特性；繊維マトリックス湿潤性；およびこれらの組合せからなる群から選択される、請求項 178 に記載のデバイス。

30

## 【請求項 180】

前記繊維マトリックスが、第 1 の機械的性質を有する第 1 の繊維と、異なる機械的性質を有する第 2 の繊維とを含む、請求項 179 に記載のデバイス。

## 【請求項 181】

前記第 1 の繊維および第 2 の繊維が、同時に送達され、順次送達され、または同時にかつ順次送達される、請求項 180 に記載のデバイス。

## 【請求項 182】

湿式スピニング；乾式スピニング；ゲルスピンニング；または溶融スピニングの 1 つまたは複数によって生成された繊維を含む、請求項 168 に記載のデバイス。

40

## 【請求項 183】

表 3 に列挙される群から選択された仕様またはプロセスパラメータを含む、請求項 168 に記載のデバイス。

## 【請求項 184】

前記管状部材が、採取された血管を含む、請求項 168 に記載のデバイス。

## 【請求項 185】

前記採取された血管が、採取された伏在静脈を含む、請求項 184 に記載のデバイス。

## 【請求項 186】

前記管状部材が人工グラフトを含む、請求項 168 に記載のデバイス。

50

## 【請求項 187】

前記人工グラフトが：固体；編組み；編上げ；および巻き付けられた材料のチューブまたはコイルからなる群から選択される、請求項 186 に記載のデバイス。

## 【請求項 188】

前記管状部材が金属構造を含む、請求項 168 に記載のデバイス。

## 【請求項 189】

前記金属構造が：Nitinol；ステンレス鋼；エルジロイ；タンタル；MP35N；再吸収金属、特にマグネシウム；およびこれらの組合せからなる群から選択された材料を含む、請求項 188 に記載のデバイス。

## 【請求項 190】

前記管状部材が編組み構造を含む、請求項 168 に記載のデバイス。

## 【請求項 191】

前記編組み構造が：固体；編組み；編上げ；および巻き付けられた材料のチューブまたはコイルからなる群から選択される、請求項 190 に記載のデバイス。

## 【請求項 192】

前記繊維マトリックスが、少なくとも生体浸食性部分を含む、請求項 168 に記載のデバイス。

## 【請求項 193】

前記少なくとも生体浸食性部分が、非線形分解となるように構成される、請求項 192 に記載のデバイス。

## 【請求項 194】

前記繊維マトリックスが、前記繊維マトリックスの長さに沿って変化する厚さを含む、請求項 168 に記載のデバイス。

## 【請求項 195】

前記繊維マトリックスが、その長さに沿ってステップ型形状を含む、請求項 194 に記載のデバイス。

## 【請求項 196】

前記繊維マトリックスが、その長さに沿ってテーパ型形状を含む、請求項 194 に記載のデバイス。

## 【請求項 197】

前記繊維マトリックスが、前記繊維マトリックスの円周の少なくとも一部に沿って変化する厚さを含む、請求項 168 に記載のデバイス。

## 【請求項 198】

前記繊維マトリックスが、前記繊維マトリックスの長さに沿って変化する、半径方向の力を含む、請求項 168 に記載のデバイス。

## 【請求項 199】

前記少なくとも 1 つのパラメータが：繊維直径および繊維マトリックス多孔度の少なくとも 1 つを含む、請求項 170 に記載のデバイス。

## 【請求項 200】

前記少なくとも 1 つのパラメータが：引裂き強さ；歪み抵抗；および生分解パラメータの少なくとも 1 つを含む、請求項 170 に記載のデバイス。

## 【請求項 201】

前記繊維マトリックスが第 1 の部分および第 2 の部分を含み、前記少なくとも 1 つのパラメータが、前記第 1 の部分に第 1 の値を、前記第 2 の部分に異なる値を含む、請求項 170 に記載のデバイス。

## 【請求項 202】

前記少なくとも 1 つのパラメータが、比較的連続的に変化する、請求項 170 に記載のデバイス。

## 【請求項 203】

前記デバイスが、吻合接続を支持するように構成された部分を含み、前記少なくとも 1

10

20

30

40

50

つのパラメータが、前記吻合接続部分で異なっている、請求項 170 に記載のデバイス。

【請求項 204】

前記少なくとも 1 つのパラメータが、前記患者の評価から決定されたパラメータに適合しまたは修正されるように変化する、請求項 170 に記載のデバイス。

【請求項 205】

前記少なくとも 1 つのパラメータが、患者への移植後に前記グラフトデバイスの性能が最適化されるように変化する、請求項 170 に記載のデバイス。

【請求項 206】

前記性能が、長期間にわたる開存度を含む、請求項 205 に記載のデバイス。

【請求項 207】

前記グラフトデバイスの部分が終端部分を含む、請求項 168 に記載のデバイス。

【請求項 208】

前記終端部分が、吻合接続を支持するように構成され配置される、請求項 207 に記載のデバイス。

【請求項 209】

前記グラフトデバイスの部分が、中間部分を含む、請求項 168 に記載のデバイス。

【請求項 210】

前記管状部材の円周に沿って配置された足場アセンブリをさらに含む、請求項 168 に記載のデバイス。

【請求項 211】

前記足場アセンブリが：ステント；浸漬カバー；人工グラフト；およびこれらの組合せからなる群から選択される、請求項 210 に記載のデバイス。

【請求項 212】

前記足場アセンブリが、前記繊維マトリックスの外側に位置決めされる、請求項 210 に記載のデバイス。

【請求項 213】

前記足場アセンブリが、前記繊維マトリックスの内側に位置決めされる、請求項 210 に記載のデバイス。

【請求項 214】

前記足場アセンブリが、前記管状部材の外側に位置決めされる、請求項 213 に記載のデバイス。

【請求項 215】

前記足場アセンブリが、前記管状部材の内側に位置決めされる、請求項 210 に記載のデバイス。

【請求項 216】

前記足場アセンブリが、前記繊維マトリックスによって提供される半径方向の力の支持とは異なる半径方向の力の支持を提供するように、構成され配置される、請求項 210 に記載のデバイス。

【請求項 217】

前記足場アセンブリが単層構造を含む、請求項 210 に記載のデバイス。

【請求項 218】

前記足場アセンブリが多層構造を含む、請求項 210 に記載のデバイス。

【請求項 219】

前記多層構造が第 1 の層および第 2 の層を含み、前記第 1 の層が第 2 の層に撚り合わされている、請求項 218 に記載のデバイス。

【請求項 220】

図を参照しながら記述されるグラフトデバイス。

【請求項 221】

図を参照しながら記述されるシステム。

【請求項 222】

10

20

30

40

50

図を参照しながら記述されるグラフトデバイスを製造する方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

関連出願の相互参照

本出願は、米国特許法 § 119 (e) の下、参照によりその全体が本明細書に組み込まれている 2009 年 10 月 28 日に出願された、米国仮特許出願第 61/255,699 号の利益を主張するものである。

連邦政府の補助金に関する記載

米国政府は、本発明の支払い済みライセンスと、米国国立衛生研究所により与えられた認可番号第 5 R01 EB000503-04 号および第 HL069368 号の条件により提供されるような妥当な条件で、特許権者が他者に実施許諾する必要があるという、限られた状況での権利とを有する。

【0002】

本発明は一般に、管状グラフトデバイスと、そのようなデバイスを作製する方法とに関する。詳細には本発明は、管状部材、および管状組織の周辺を巡る制限的繊維マトリックスを含む、管状グラフトデバイスを提供する。

【背景技術】

【0003】

心筋梗塞および虚血をもたらす冠動脈疾患は、現在のところ、世界各地での罹患および死亡の一番の原因である。現行の治療の代替例は、経皮経管的血管形成術、ステント術、および冠動脈バイパス移植術 (CABG) からなる。CABG は、動脈または静脈導管のいずれかを使用して実施することができ、冠動脈狭窄を根治させるのに最も効果的で最も広く使用される治療法であり、ほぼ 500,000 の処置が毎年行われている。さらに、約 80,000 の下肢バイパス手術が毎年行われている。バイパス処置に使用される静脈導管は、最も頻繁には自原的伏在静脈であり、依然として、これらのバイパス処置を行う外科医の 95% が選択するグラフトである。アメリカ心臓協会によれば、2004 年には、249,000 人の患者に行われた 427,000 のバイパス処置があった。これらの処置の長期にわたる成果は、何カ月から何年にもわたる時間枠で生じる可能性のある、内膜肥厚 (IH) の結果としてのグラフト血管または吻合部位の閉塞に起因して限定されている。

【0004】

首尾よく行われる小径の、合成によるまたは組織工学により作製される血管グラフトの開発は、依然として実現されておらず、動脈グラフト (例えば、内胸、撓骨、または胃大網動脈) の使用は、これらの血管の短いサイズ、小径、および利用可能性により限定されている。それらの広く様々な使用にも関わらず、動脈性静脈グラフト (AVG) ができないことは、依然として主要な課題であり：AVG の 12% から 27% が最初の 1 年で閉塞するようになり、その後の年次閉塞率は 2% から 4% である。失敗に終わった AVG を有する患者は、死亡することになりまたは再手術を必要とする。

【0005】

IH は、最初の 5 年以内での全ての AVG の失敗の 20% から 40% に関係する。いくつかの研究は、IH が、全ての成熟した AVG においてある程度まで発症し、これは移植術に対する静脈の避けられない応答であると思なされることが多いことを解明した。IH は、中膜および外膜平滑筋細胞 (SMC) および筋線維芽細胞の、表現型修飾と、その後の脱接着と、それらが増殖する内膜への遊走とによって特徴付けられる。多くの場合、この応答は狭窄をもたらす可能性があり、グラフト内の血流を減少させた。IH は、動脈循環の動的機械環境に静脈が突然曝されることによって開始し得ると考えられる。

【0006】

バイパスグラフトとして使用される、動脈循環へと置き換えられた静脈セグメントは、多量の血流および腔内圧力と (Porter K E, Nydahl S, Dunlop

10

20

30

40

50

P、Varty K、Thrush A J、およびLondon N J. The development of an in vitro flow model of human saphenous vein graft intimal hyperplasia. *Cardiovasc Res.* 1996; 31 (4) : 607~14 )、周期的壁運動(屈曲、ねじれ、および延伸を含む)とに曝されるが、これは静脈セグメントが、CABGの場合に鼓動している心臓に到着されることによる(Vorp D A、Severyn D A、Steed D L、およびWebster M W. A device for the application of cyclic twist and extension on perfused vascular segments. *Am J. Physiol.* 1996; 270 (2 Pt 2) : H787~95)。静脈は、動脈よりもさらに薄い壁で覆われておりかつ脆いので、静脈回路で慣れているような状態よりも、動脈回路では著しくより大きなストレスを経験する。確かに、LiuおよびFungは、動脈流を再度確立した直後のAVGでの平均円周方向壁応力(CWS)が、通常の状態下にある静脈の場合の140倍になり得ることを示した(Fuchs J C、Mitchener J S、およびHagen P O. Postoperative changes in autologous vein grafts. *Ann Surg.* 1978; 188 (1) : 1~15)。CWSのこの劇的な増加は、AVGが、動脈圧の下でその最大直径を拡張させることによる。組織は、肥厚することによって、認識された損傷に応答するが、これは応力を静脈レベルに戻そうとしていると考えられる。しかし、この応答は制御されず、過度に補償することにより、静脈セグメントの所望の肥厚または「動脈化」の代わりに狭窄に至る可能性がある。

#### 【0007】

AVGによる過形成応答は、AVGが動脈の生体力学的環境に突然曝される結果生じる「細胞性ショック」の、直接的な結果であることが示唆されている(Angelini G Dら、Distention promotes platelet and leukocyte adhesion and reduces short-term patency in pig arteriovenous bypass grafts. *J Thorac Cardiovasc Surg.* 1990; 99 (3) : 433~9; Campbell P Aら、Vein grafts for arterial repair: Their success and reasons for failure. *Ann R Coll Surg Engl.* 1981; 63 (4) : 257~60; Campeau L L Jr、Natural history of saphenous vein aortocoronary bypass grafts. *Mod Concepts Cardiovasc Dis.* 1984; 53 : 59~63; Fuchs J C、Mitchener J S、およびHagen P O. Postoperative changes in autologous vein grafts. *Ann Surg.* 1978; 188 (1) : 1~15; Huynh T Tら、Alterations in wall tension and shear stress modulate tyrosine kinase signaling and wall remodeling in experimental vein grafts. *J Vasc Surg.* 1999; 29 (2) : 334~44; Liu S Qら、Changes in the organization of the smooth muscle cells in rat vein grafts. *Ann Biomed Eng.* 1998; 26 (1) : 86~95; Ramos J Rら、Histologic fate and endothelial changes of distended and nondistended vein grafts. *Ann Surg.* 1976; 183 (3) : 205~28; Resnick N およびGimbrone M A. Hemodynamic forces are complex regulators of endothelial gene expression. *The Faseb J.* 1995; 9

(10) : 874~82; Sumpio B. Hemodynamic forces and vascular cell biology. Austin: R. G. Landes Company. 1993; Szilagyi D Eら、Biologic fate of autogenous vein implants as arterial substitutes: Clinical, angiographic and histopathologic observations in femoro-popliteal operations for atherosclerosis. Ann Surg. 1973; 178 (3) : 232~46; および Zwolak R Mら、Kinetics of vein graft hyperplasia: Association with tangential stress. Journal of Vascular Surgery: Official Publication, the Society For Vascular Surgery [and] International Society For Cardiovascular Surgery, North American Chapter. 1987; 5 (1) : 126~36)。外部構造支持体（またはシース）を付加することによってAVGの急な拡張を防止することにより、静脈グラフトの開存度が改善されるように見える (Huynh T Tら、J Vasc Surg. 1999; 29 (2) : 334~44; Cabrera Fischer E Iら、Reduced elastic mismatch achieved by interposing vein cuff in expanded polytetrafluoroethylene femoral bypass decreases intimal hyperplasia. Artif Organs. 2005; 29 (2) : 122~30; Ducasse Eら、Interposition vein cuff and intimal hyperplasia: An experimental study. Eur J Vasc Endovasc Surg. 2004; 27 (6) : 617~21; Huynh T Tら、External support modulates gp protein expression and receptor coupling in experimental vein grafts. Surgery. 1999; 126 (2) : 127~34; Jeremy J Yら、A bioabsorbable (polyglactin)、nonrestrictive、external sheath inhibits porcine saphenous vein graft thickening. J Thorac Cardiovasc Surg. 2004; 127 (6) : 1766~72; Karayannacos P Eら、Late failure in vein grafts: Mediating factors in subendothelial fibromuscular hyperplasia. Ann Surg. 1978; 187 (2) : 183~8; Kohler T Rら、The effect of rigid external support on vein graft adaptation to the arterial circulation. J Vasc Surg. 1989; 9 (2) : 277~85; Liu S Qら、Partial prevention of monocyte and granulocyte activation in experimental vein grafts by using a biomechanical engineering approach. J. Biomech. 1999; 32 (11) : 1165~75; Liu S Qら、A possible role of initial cell death due to mechanical stretch in the regulation of subsequent cell proliferation in experimental vein grafts. Biomech Model Mechanobiol. 2002; 1 (1) : 17~27; Mehta Dら、External stenting reduces long-term medial and neointimal t

hickening and platelet derived growth factor expression in a pig model of arteriovenous bypass grafting. *Nat. Med.* 1998; 4 (2) : 235~9; Parsonnet Vら、New stent for support of veins in arterial grafts. *Arch Surg.* 1963; 87: 696~702; Vijayan Vら、Long-term reduction of medial and intimal thickening in porcine saphenous vein grafts with a polyglactin biodegradable external sheath. *J Vasc Surg.* 2004; 40 (5) : 1011~9; および Vijayan Vら、External supports and the prevention of neointima formation in vein grafts. *Eur J Vasc Endovasc Surg.* 2002; 24 (1) : 13~22)。しかし、1つまたは複数の基本的な制限により、これらの以前からの手法は、AVG開存度を改善するための臨床的に実現可能な手段をもたらさなかった。これらの以前からの手法の全ては、生体耐久性がありかつ／または緩い、外膜上に配置されたラップ／シースを利用した。

#### 【0008】

内膜肥厚の発症における生体力学の役割

IHは、典型的には内膜の細胞の数および／またはサイズが大きい結果、血管の内層の厚さが増加し、その後、これらの細胞により大量のECMが沈着することによって定められる。この応答に寄与する細胞は、主に中膜および外膜由来のSMCである。IHは、動脈管の閉鎖の場合のように発症中に生理学的に、かつ血管損傷の結果として病理学的に生じる。AVG IHは、動脈循環の動的機械環境に静脈が突然曝されることによって開始され得ると考えられる (Dobrin P B、Littooy F N、および Endean E D. Mechanical factors predisposing to intimal hyperplasia and medial thickening in autogenous vein grafts. *Surgery.* 1989; 105 (3) : 393~400)。しかし、高レベルのCWSがIH形成を促進させることが示されているが (Huynh T T、Davies M G、Trovato M J、Svendsen E、および Hagen P O. Alterations in wall tension and shear stress modulate tyrosine kinase signaling and wall remodeling in experimental vein grafts. *J Vasc Surg.* 1999; 29 (2) : 334~44と、Gusic R J、Myung R、Petko M、Gaynor J W、および Gooch K J. Shear stress and pressure modulate saphenous vein remodeling ex vivo. *J. Biomech.* 2005; 38 (9) : 1760~9)、高レベルの剪断応力がそれを調整する傾向にある (Huynh T T、Davies M G、Trovato M J、Svendsen E、および Hagen P O. Alterations in wall tension and shear stress modulate tyrosine kinase signaling and wall remodeling in experimental vein grafts. *J Vasc Surg.* 1999; 29 (2) : 334~44; Gusic R J、Myung R、Petko M、Gaynor J W、および Gooch K J. Shear stress and pressure modulate saphenous vein remodeling ex vivo. *J. Biomech.* 2005; 38 (9) : 1760~9; Goldman J、Zhong L、および Liu S Q. Negative regulation of vascular smooth muscle ce

ll migration by blood shear stress. Am J Physiol Heart Circ Physiol. 2006; Jiang Z、Berceli S A、Pfahnl C L、Wu L、Goldman D、Ta o M、Kagayama M、Matsukawa A、および Ozaki C K. Wall shear modulation of cytokines in early vein grafts. J Vasc Surg. 2004; 40 (2) : 345~50; Jiang Z、Wu L、Miller B L、Goldman D R、Fernandez C M、Abouhamze Z S、Ozaki C K、および Berceli S A. A novel vein graft model: Adaptation to differential flow environments. American Journal of Physiology. Heart and Circulatory Physiology. 2004; 286 (1) : H240~5; および Morinaga K、Okadome K、Kuroki M、Miyazaki T、Muto Y、および Inokuchi K. Effect of wall shear stress on intimal thickening of arterially transplanted autogenous veins in dogs. J Vasc Surg. 1985; 2 (3) : 430~3)。AVGによって反対の過形成応答を引き起こすように見えるこれら2つの生体力学的要因は、Dobrinらによって慎重に調査され、高い円周方向延伸は、その防止の際の高い剪断応力よりも、内膜肥厚の促進の際にさらに有意な役割を演じることを示した (Dobrin P B、Littooy F N、および Endean E D. Mechanical factors predisposing to intimal hyperplasia and medial thickening in autogenous vein grafts. Surgery. 1989; 105 (3) : 393~400)。この研究に刺激を与える別の調査では、Zwolakらが、AVGの動脈化における生体力学的壁応力の規制的役割を示唆した (Zwolak R M、Adams M C、および Clowes A W. Kinetics of vein graft hyperplasia: Association with tangential stress. Journal of Vascular Surgery: Official Publication, the Society For Vascular Surgery [and] International Society For Cardiovascular Surgery, North American Chapter. 1987; 5 (1) : 126~36)。Jiangらは、高い壁剪断応力が、壁の張力の増加がない状態でAVGでの過形成応答を低下させることを実証した (Jiang Z、Wu L、Miller B L、Goldman D R、Fernandez C M、Abouhamze Z S、Ozaki C K、および Berceli S A. A novel vein graft model: Adaptation to differential flow environments. American Journal of Physiology. Heart and Circulatory Physiology. 2004; 286 (1) : H240~5)。Liuらによるin vivo研究は、AVGにおけるCWSのレベルを低下させることにより、永続的なポリテトラフルオロエチレン・シースの留置を介して、過形成応答を低減させることができることを示した (Cabrerera Fischer E I、Bia Santana D、Cassanello G L、Zocalo Y、Crawford E V、Casas R F、および Armentano R L. Reduced elastic mismatch achieved by interposing vein cuff in expanded polytetrafluoroethylene femoral bypass decreases intimal hyperplasia. Artif Organs. 2005; 29 (2) : 122~30; Liu S Q、Moore M M、Glucksbe

rg M R、Mockros L F、Grotberg J B、およびMok A P. Partial prevention of monocyte and granulocyte activation in experimental vein grafts by using a biomechanical engineering approach. J. Biomech. 1999; 32 (11): 1165~75; およびLiu S Q、Ruan Y Y、Tang D、Li Y C、Goldman J、およびZhong L. A possible role of initial cell death due to mechanical stretch in the regulation of subsequent cell proliferation in experimental vein grafts. Biomech Model Mechanobiol. 2002; 1 (1): 17~27)。これらの以前からの研究では、AVGの生体力学的環境がIHの発症において有意な役割を演じることが明らかである。特に、CWSはIHの形成を規制するようであり、この制御は、この研究で記述される手法の焦点であった。

#### 【0009】

内膜肥厚に関連した分子および細胞プロセス

損傷が静脈により認識されると、過形成応答が開始状態になり、この応答は5つの異なる、しかし相互に関連した細胞プロセスであると記述することができる：1) 増殖能の低い収縮および静止状態から、増殖能の高い合成状態への、外膜および中膜SMCの表現型修飾；2) SMCの脱接着、またはその他の細胞およびECMとの接着斑の変更；3) 細胞をECMに沿って「歩かせる」接着斑の選択的再構成を必要とする、外層から基底膜を経て内膜に至るSMCの遊走；4) 増殖；および5) コラーゲン、エラスチン、フィブロネクチンなど、ならびに様々なマトリックスメタロプロテナーゼ(MMP)などのマトリックス分解酵素を分泌する合成SMCによって引き起こされたECM組成物の変化を反映する、組織のリモデリング。AVG IHの開始事象を阻害するために、おそらく、これら5つのプロセスのそれぞれを考慮しなければならない。IHに関連した事象の連鎖を示す概略図を、図1に示す。

#### 【0010】

表現型修飾

SMC表現型修飾は、IHの病因で突出した特徴である。変性SMCが豊富なプラークが、移植後第2週目程度に早い時期に内膜で見出された。完全分化した生体SMCは、低い増殖およびアポトーシス速度によって実証されるように、低い代謝回転を示した。しかし、動脈損傷後48時間で、SMCの15~40%が有糸分裂していた。機能性におけるこの突然のシフトは、SMCが完全合成から完全収縮にまで及ぶある範囲の表現型で存在することができるという事実に関係する。合成SMCは、調節シグナルおよびサイトカインに応答し、ECMの代謝回転ならびに成長因子の生産が可能である。一方、収縮性SMCは、血管運動シグナルに応答し、血管緊張度を制御する。AVGは、合成SMCの遊走および増殖によって、また脱分化型SMCの長時間にわたる存在下、I型コラーゲン生産を含めたその後の持続的なECMの蓄積によって、最初の2カ月以内に新生内膜形成を示す。

#### 【0011】

SMCの表現型状態は、周期的な延伸が*in vitro*での増殖およびh-カルデスモン発現の基質依存的変化を誘発させるという観察によって実証されるように、少なくとも部分的には機械的な力によって調節される。*in vivo*研究は、SMCの表現型における機械的損傷の重要性も示した。中膜に対するバルーン膨張損傷は、SCMによってECM合成を促進させ、それと共にαアクチン含量を減少させることを示した。いくつかの報告は、動脈循環に移送された静脈の新生内膜SMCの表現型修飾を示し、これは、静脈から動脈の環境への変化によって表現型修飾が誘発されたという概念を裏付けている。他の証拠は、例えば周期的な延伸が、培養されたラット門脈でSMCの収縮機能を維持するのに必要であることが見出された、*ex vivo*器官培養研究から得られる。Gol

dmanらは、ラット大静脈を動脈圧に曝し (Goldman J、Zhong L、およびLiu S Q. Degradation of alpha-actin filaments in venous smooth muscle cells in response to mechanical stretch. American Journal of Physiology. Heart and Circulatory Physiology. 2003; 284 (5): H1839~47)、その結果、中間円周方向歪みが大幅に増大し、SMC線維状アクチンの被覆範囲が付随的に縮小した。明らかに、静脈移植に関連した機械的環境の変化は、おそらくはIHの発症に寄与する壁在性SMCの表現型修飾をもたらす可能性がある。

#### 【0012】

合成表現型の指標には、多量のゴルジ複合体および粗面小胞体と、少量の線維状アクチンとの存在が含まれる。収縮表現型は、スーセリン、h-カルデスモン、平滑筋ミオシン重鎖、および大量の線維状アクチンなどの収縮タンパク質の発現によって示される、無傷の収縮装置の存在によって示される。

#### 【0013】

脱接着および遊走

細胞の脱接着は、IHカスケードにおける初期の応答の1つである。このプロセスは、接着斑および張力線維を有する強力な接着状態から、拡散した細胞形状を維持した状態での接着斑および張力線維の再構築により特徴付けられるさらに弱い接着性の状態への、ECMに対する細胞の接着の変更を指す。SMC脱接着は、当然ながら、新生内膜形成に寄与することになるSMC遊走および増殖を可能にすることになる。

#### 【0014】

細胞接着の制御に関与する多くの重要なタンパク質があるが、本発明者らは、本発明者らの関心を、細胞マトリックス相互作用のアダプターおよびモジュレーターとして機能するマトリックス細胞タンパク質 (Bornstein P. Diversity of function is inherent in matricellular proteins: An appraisal of thrombospondin 1. J. Cell Biol. 1995; 130 (3): 503~6と、Sage E HおよびBornstein P. Extracellular proteins that modulate cell-matrix interactions. Sparc, tenascin, and thrombospondin. The Journal of Biological Chemistry. 1991; 266 (23): 14831~4) と、細胞接着斑部位に局在化したことが示された細胞内接着タンパク質 (Nikolopoulos S NおよびTurner C E. Integrin-linked kinase (ilK) binding to paxillin ldl motif regulates ilK localization to focal adhesions. The Journal of Biological Chemistry. 2001; 276 (26): 23499~505と、Tu Y、Wu S、Shi X、Chen K、およびWu C. Migfilin and mig-2 link focal adhesions to filamin and the actin cytoskeleton and function in cell shape modulation. Cell. 2003; 113: 37~47) とに絞った。テネイシン (TN-C)、トロンスポンジン1, 2 (TSP)、および酸性でありシステインに富む分泌タンパク質 (SPARC) は、発症および細胞損傷中に高度に制御された発現を示すマトリックス細胞タンパク質である (Murphy-Ullrich J E. The de-adhesive activity of matricellular proteins: Is intermediate cell adhesion an adaptive state? J Clin Invest. 2001; 107 (7): 785~90)。マイトジェン誘導性遺伝子2 (Mig-2) およびインテグリン結合キナーゼ (ILK) は、細胞形状修飾 (Nikolopou

10

20

30

40

50

los S NおよびTurner C E. Integrin-linked kinase (ILK) binding to paxillin ldl motif regulates ilk localization to focal adhesions. The Journal of Biological Chemistry. 2001; 276 (26) : 23499~505と、Tu Y、Wu S、Shi X、Chen K、およびWu C. Migfilin and Mig-2 link focal adhesions to filamin and the actin cytoskeleton and function in cell shape modulation. Cell. 2003; 113 : 37~47) およびインテグリン媒介型シグナル伝達 (Wu CおよびDedhar S. Integrin-linked kinase (ILK) and its interactors: A new paradigm for the coupling of extracellular matrix to actin cytoskeleton and signaling complexes. J. Cell Biol. 2001; 155 (4) : 505~10) にそれぞれ関与している細胞内タンパク質である。細胞骨格および接着斑に対するTN-C、TSP、およびSPARCの作用は、基本的に区別できない (Greenwood J A、Theibert A B、Prestwich G D、およびMurphy-Ullrich J E. Restructuring of focal adhesion plaques by pi 3-kinase. Regulation by ptdins (3, 4, 5)-p (3) binding to alpha-actinin. J. Cell Biol. 2000; 150 (3) : 627~42と、Murphy-Ullrich J E、Lightner V A、Aukhil I、Yan Y Z、Erickson H P、およびHook M. Focal adhesion integrity is downregulated by the alternatively spliced domain of human tenascin. J. Cell Biol. 1991; 115 (4) : 1127~36)。しかし、これら3種のタンパク質はそれぞれ、独自の受容体を有し、かつ細胞遊走の前駆体である中間接着状態を生成する、類似しているが別個のシグナル伝達経路を有する (Murphy-Ullrich J E. The de-adhesive activity of extracellular proteins: Is intermediate cell adhesion an adaptive state? J Clin Invest. 2001; 107 (7) : 785~90)。Mig-2およびILKも、細胞接着に関与している (Nikolopoulos S NおよびTurner C E. Integrin-linked kinase (ILK) binding to paxillin ldl motif regulates ilk localization to focal adhesions. The Journal of Biological Chemistry. 2001; 276 (26) : 23499~505と、Tu Y、Wu S、Shi X、Chen K、およびWu C. Migfilin and Mig-2 link focal adhesions to filamin and the actin cytoskeleton and function in cell shape modulation. Cell. 2003; 113 : 37~47)。特に、Mig-2は、細胞マトリックス接着とアクチン細胞骨格との間の接続に寄与し、それと共に細胞形状を修飾することが示されている (Tu Y、Wu S、Shi X、Chen K、およびWu C. Migfilin and mig-2 link focal adhesions to filamin and the actin cytoskeleton and function in cell shape modulation. Cell. 2003; 113 : 37~47)。最近の研究は、ILKが、インテグリン媒介型シグナル伝達においてメディエーターとして働くことを示している (Wu C. Integrin-linked kinase and pinch: Partners in re

gulation of cell-extracellular matrix interaction and signal transduction. *Journal of Cell Science*. 1999;112 (Pt 24):4485~9)。さらに、Mig-2およびILKの両方は、接着斑を維持するのに必要とされる(Nikolopoulos S NおよびTurner C E. Integrin-linked kinase (ilK) binding to paxillin ldl motif regulates ilK localization to focal adhesions. *The Journal of Biological Chemistry*. 2001;276 (26):23499~505と、Tu Y、Wu S、Shi X、Chen K、およびWu C. Migfilin and mig-2 link focal adhesions to filamin and the actin cytoskeleton and function in cell shape modulation. *Cell*. 2003;113:37~47)。TN-C、TSP、SPARC、Mig-2、およびILKのレベルの変化を試験することによって、本発明者らは、静脈セグメント内のSMCの接着状態に関する結論を下すことができるようになると思う。TN-C、TSP、SPARC、Mig-2、およびILKの細胞内局在化を示す概略図を、図2に示す。

#### 【0015】

in vivoでのSMC遊走の前提条件は、周囲のマトリックスタンパク質の分解である。マトリックスメタロプロテイナーゼ(特に、MMP-1、MMP-2、およびMMP-9)は、血管ECMの様々な成分を選択的に分解することができる(Galis Z S、Muszynski M、Sukhova G K、Simon\_Morrissey E、Unemori E N、Lark M W、Amento E、およびLibby P. Cytokine-stimulated human vascular smooth muscle cells synthesize a complement of enzymes required for extracellular matrix digestion. *Circulation Research (Online)*. 1994;75 (1):181~9;Newby A C、Southgate K M、およびDavies M G. Extracellular matrix degrading metalloproteinases in the pathogenesis of arteriosclerosis. *Basic Res Cardiol*. 1994;89 (Suppl 1):59~70;Porter K E、Naik J、Turner N A、Dickison T、Thompson M M、およびLondon J M. Simvastatin inhibits human saphenous vein neointima formation via inhibition of smooth muscle cell proliferation and migration. *J. Vasc. Surg*. 2002;36:150~7;およびSouthgate K M、Davies M、Booth R F、およびNewby A C. Involvement of extracellular-matrix-degrading metalloproteinases in rabbit aortic smooth-muscle cell proliferation. *Biochem J*. 1992;288 (Pt 1):93~9)。MMPは、制御SMC遊走による動脈病変の発症に極めて重要であることが示されている。MMPと、それらの活性化因子(MT-1 MMP)(Lafleur M A、Hollenberg M D、Atkinson S J、Knauer V、Murphy G、およびEdwards D R. Activation of pro-(matrix metalloproteinase-2) (pro-mmp-2) by thrombin is membrane-type-mmp-dependent in human umbilical vein endothelial cells and generates a distinct 63

kda active species. *Biochem J.* 2001; 357 (Pt 1): 107~15) と、それらの阻害剤（特に、TIMP-1、TIMP-2、TIMP-3、およびTIMP-4）との間のバランスが、ECM分解のレベルを決定する（Meng X、Mavromatis K、およびGalis Z S. *Mechanical stretching of human saphenous vein grafts induces expression and activation of matrix-degrading enzymes associated with vascular tissue injury and repair. Exp Mol. Pathol.* 1999; 66 (3): 227~37）。非常に数多くの研究が、MMPおよびTIMPは、変化した血行動態および血管損傷に応答してIHの初期に有意な役割を演ずることを示している（George S J、Baker A H、Angelini G D、およびNewby A C. *Gene transfer of tissue inhibitor of metalloproteinase-2 inhibits metalloproteinase activity and neointima formation in human saphenous veins. Gene Ther.* 1998; 5 (11): 1552~60; George S J、Johnson J L、Angelini G D、Newby A C、およびBaker A H. *Adenovirus-mediated gene transfer of the human TIMP-1 gene inhibits smooth muscle cell migration and neointimal formation in human saphenous vein. Hum Gene Ther.* 1998; 9 (6): 867~77と; Lijnen H R、Soloway P、およびCollen D. *Tissue inhibitor of matrix metalloproteinases-1 impairs arterial neointima formation after vascular injury in mice. Circ Res.* 1999; 85 (12): 1186~91）。例えば、動脈血行動態によるex vivo灌流の6時間後、MMP-2およびMMP-9の発現はヒト伏在静脈において増加した（Mavromatis K、Fukai T、Tate M、Chesler N、Ku D N、およびGalis Z S. *Early effects of arterial hemodynamic conditions on human saphenous veins perfused ex vivo. Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2000; 20 (8): 1889~95）。ヒト伏在静脈のその他の器官培養研究は、動脈条件下での、MMP-9の高い生産量およびMMP-2の高い活性化を示している（Porter K E、Thompson M M、Loftus I M、McDermott E、Jones L、Crowther M、Bell P R、およびLondon N J. *Production and inhibition of the gelatinolytic matrix metalloproteinases in a human model of vein graft stenosis. Eur J Vasc Endovasc Surg.* 1999; 17 (5): 404~12; Porter K E、Naik J、Turner N A、Dickison T、Thompson M M、およびLondon J M. *Simvastatin inhibits human saphenous vein neointima formation via inhibition of smooth muscle cell proliferation and migration. J. Vasc. Surg.* 2002; 36: 150~7; およびGeorge S J、Zaltsman A B、およびNewby A C. *Surgical preparative injury and neointima formation increase MMP-9 expression and MMP-2 activation in human saphenous vein*

。Cardiovasc Res. 1997; 33 (2) : 447~59)。シムバスタチンなどの広範なMMP阻害剤は、このモデルで新生内膜形成を阻害することが示されている (Porter K E、Naik J、Turner N A、Dickison T、Thompson M M、およびLondon J M. Simvastatin inhibits human saphenous vein neointimal formation via inhibition of smooth muscle cell proliferation and migration. J. Vasc. Surg. 2002; 36:150~7と、Porter K E、Loftus I M、Peterson M、Bell P R、London N J、およびThompson M M. Marimastat inhibits neointimal thickening in a model of human vein graft stenosis. Br J. Surg. 1998; 85 (10) : 1373~7)。

#### 【0016】

機械的な力は、上記因子を直接制御することによって、SMCの脱接着および遊走に影響を及ぼすことができる。例えば、MMP-1の発現は、静的対照に比べてパルス圧力に曝された静脈SMCのほうで増加し (Redmond E M、Cahill P A、Hirsch M、Wang Y N、Sitzmann J V、およびOkada S S. Effect of pulse pressure on vascular smooth muscle cell migration: The role of urokinase and matrix metalloproteinase. Thrombosis & Haemostasis. 1999; 81 (2) : 293~300)、一方、MMP-2 mRNAレベルは、周期的延伸に曝されたマウスSMCで増加する (Grote K、Flach I、Luchtefeld M、Akin E、Holland S M、Drexler H、およびSchieffer B. Mechanical stretch enhances mRNA expression and proenzyme release of matrix metalloproteinase-2 (MMP-2) via nad (p) h oxidase-derived reactive oxygen species. Circulation Research. 2003; 92 (11) : 80~6)。ヒト伏在静脈から培養されたSMCでは、MMP-2およびMMP-9転写物とタンパク質のレベルは、一軸方向の静止緊張に曝されたときに上昇するが、一軸方向の周期的緊張に曝されたときは低下する (Asanuma K、Magid R、Johnson C、Nerem R M、およびGalís Z S. Uniaxial strain upregulates matrix-degrading enzymes produced by human vascular smooth muscle cells. Am J Physiol Heart Circ Physiol. 2003; 284 (5) : H1778~84)。線維芽細胞の周期的緊張は、MT-1 MMPレベルを上昇させ (Tyagi S C、Lewis K、Pikes D、Marcello A、Mujumdar V S、Smiley L M、およびMoore C K. Stretch-induced membrane type matrix metalloproteinase and tissue plasminogen activator in cardiac fibroblast cells. J Cell Physiol. 1998; 176 (2) : 374~82) [166]、TIMP-1レベルは低下したことが示された (Yamaoka A、Matsuo T、Shiraga F、およびOhtsuki H. Timp-1 production by human scleral fibroblast decreases in response to cyclic mechanical stretching. Ophthalmic Research. 2001; 33 (2) : 98~101)。さらに、SMC遊走は、剪断応力で誘発されたECシグナル伝達によって制御されることが示された (B

assiouny H S、Song R H、Kocharyan H、Kins E、およびGlagov S. Low flow enhances platelet activation after acute experimental arterial injury. *Journal of Vascular Surgery*. 1998; 27 (5) : 910~8; Nakazawa T、Yasuhara H、Shigematsu K、およびShigematsu H. Smooth muscle cell migration induced by shear-loaded platelets and endothelial cells. Enhanced platelet-derived growth factor production by shear-loaded platelets. *Int Angiol*. 2000; 19 (2) : 142~6; Powell R J、Carruth J A、Basson M D、Bloodgood R、およびSumpio B E. Matrix-specific effect of endothelial control of smooth muscle cell migration. *Journal of Vascular Surgery*. 1996; 24 (1) : 51~7; およびShigematsu K、Yasuhara H、Shigematsu H、およびMuto T. Direct and indirect effects of pulsatile shear stress on the smooth muscle cell. *Int Angiol*. 2000; 19 (1) : 39~46)。機械的な力は、上記因子を直接制御することによって、SMCの脱接着および遊走に影響を及ぼすことができる。SMCの遊走は、剪断応力で誘発されたECシグナル伝達によって制御することが示された (Garanich J S、Pahakis M、およびTarbell J M. Shear stress inhibits smooth muscle cell migration via nitric oxide-mediated downregulation of matrix metalloproteinase-2 activity. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2005; 288 (5) : H2244~52; Bassiouny H S、Song R H、Kocharyan H、Kins E、およびGlagov S. Low flow enhances platelet activation after acute experimental arterial injury. *Journal of Vascular Surgery*. 1998; 27 (5) : 910~8; Nakazawa T、Yasuhara H、Shigematsu K、およびShigematsu H. Smooth muscle cell migration induced by shear-loaded platelets and endothelial cells. Enhanced platelet-derived growth factor production by shear-loaded platelets. *Int Angiol*. 2000; 19 (2) : 142~6; Powell R J、Carruth J A、Basson M D、Bloodgood R、およびSumpio B E. Matrix-specific effect of endothelial control of smooth muscle cell migration. *Journal of Vascular Surgery*. 1996; 24 (1) : 51~7; Shigematsu K、Yasuhara H、Shigematsu H、およびMuto T. Direct and indirect effects of pulsatile shear stress on the smooth muscle cell. *Int Angiol*. 2000; 19 (1) : 39~46; およびSho M、Sho E、Singh T M、Komatsu M、Sugita A、Xu C、Nanjo H、Zarins C K、およびMasuda H. Subnormal shear stress-induced intimal thickening requires medial smooth muscle cell prol

iferation and migration. Exp Mol Pathol. 2002;72(2):150~60)。

【0017】

増殖

いくつかの成長因子は、静脈グラフトの過形成応答において重要な成分に関与していた。トランスフォーミング成長因子 $\beta$  (TGF- $\beta$ )は、特に重要であると考えられる。例えば、Wolfらは、TGF- $\beta$ に対する抗体の全身投与が、ラットモデルでのIHの発症を著しく低減させたことを実証した (Wolf Y G、Rasmussen L M、およびRuoslahti E. Antibodies against transforming growth factor- $\beta$  1 suppress intimal hyperplasia in a rat model. J Clin Invest. 1994;93(3):1172~8)。血小板由来成長因子 (PDGF) および塩基性線維芽細胞成長因子 (bFGF) も、IH関連SMC増殖に関与する主な因子であると考えられる。例えば、PDGFは、培養されたSMCにおいて用量依存性増殖応答を引き起こし (Uzui H、Lee J D、Shimizu H、Tsutani H、およびUeda T. The role of protein-tyrosine phosphorylation and gelatinase production in the migration and proliferation of smooth muscle cells. Atherosclerosis. 2000;149(1):51~9)、一方、TGF- $\beta$ は増殖を阻害する (Mii S、Ware J A、およびKent K C. Transforming growth factor- $\beta$  inhibits human vascular smooth muscle cell growth and migration. Surgery. 1993;114(2):464~70)。自己由来静脈グラフトの死滅し損傷した細胞から放出されたbFGFは、SMC増殖を促進させる (Qian H、Zhang B、およびZhao H. [gene expression of bfgf and intimal hyperplasia of autologous vein grafts in rats]. Zhonghua Yi Xue Za Zhi. 1996;76(11):826~8)。PDGF転写物のmRNAレベルならびに増殖細胞の数は、ブタ静脈グラフトの新生内膜で最高であることがわかった (Francis S E、Hunter S、Holt C M、Gadsdon P A、Rogers S、Duff G W、Newby A C、およびAngelini G D. Release of platelet-derived growth factor activity from pig venous arterial grafts. J Thorac Cardiovasc Surg. 1994;108(3):540~8)。成長因子は、IHで明らかにある役割を演じるが、MMPも、SMCの増殖を制御することにより、動脈病変の発症に極めて重要であることが示され (Southgate K M、Davies M、Booth R F、およびNewby A C. Involvement of extracellular-matrix-degrading metalloproteinases in rabbit aortic smooth-muscle cell proliferation. Biochem J. 1992;288(Pt 1):93~9; Cho A および Reidy M A. Matrix metalloproteinase-9 is necessary for the regulation of smooth muscle cell replication and migration after arterial injury. Circ Res. 2002;91(9):845~51)、一方、TIMPは、SMCのアポトーシスを促進させることが示された (Annabi B、Shedid D、Ghosn P、Kenigsberg R L、Desrosiers R R、Bojanowski M W、Beaulieu E、Nassif E、Moumdjian R、およびBeliveau R. Differe

10

20

30

40

50

ntial regulation of matrix metalloproteinase activities in abdominal aortic aneurysms. J Vasc Surg. 2002; 35 (3) : 539~46)。

#### 【0018】

IHは、SMC増殖の増加と、アポトーシスの増加および減少の両方とに関連付けられることが示された。内膜アポトーシスの増加が、多くの細胞数に関連付けられた状態であるIHに関連付けられることは、直感に反しているように見える。しかし細胞数の増加は、IHを制御するバランスでのただ1つの事象に過ぎないことに、留意しなければならない。すなわち、アポトーシスには絶対的な増加が生じ得るが、細胞増殖のより大幅な増加は、細胞数の正味の増加をもたらすと考えられる。これらの理由で、増殖を評価する場合にはバランスの両面（すなわち、促進および阻害因子の両方）を評価することが重要である。

10

#### 【0019】

増殖性細胞核抗原 (PCNA) および末端デオキシヌクレオチジルトランスフェラーゼ媒介型dUTP-ビオチニン situニック末端標識 (TUNEL) は、それぞれ無傷のAVG内の増殖およびアポトーシス細胞を、in vivo (Nishibe T、Miyazaki K、Kudo F、Flores J、Nagato M、Kumada T、およびYasuda K. Induction of angiotensin converting enzyme in neointima after intravascular stent placement. Int Angiol. 2002; 21 (3) : 250~5) およびin vitro (Zuckerbraun B S、McCloskey C A、Mahidhara R S、Kim P K、Taylor B S、およびTzeng E. Overexpression of mutated ikappabalpha inhibits vascular smooth muscle cell proliferation and intimal hyperplasia formation. J. Vasc Surg. 2003; 38 (4) : 812~9) で標識するのに使用されてきた。細胞増殖およびアポトーシスは、移植後の第1週目に静脈の外膜および中膜内で生じる同時プロセスであるが、このバランスはその後崩壊して、増殖速度がアポトーシスの速度に勝って増大する (Nishibe T、Miyazaki K、Kudo F、Flores J、Nagato M、Kumada T、およびYasuda K. Induction of angiotensin converting enzyme in neointima after intravascular stent placement. Int Angiol. 2002; 21 (3) : 250~5)。再手術によって切除された狭窄大動脈冠動脈バイパスグラフトの中膜および新生内膜内の増殖レベルは、非狭窄対照よりも著しく高いことが示された (Hilker M、Buerke M、Lehr H A、Oelert H、およびHake U. Bypass graft disease: Analysis of proliferative activity in human aorto-coronary bypass grafts. 2002; 5 Suppl 4 : S331~41)。

20

30

40

#### 【0020】

高い壁応力は、AVG IHに関連付けられており、これは、SMC増殖およびアポトーシスの機械的制御の直接的な結果である可能性がある。例えば、静脈SMCは、動脈レベルの周期的延伸に曝された場合、動脈SMCに比べてそれらの増殖が増加することが示された (Predel H G、Yang Z、von\_Segesser L、Turina M、Buhler F R、およびLuscher T F. Implications of pulsatile stretch on growth of aphenous vein and mammary artery smooth muscle. Lancet. 1992; 340 (8824) : 878~9と、Dethlefsen S M、Shepro D、and D'Amore P A. Comp

50

arison of the effects of mechanical stimulation on venous and arterial smooth muscle cells in vitro. J Vasc Res. 1996; 33 (5) : 405~13)。Liuらは、プロモデオキシウリジン染色およびTUNEL分析を介して、動脈血行動態に起因した機械的延伸が細胞死を誘導し、それが、ラットAVGモデルで後で行われる細胞増殖を媒介する可能性があることを示した(Liu B、Ito H、Louie O、Kubota K、およびKent K C. The signaling protein rho is necessary for vascular smooth muscle migration and survival but not for proliferation. Surgery. 2002 ; 132 (2) : 317~25)。Predelらは、拍動性延伸が、内胸動脈ではなく伏在静脈内でSMC増殖を刺激し、静脈バイパスグラフト疾患に関与する可能性があることを示した(Predel H G、Yang Z、von Segesser L、Turina M、Buhler F R、およびLuscher T F. Implications of pulsatile stretch on growth of saphenous vein and mammary artery smooth muscle. Lancet. 1992; 340 (8824) : 878~9)。静脈が動脈循環に移送されると、静脈は、壁内応力に加えて管腔剪断応力の増大も経験する。事実、培養されたSMCに課された高い剪断応力と周期的延伸との組合せは、PDGF受容体 $\alpha$ を活性化することが示された(Hu Y、Bock G、Wick G、およびXu Q. Activation of pdgfr receptor alpha in vascular smooth muscle cells by mechanical stress. Faseb J. 1998; 12 (12) : 1135~42) [192]。

#### 【0021】

##### リモデリング

血管リモデリングは、典型的には、生体力学的環境の変化に応答した血管の形態またはミクロ構造の変化を指す。これは、生体力学的な止血を回復するための(すなわち、通常レベルの剪断および壁応力に戻すための)組織による試みとして生ずると考えられる。AVGの場合、IHは、SMC遊走および増殖によって引き起こされた大きな内膜厚、大量の内膜アポトーシス、大量のECM沈着に起因した内膜および中膜の硬化、中膜および外膜SMCの肥厚を含む、リモデリングの病理学的形態である。

#### 【0022】

血管細胞は、コラーゲンおよびエラスチンなどのECM成分を生産する。静脈移植術に関連したSMCの表現型修飾は、コラーゲンI型およびエラスチンの生産を増加させることにより特徴付けられたECM合成を変化させることが示された。動脈バイパスグラフトとして使用される静脈は、それらのECM成分の変化を受け、その結果、管腔領域の損失および最終的な閉塞がもたらされる可能性がある。マトリックス合成の変化は、バルーン血管形成術から生じた損傷の後、最初の1週間の間に、過形成新生内膜中に高いコラーゲン含量を直接もたらす。さらに、この過形成リモデリングを受けるAVGは、真新しい静脈に比べて低いコンプライアンスを示し、それらの障害に関与する可能性がある。

#### 【発明の概要】

#### 【発明が解決しようとする課題】

#### 【0023】

IHプロセスの初期事象を防止する信頼性ある手段の開発は、動脈バイパス処置の成果の改善に寄与すると考えられる。したがって本明細書には、典型的には自家、同種、異種間移植処置であるがこれらに限定するものではない処置において、動脈性静脈グラフトまたは任意の管状組織(生細胞構造)を機械的に調整する方法が提供される。このために、本明細書では、静脈、動脈、尿道、腸、食道、気管、気管支、尿管、および卵管を含むがこれらに限定されない管状組織をラッピングする方法が提供される。管状組織は、この管

状組織の円周方向に沿って、生体浸食性（生分解性または生体再吸収性とも呼ばれる）。ポリマーの拘束性繊維マトリックスでラッピングされる。ある非限定的な実施形態では、マトリックスは、エレクトロスピニングによって管状組織上に堆積される。ある特定の非限定的な実施形態では、管状組織は、例えば、冠動脈バイパス処置などの動脈バイパス処置で使用される、伏在静脈などの静脈である。

#### 【0024】

ポリマーマトリックスの生分解速度は、有用な期間にわたってマトリックスが分解するように、操作され最適化されまたはその他の方法で調節されてもよい。例えば、冠動脈バイパスの場合、マトリックスは、グラフトに対するかなりの量の急な応力が防止されるように、12時間以上かけて溶解することが望ましい。ポリマーは、ポリマーマトリックスにより提供された機械的支持がその時間をかけて徐々に低減されるように、かつ静脈が徐々に高いレベルのCWSに曝されるように、所望の時間をかけて分解する。典型的な適用例では、マトリックスは、2週間から2年の期間をかけて生分解する。好ましい実施形態では、マトリックスは、2カ月から1年の期間をかけて生分解する。より好ましい実施形態では、マトリックスは、2から6カ月の期間をかけて生分解する。マトリックスは、生分解速度が線形または非線形になるように構成することができる。

#### 【課題を解決するための手段】

#### 【0025】

この新しい手法は、2つの潜在的な適用例を有する。第1の非限定的な適用例では、マトリックスは、AVGとして使用することが意図される静脈セグメントを修飾するための、外科周辺ツールとして使用することができる。静脈またはその他の管状の解剖学的構造の修飾は、身体から除去した直後に、かつ例えば動脈バイパス手術であるがこれに限定することのないグラフト術の直前に、病床で、静脈を治療することによって行われると考えられる。非限定的な一例では、伏在静脈が収集された後かつ外科医が手術部位を露出させている間に、ポリマーラップを静脈表面にエレクトロスピニングし、その直後にバイパス処置に使用されると考えられる。

#### 【0026】

第2の非限定的な実施形態では、ポリマーマトリックスは、支持体をAVGに送達するための新しいビヒクルとして使用することができる。時間をかけた静脈グラフトの機械的環境の変更は、それ自体がAVGの開存性を改善したが、活性剤および生物学的（細胞）支持体のAVGへの送達は、多くの場合に望ましいと証明することができる。活性剤および／または生物学的物質が組み込まれるエレクトロスピニングされたポリマーラップを調整して、所望の速度で分解させることにより、これら支持体様式の送達速度を制御することができた。

#### 【0027】

一実施形態によれば、管状組織グラフトデバイスが提供される。デバイスは、管状組織と、この管状組織の円周方向に沿った生体浸食性ポリマーの拘束性繊維マトリックスとを含む。マトリックスは、典型的には、管状組織の少なくとも一部（一部分）の円周方向に沿って隣接しておりまたは本質的に隣接している。一実施形態では、管状組織は、静脈から得られ（静脈性であり）、例えば静脈管状組織は伏在静脈の一部から得られるが、これに限定するものではない。その他の実施形態では、管状組織は、動脈、尿道、腸、食道、尿管、気管、気管支、および卵管の1種または複数から選択される（それらの1種または複数から選択された器官／組織から得られる）。デバイスのマトリックスは、12時間から2週間に及ぶ期間にわたって典型的にはその場で生体浸食し（移植されたとき）、これはマトリックスの支持性がその期間をかけて劣化し、マトリックスは必ずしも完全に浸食されるわけではないことを意味する。

#### 【0028】

一実施形態では、デバイスは、ポリマー繊維を管状組織表面にエレクトロスピニングすることによって調製される。ポリマー繊維は、任意の有用な生体浸食性ポリマー組成物を含むことができる。以下に示される一実施形態では、繊維は、例えばポリ（エステルウレ

タン) 尿素を含むがこれに限定されないエステルおよびウレタン結合を含んだポリマーを含む。その他の実施形態では、繊維は： $\alpha$ -ヒドロキシ酸由来のポリマー、ポリラクチド、ポリ(ラクチド- $\alpha$ -グリコリド)、ポリ(L-ラクチド- $\alpha$ -カプロラクトン)、ポリグリコール酸、ポリ(dl-ラクチド- $\alpha$ -グリコリド)、ポリ(1-ラクチド- $\alpha$ -d1-ラクチド)、ラクトンモノマーを含むポリマー、ポリカプロラクトン、カーボネート結合を含むポリマー、ポリカーボネート、ポリグリコネート、ポリ(グリコリド- $\alpha$ -トリメチレンカーボネート)、ポリ(グリコリド- $\alpha$ -トリメチレンカーボネート- $\alpha$ -ジオキサノン)、ウレタン結合を含むポリマー、ポリウレタン、ポリ(エステルウレタン) 尿素、ポリ(エステルウレタン) 尿素エラストマー、エステル結合を含むポリマー、ポリアルカノエート、ポリヒドロキシブチレート、ポリヒドロキシバレレート、ポリジオキサノン、ポリガラクトン、天然ポリマー、キトサン、コラーゲン、エラスチン、アルギネート、セルロース、ヒアルロン酸、およびゼラチンの1種または複数から選択されたポリマーを含む。一実施形態では、ポリマーは、約25重量%から約75重量%のコラーゲンを有するポリ(エステルウレタン) 尿素を含む。このポリマーはエラスチンを含んでいてもよく、例えば、限定するものではないがコラーゲンおよびエラスチンの混合物を約25重量%から約75重量%含み、これは一実施形態によればほぼ(約)等量である。

### 【0029】

さらに別の実施形態では、細胞および治療薬(例えば、薬物、サイトカイン、化学誘引物質、抗生剤、抗炎症薬など)の1種または両方が、マトリックスに関連付けられている(結合し、吸収され、吸着され、成長し、連結されているなど)。一実施形態では、細胞がマトリックスに関連付けられており、例えば、限定するものではないが、幹細胞、前駆(前駆体)細胞、平滑筋細胞、骨格筋芽細胞、心筋細胞、内皮細胞、内皮前駆細胞、骨髄由来の間葉細胞、および遺伝子組換え細胞から選択された細胞の1種または複数、マトリックスに関連付けられている。別の実施形態では、成長因子がマトリックスに関連付けられており、例えば、限定するものではないが、塩基性線維芽細胞成長因子(bFGF)、酸性線維芽細胞成長因子(aFGF)、血管内皮成長因子(VEGF)、肝細胞成長因子(HGF)、インスリン様成長因子(IGF)、トランスフォーミング成長因子- $\beta$ プレイオトロフィンタンパク質、ミッドカインタンパク質、およびIGF-1の1種または複数から選択された成長因子が関連付けられている。別の実施形態では、薬物がマトリックスに関連付けられている。ある非限定的な実施形態では、薬物は、非ステロイド性抗炎症薬、抗生剤、抗凝固因子、免疫抑制剤、グルココルチコイド、イムノフィリンに作用する薬物、インターフェロン、TNF結合タンパク質、タキサン、スタチン、および酸化窒素供与体の1種または複数から選択される。その他において、薬物は、NSAID、サリチル酸、インドメタシン、ナトリウムインドメタシン三水合物、サリチルアミド、ナプロキセン、コルヒチン、フェノプロフェン、スリンダク、ジフルニサル、ジクロフェナク、インドプロフェンナトリウムサリチルアミド、抗炎症性サイトカイン、抗炎症性タンパク質、ステロイド性抗炎症薬、ヘパリン、ペバク、エノキサプリン、アスピリン、ヒルジン、プラビキス、ビバリルジン、プラスグレル、イドラパリヌクス、ワーファリン、クマジン、クロピドグレル、PPACK、GGACK、組織プラスミノゲン活性化因子、ウロキナーゼ、ストレプトキナーゼ、グルココルチコイド、ヒドロコルチゾン、ベタメチゾン、デキサメタゾン、フルメタゾン、イソフルプレドン、メチルプレドニゾロン、プレドニゾン、プレドニゾロン、トリアムシノロンアセトニド、抗血管新生薬、フルオロウラシル、パクリタキセル、ドキソルビシン、シスプラチン、メトトレキセート、シクロホスファミド、エトポシド、ペガブタニブ、ルセンチス、トリプトファン- $t$ RNAシンセターゼ、レタアン、CA4P、AdPEDF、VEGF-TRAP-EYE、AG-103958、アバスタチン、JSM6427、TG100801、ATG3、OT-551、エンドスタチン、サリドマイド、ベカシズマブ、ネオバスタット、抗増殖薬、シロリムス、パクリタキセル、ペリリルアルコール、ファルネシルトランスフェラーゼ阻害剤、FPTII、L744、抗増殖因子、Van 10/4、ドキソルビシン、5-FU、ダウノマ

10

20

30

40

50

イシン、マイトマイシン、デキサメタゾン、アザチオプリン、クロラムブシル、シクロホスファミド、メトトレキセート、モフェチル、血管作用性腸管ポリペプチド、抗体、イムノフィリンに作用する薬物、シクロスポリン、ゾタロリムス、エベロリムス、タクロリムス、シロリムス、インターフェロン、TNF結合タンパク質、タキサン、パクリタキセル、ドセタキセル、スタチン、アトルバスタチン、ロバスタチン、シムバスタチン、プラバスタチン、フルバスタチン、ロスバスタチン、酸化窒素供与体または前駆体、Angeli塩、L-アルギニン、遊離塩基、ジエチルアミンNONOエート、ジエチルアミンNONOエート/AM、Glyco-SNAP-1、Glyco-SNAP-2、(±)-S-ニトロソ-N-アセチルペニシラミン、S-ニトロソグルタチオン、NOC-5、NOC-7、NOC-9、NOC-12、NOC-18、NOR-1、NOR-3、SIN-1、塩酸塩、ナトリウムニトロプルシド、二水和物、スペルミンNONOエート、ストレプトゾトシン、抗生剤、アシクロビル、アフロキサシン、アンピシリン、アムホテリシンB、アトバクオン、アジスロマイシン、シプロフロキサシン、クラリスロマイシン、クリンダマイシン、クロファジミン、ダブソン、ジクラザリル、ドキシサイクリン、エリスロマイシン、エタンブトール、フルコナゾール、フルオロキノロン、フォスカルネット、ガンシクロビル、ゲンタマイシン、イアトロコナゾール、イソニアジド、ケトコナゾール、レボフロキサシン、リンコマイシン、ミコナゾール、ネオマイシン、ノルフロキサシン、オフロキサシン、パロモマイシン、ペニシリン、ペンタミジン、ポリミキシンB、ピラジナミド、ピリメタミン、リファブチン、リファムピン、スバルフロキサシン、ストレプトマイシン、スルファジアジン、テトラサイクリン、トブラマイシン、トリフルオロウリジン、トリメトプリムスルフェート、Zn-ピリチオン、および塩化物、臭化物、ヨウ化物、および過ヨウ素酸塩などの銀塩の1種または複数から選択される。

10

20

### 【0030】

本明細書では、管状組織グラフトデバイスを生成するために管状組織の周方向（外面、円周）に沿って生体浸食性ポリマーの繊維マトリックスを堆積させるステップを含む管状グラフトを調製する方法も提供される。マトリックスは、管状組織の少なくとも一部（一部分）の円周方向に沿って、典型的には隣接しまたは本質的に隣接している。一実施形態では、マトリックスはエレクトロスピンニングにより堆積される。上述のように、マトリックスは、12時間から2週間に及ぶ期間にわたり、典型的にはその場で生体浸食される。

### 【0031】

一実施形態では、管状組織は静脈から得られ、例えば、限定するものではないが静脈管状組織は伏在静脈の一部から得られる。その他の実施形態では、管状組織は、動脈、尿道、腸、食道、尿管、気管、気管支、および卵管の1種または複数から選択される（それらの1種または複数から選択された器官／組織から得られる）。

30

### 【0032】

ポリマー繊維は、任意の有用な生体浸食性および生体適合性ポリマー組成物を含むことができる。以下の示される一実施形態では、繊維は、例えば限定するものではないがポリ（エステルウレタン）尿素を含む、エステルおよびウレタン結合を含んだポリマーを含む。その他の実施形態では、繊維は：α-ヒドロキシ酸由来のポリマー、ポリラクチド、ポリ（ラクチド-co-グリコリド）、ポリ（L-ラクチド-co-カプロラクトン）、ポリグリコール酸、ポリ（DL-ラクチド-co-グリコリド）、ポリ（L-ラクチド-co-DL-ラクチド）、ラクトンモノマーを含むポリマー、ポリカプロラクトン、カーボネート結合を含むポリマー、ポリカーボネート、ポリグリコネート、ポリ（グリコリド-co-トリメチレンカーボネート）、ポリ（グリコリド-co-トリメチレンカーボネート-co-ジオキサノン）、ウレタン結合を含むポリマー、ポリウレタン、ポリ（エステルウレタン）尿素、ポリ（エステルウレタン）尿素エラストマー、エステル結合を含むポリマー、ポリアルカノエート、ポリヒドロキシブチレート、ポリヒドロキシバレレート、ポリジオキサノン、ポリガラクトン、天然ポリマー、キトサン、コラーゲン、エラスチン、アルギネート、セルロース、ヒアルロン酸、およびゼラチンの1種または複数から選択されたポリマーを含む。一実施形態では、ポリマー組成物は、約25重量%から約75重

40

50

量%のコラーゲン、すなわちその範囲内にある増分変量のコラーゲンと共に、ポリ（エステルウレタン）尿素を含む。このポリマーは、例えば限定するものではないがコラーゲンおよびエラスチンの混合物の約25重量%から約75重量%でエラスチンを含んでいてもよく、これらは一実施形態によればほぼ（約）等量である。

### 【0033】

別の実施形態では、方法は、細胞および治療薬（例えば、薬物、サイトカイン、化学誘引物質、抗生剤、抗炎症薬など）の1種または両方を、マトリックスに関連付ける（結合する、吸収させる、吸着させる、成長させる、連結させるなど）ステップを含む。一実施形態では、細胞がマトリックスに関連付けられ、例えば、限定するものではないが幹細胞、前駆（前駆体）細胞、平滑筋細胞、骨格筋芽細胞、心筋細胞、内皮細胞、内皮前駆細胞、骨髄由来の間葉細胞、および遺伝子組換え細胞から選択された細胞の1種または複数が、マトリックスに関連付けられる。別の実施形態では、成長因子がマトリックスに関連付けられ、例えば、限定するものではないが塩基性線維芽細胞成長因子（bFGF）、酸性線維芽細胞成長因子（aFGF）、血管内皮成長因子（VEGF）、肝細胞成長因子（HGF）、インスリン様成長因子（IGF）、トランスフォーミング成長因子-βプレイオトロフィンタンパク質、ミッドカインタンパク質、およびIGF-1の1種または複数から選択された成長因子がマトリックスに関連付けられる。ある非限定的な実施形態では、薬物は、非ステロイド性抗炎症薬、抗生剤、抗凝固因子、免疫抑制剤、グルココルチコイド、イムノフィリンに作用する薬物、インターフェロン、TNF結合タンパク質、タキサン、スタチン、および酸化窒素供与体の1種または複数から選択される。その他において、薬物は、NSAID、サリチル酸、インドメタシン、ナトリウムインドメタシン三水合物、サリチルアミド、ナプロキセン、コルヒチン、フェノプロフェン、スリンダク、ジフルニサル、ジクロフェナク、インドプロフェンナトリウムサリチルアミド、抗炎症性サイトカイン、抗炎症性タンパク質、ステロイド性抗炎症薬、ヘパリン、ペバク、エノキサプリン、アスピリン、ヒルジン、プラビキス、ビバリルジン、プラスグレル、イドラパリヌクス、ワーファリン、クマジン、クロピドグレル、PPACK、GGACK、組織プラスミノゲン活性化因子、ウロキナーゼ、ストレプトキナーゼ、グルココルチコイド、ヒドロコルチゾン、ベタメチゾン、デキサメタゾン、フルメタゾン、イソフルプレドン、メチルプレドニゾロン、プレドニゾン、プレドニゾロン、トリウムシノロンアセトニド、抗血管新生薬、フルオロウラシル、パクリタキセル、ドキソルビシン、シスプラチン、メトトレキセート、シクロホスファミド、エトポシド、ペガブタニブ、ルセンチス、トリプトファンル-tRNAシンセターゼ、レタアン、CA4P、AdPEDF、VEGF-TRAP-EYE、AG-103958、アバスタチン、JSM6427、TG100801、ATG3、OT-551、エンドスタチン、サリドマイド、ベカシズマブ、ネオバスタット、抗増殖薬、シロリムス、パクリタキセル、ペリリルアルコール、ファルネシルトランスフェラーゼ阻害剤、FPTIII、L744、抗増殖因子、Van 10/4、ドキソルビシン、5-FU、ダウノマイシン、マイトマイシン、デキサメタゾン、アザチオプリン、クロラムブシル、シクロホスファミド、メトトレキセート、モフェチル、血管作用性腸管ポリペプチド、抗体、イムノフィリンに作用する薬物、シクロスポリン、ゾタロリムス、エベロリムス、タクロリムス、シロリムス、インターフェロン、TNF結合タンパク質、タキサン、パクリタキセル、ドセタキセル、スタチン、アトルバスタチン、ロバスタチン、シムバスタチン、プラバスタチン、フルバスタチン、ロスバスタチン、酸化窒素供与体または前駆体、Angeli塩、L-アルギニン、遊離塩基、ジエチルアミンNONOエート、ジエチルアミンNONOエート/AM、Glyco-SNAP-1、Glyco-SNAP-2、（±）-S-ニトロソ-N-アセチルペニシラミン、S-ニトロソグルタチオン、NOC-5、NOC-7、NOC-9、NOC-12、NOC-18、NOR-1、NOR-3、SIN-1、塩酸塩、ナトリウムニトロプルシド、二水合物、スベルミンNONOエート、ストレプトゾトシン、抗生剤、アシクロビル、アフロキサシン、アンピシリン、アムホテリシンB、アトバクオン、アジスロマイシン、シプロフロキサシン、クラリスロマイシン、クリンダマイシン、クロファジミン、ダブソン、ジクラザリル、

ドキシサイクリン、エリスロマイシン、エタンブトール、フルコナゾール、フルオロキノロン、フォスカルネット、ガンシクロビル、ゲンタマイシン、イアトロコナゾール、イソニアジド、ケトコナゾール、レボフロキサシン、リンコマイシン、ミコナゾール、ネオマイシン、ノルフロキサシン、オフロキサシン、パロモマイシン、ペニシリン、ペンタミジン、ポリミキシンB、ピラジナミド、ピリメタミン、リファブチン、リファムピン、スバルフロキサシン、ストレプトマイシン、スルファジアジン、テトラサイクリン、トブラマイシン、トリフルオロウリジン、トリメトプリムスルフェート、Zn-ピリチオン、および塩化物、臭化物、ヨウ化物、および過ヨウ素酸塩などの銀塩の1種または複数から選択される。

#### 【0034】

さらに別の実施形態では、静脈と、この静脈の円周方向に沿った生体浸食性ポリマーの隣接拘束性繊維マトリックスとを含む管状組織グラフトデバイスで、冠動脈をバイパスするステップを含む、心臓バイパス法が提供される。この隣接する生体浸食性ポリマーマトリックスは、上述のようなかつこの開示全体を通じた任意のマトリックスであり、上述のような追加の治療薬を含んでもよい。

#### 【図面の簡単な説明】

#### 【0035】

【図1】内膜肥厚の進行を示す概略図である。IEL、内部弾性層；SMC、平滑筋細胞であることにどうか留意されたい。画像は、Robbins Pathologic Basis of Disease、1999 (Kumar V、Fausto N、およびAbbas A. Robbins & coltran pathologic basis of disease. Saunders. 2004)を修正したものである。

【図2】テネイシン-C (TN-C)、トロンスポンジン-1、2-(TSP)、酸性でありシステインに富む分泌タンパク質 (SPARC)、ミトジェン誘導性遺伝子2 (Mig-2)、およびインテグリン結合キナーゼ (ILK)の局在化を示す概略図である。ECM、細胞外マトリックス；αおよびβ、インテグリンであることにどうか留意されたい。

【図3】閉ループ灌流／器官培養システムの1つの概略図である。ループは、拍動性の圧力および流動を提供するBiomedicus遠心力ポンプ (A)、熱交換器 (D)、組織-ハウジングチャンバ (C)、近位 (B1) および遠位 (B2) 圧力変換器、可変抵抗弁 (E)、流動プローブ (F)、収集リザーバ (G)、および血管バイパス (H) からなる。図示されていない構成要素には、外膜浴ループ、He-Neレーザーマイクロメータ、およびデータ収集システムが含まれる。より詳細に関してはLabadie (1996)らを参照されたい (Labadie、R. F.、J. F. Antaki、J. L. Williams、S. Katyal、J. Ligush、S. C. Watkins、S. M. Pham、およびH. S. Borovetz、「Pulsatile perfusion system for ex vivo investigation of biochemical pathways in intact vascular tissue」、American Journal of Physiology、1996、270 (2 Pt 2) :H760~8頁)。

【図4】ブタ内頸静脈セグメントの圧力対直径応答を示す図である。

【図5】上部の3つのパネルは、基準対照 (BASE)、「静脈」48時間灌流対照 (静脈)、および「動脈」48時間灌流 (動脈) した、ブタ内頸静脈セグメントの管腔の、代表的な走査型電子顕微鏡画像を示す。無傷の内皮細胞層の、丸石状の外観に留意されたい。パネルの第2列は、各群の、代表的なミクロ構造とH&E染色を介した生きている核とを示す (倍率200×)。パネルの第3列は、各組織群内の代表的な生 (当初は緑) および死 (当初は赤) 細胞を示す (倍率200×)。BASE対照組織と比較した場合、灌流した組織のネクローシスは高レベルであるようには見えないことに留意されたい。下の3つのパネルは、同じ48時間灌流実験から得た組織の、代表的なTUNELアッセイ画像を示す (浸漬油中、倍率400×)。BASEと比較した場合、灌流した組織のアポトー

10

20

30

40

50

シスは高レベルであるようには見えないことに留意されたい。全てのパネルにおいて、矢印は血管の管腔を示す。

【図6】VEN対ARTのex vivo灌流実験を示す、概略図である。

【図7】ART対cARTのex vivo灌流実験を示す、概略図である。

【図8】ART対wARTのex vivo灌流実験を示す、概略図である。

【図9】静脈／ラップ複合体の断面を示す概略図である。

【図10】終点分析のための灌流後静脈セグメント処理の概略図である。与えられた長さは、負荷がかかっていない血管静止長を表す。

【図11】見せかけのおよびスピニングされた両方のPIJVの、正規化された外径応答を示す図である。スピニングされ（wART）および見せかけの対照PIJVは共に、120/80 mmHgの圧力および100 ml/分の平均流量というART条件下で灌流した。スピニングされた静脈（N=7）の正規化された直径は、見せかけの対照（N=5）と比べた場合、劇的に減少することに留意されたい。加圧された外径（ODp）は、加圧されていない外径（ODup）に対して正規化され、データは、平均±平均の標準誤差として示される。

【図12】表1の各組合せに関する、エレクトロスピニングされたポリマーのPIJVでラッピングされたセグメントの、24時間のex vivo灌流から得られた、CWS対時間を示す図である。下方の水平破線は、静脈条件下でラッピングされていない静脈で測定された平均CWSレベルを示し（CWS<sub>0</sub> 約25 KPa）、中間の水平破線は、冠動脈の平均CWSを示す（約120 KPa）（Labadie R Fら、Pulsatile perfusion system for ex vivo investigation of biochemical pathways in intact vascular tissue. Am J. Physiol. 1996; 270 (Pt 2): H760-8）。上方の破線は、ART条件下、ラッピングされていない静脈（見せかけの対照）で測定された平均CWSを表す。凡例中、ETは、エレクトロスピニング時間を表す。全てのCWS値は、CWS<sub>0</sub>に対して正規化した。データは、平均±平均の標準誤差として示される。

【図13】スピニングされたおよび見せかけの両方の対照PIJVセグメントを刺激するために、エピネフリン（EPI）およびナトリウムニトロプルシド（SNP）を使用して得られた代表的な血管運動性チャレンジ結果を示す図である。SNPは、EPIによる刺激後の組織の自然な緩和が観察された直後に投与されることに、どうか留意されたい。すなわちSNPは、組織の自然の緩和（EPIによる刺激後）が観察されたときに応じて、見せかけのおよびスピニングされたPIJVに関して異なる時間に投与された。実験継続中における各PIJVセグメントの外径の測定を、EPIの初回用量の投与前に測定された基準外径に対して正規化した。

【図14】血管運動性チャレンジ実験（N=4）の結果を示す図である。見せかけの対照とスピニングされたPIJVとの間の収縮または拡張レベルに、有意な相違はないように見える。データは、平均±平均の標準誤差として示される。

【図15】24時間にわたる、見せかけの（A&C）およびスピニングされた（B&D）、両方のPIJVに関するコンプライアンスおよびβ剛性の計算から得た結果を示す図である。データは、平均±平均の標準偏差として表される。

【図16】灌流前でありラッピング処置後（A、C）の、およびex vivo灌流の24時間後（B、D）の両方に関する、H&E（A、B）およびMassonトリクローム画像（C、D）を示す図である。灌流前のポリマーラップの均一な厚さ、および灌流後の画像にポリマーラップが存在しないことに留意されたい。一方向矢印は、血管の管腔を示す。（A）および（C）における両方向矢印は、（B）または（D）で検出できなかったポリマーラップの厚さを示す。

【図17】ピクロシリウスレッド（色はオリジナル）で染色された静脈セクションの、代表的な複屈折画像を示す図である。実験条件は、下記の通り定義され、すなわち：圧力20 mmHgおよび流量20 ml/分の静脈（VEN）条件；圧力120/80 mmHgお

10

20

30

40

50

よび平均流量 100 ml / 分の拍動性動脈 (ART) 条件 ; およびラッピングされた静脈セグメントが *ex vivo* で 24 時間にわたり ART 条件下で灌流された、ラッピングされた動脈 (wART) 条件と定義される。矢印は、血管の管腔を示す。

【図 18】静脈組織セクションの、Movat のペンタクローム染色を示す図である (色はオリジナル)。各画像において、コラーゲンは黄色に染色され、エラスチンおよび核は黒色に染色され、筋肉は赤色に染色される。wART セクションの外膜側における赤色染色は、*ex vivo* 灌流実験中にポリマー内に捕えられるようになる、培地タンパク質の非特異的な染色である。矢印は、血管の管腔を示す。

【図 19】(A) は、エレクトロスピンニングされたポリマーが、その外膜表面上に堆積されている、PIJV セグメントの低倍率 SEM 画像を示す図である。(B) は、ポリマーラップが付着された後の、PIJV の外膜表面の SEM 画像 (倍率 500 × で撮影された) である。ポリマーラップの高い多孔度に留意されたい。(C) は、静脈へのポリマーラップの取着を示す SEM 画像 (倍率 500 × で撮影された) である。(D) は、静脈の管腔表面の SEM 画像 (倍率 500 × で撮影された) であり、無傷のままであるように見える連続内皮層を示す。

10

【図 20】エレクトロスピンニング後と、エレクトロスピンニング後の静置培養から 18 および 92 時間後の、PIJV におけるネクロシスのレベルを評価するための、定量化された Live / Dead (商標) 結果を示す図である。示されるデータは、単一実験に関するものであり、誤差棒は、PIJV セグメント当たりで分析された 10 回の値から得られる。データは、平均 ± 平均の標準誤差として表される。

20

【図 21】蛍光ベースの TUNEL 分析から得られた (色はオリジナル) 代表的な免疫組織化学画像である。上部 2 つのパネルは、24 時間 VEN (A) 対 ART (B) の実験からのものである。次の 2 つのパネルは、24 時間 ART (C) 対 cART (D) の実験からのものである。3 列目のパネルは、72 時間 ART (E) 対 cART (F) の実験からのものである。下の 2 つのパネルは、24 時間 ART (G) 対 wART (H) の実験からのものである。矢印は、アポトーシス細胞を示す。L は、PIJV 管腔を示す。

【図 22】全ての *ex vivo* 血管灌流実験から PIVJ 内のアポトーシス細胞のパーセンテージを評価するために、蛍光ベースの TUNEL 分析から得られた、定量化された免疫組織化学結果を示す図である。データは、平均 ± 平均の標準誤差として表される。

【図 23】HRP / ABC ベースの PCNA 分析から得られた (色はオリジナル)、代表的な免疫組織化学画像である。上の 2 つのパネルは、24 時間 VEN (A) 対 ART (B) の実験からのものである。次の 2 つのパネルは、24 時間 ART (C) 対 cART (D) の実験からのものである。3 列目のパネルは、72 時間 ART (E) 対 cART (F) の実験からのものである。下の 2 つのパネルは、24 時間 ART (G) 対 wART (H) の実験からのものである。矢印は、増殖細胞を示す。L は、PIJV 管腔を示す。

30

【図 24】全ての *ex vivo* 血管灌流実験から PIVJ 内の増殖細胞のパーセンテージを評価するための、HRP / ABC ベースの PCNA 発現分析から得られた、定量化された免疫組織化学結果を示す図である。データは、平均 ± 平均の標準誤差として表される。

【図 25】HRP / ABC ベースのゴルジ複合体分析から得られた (色はオリジナル)、代表的な免疫組織化学画像である。上の 2 つのパネルは、24 時間 VEN (A) 対 ART (B) の実験からのものである。次の 2 つのパネルは、24 時間 ART (C) 対 cART (D) の実験からのものである。3 列目のパネルは、72 時間 ART (E) 対 cART (F) の実験からのものである。下の 2 つのパネルは、24 時間 ART (G) 対 wART (H) の実験からのものである。矢印は、陽性染色された細胞を示す。L は、PIJV 管腔を示す。

40

【図 26】全ての *ex vivo* 血管灌流実験から PIVJ 内のゴルジ複合体を陽性染色する細胞のパーセンテージを評価するための、HRP / ABC ベースのゴルジ複合体発現分析から得られた、定量化された免疫組織化学結果を示す図である。データは、平均 ± 平均の標準誤差として表される。

50

【図 27】左：エレクトロスピンングプロセス中にラッピングされた P I J V セグメントを示す図である。中：本明細書に提示されるような、頸動脈間置グラフトとして移植された、ラッピングされた P I J V を示す図である。右：ラッピングされていない P I J V グラフトを示す図である。ラッピングされた P I J V (B) は、ラッピングされていない静脈 (C) の場合にそうであるように動脈圧の下で拡張しないことに留意されたい。

【図 28】スピニングされた、および見せかけの、両方の A V G から得られた、蛍光透視血管造影画像である。

【図 29】I H の形態計測測定に使用された (色はオリジナル)、代表的な M o v a t のペンタクローム染色画像である。内膜と中膜との厚さの比は、上記方程式を使用して計算した。

【図 30】I H の形態計測測定から得られた、定量化された結果の概要を示す図である。P < 0.05 は、統計的に有意であると見なされた。統計的有意性に向かう傾向のみが観察されたことに留意されたい。

【図 31】2つの i n v i v o 実験から得られた低倍率 (30 倍) S E M 画像であって、A V G が閉塞していない状態を示す画像である。A および B は、グラフトが完全に開通している実験から得られた。C および D は、グラフトが部分的にのみ閉塞している実験から得られた。これらの画像は、静脈グラフトと頸動脈との間の解剖学的界面を示す。

【図 32】本発明の管状グラフトデバイスの側断面図であって、このデバイスの長さの少なくとも一部に沿ってその厚さが変化する、周囲を取り囲む繊維マトリックスを有する管状部材が含まれる図である。

【図 33】図 33 a は、本発明の管状グラフトデバイスの側断面図であり、図 33 B は、本発明の管状グラフトデバイスの端面断面図であり、それぞれ、このデバイスの円周方向のセクションの少なくとも一部に沿ってその厚さが変化する、周囲を取り囲む繊維マトリックスを有する管状部材が含まれている図である。

【図 34】本発明の管状グラフトデバイスの側断面図であって、このデバイスの長さの少なくとも一部に沿ってその性質が変化する、周囲を取り囲む繊維マトリックスを有する管状部材が含まれている図である。

【図 35】本発明の管状グラフトデバイスの側断面図であって、繊維マトリックスおよび第 2 の足場構造の両方によって取り囲まれた管状部材を含んでいる図である。

【図 36】本発明の管状グラフトデバイスを製造する好ましい方法のフローチャートであって、患者評価処置を行うステップと、この患者評価から得られたデータに基づいて繊維マトリックスを管状部材に付着させるステップとを含んでいるフローチャートである。

【図 37】本発明の管状グラフトデバイスを製造する好ましい方法のフローチャートであって、管状部材への繊維マトリックスの付着中に 1 つまたは複数のプロセス出力パラメータを監視するステップを含んでいるフローチャートである。

【発明を実施するための形態】

【0036】

本明細書では、典型的には、しかし限定するものではないが自家、同種、異種間移植処置において、動脈性静脈グラフトまたは任意の管状組織を機械的に調整する方法が提供される。このために、本明細書では、静脈、動脈、尿道、腸、気管、食道、尿管、および卵管を含むがこれらに限定するものではない管状組織をラッピングする方法が提供される (グラフト様のそれらの組織供給源の任意の部分の意味し、全体的な構造または実質的に全体的な構造の使用が 1 つの選択肢ではあるものの、記述された解剖学的構造全体がグラフトの目的で使用されることを示唆するものではない。したがって、管状組織が伏在静脈などの静脈であるという場合、これは、全伏在静脈を使用しなければならないことを意味するものではない)。構造は、管状組織の円周方向に沿って生体浸食性ポリマーの拘束性繊維マトリックスでラッピングされる。本明細書で記述される「繊維」は、細長い、引き伸ばされた、細長い、スレッド状の、および/またはフィラメント状の構造である。「マトリックス」は、規則正しく (例えば、織られた、または不織メッシュ) またはランダムに配置構成された (エレクトロスピンングによって典型的に生成される繊維のマットで代表

10

20

30

40

50

されるような)、要素(例えば、繊維)の任意の2または3次元配置構成である。

#### 【0037】

マトリックスは、典型的には、管状組織の円周方向に沿って実質的にまたは本質的に隣接しており、マトリックスは、表面上のおよびある部分の円周方向に沿った、しかし管状組織の全表面(例えば、長さ)を覆うことを必ずしも必要としない、連続的な支持体となる環を形成することを意味している。マトリックスは「拘束的」であり、このマトリックスは、管状組織の外面に実質的に接触しており、グラフト化されたときに管状組織の実質的な円周方向の拡張を拘束し、妨害し、かつ／または防止することを意味する。マトリックスによる拘束の程度は、典型的には、典型的な動脈圧の下で管状組織がその組織の実質的な最大膨張直径まで膨張しないようなものである(例えば、図4参照)。マトリックスは、拘束的である限り弾性にすることができる。マトリックスが生体浸食性である場合、マトリックスの拘束的な性質は、マトリックスが浸食されるにつれて時間の経過と共に弱くなる。

10

#### 【0038】

ある非限定的な実施形態では、マトリックスは、エレクトロスピニングによって、管状の解剖学的構造または器官などの管状組織上に堆積される。ある特定の非限定的な実施形態では、解剖学的構造は、例えば、冠動脈バイパス処置などの動脈バイパス処置に使用される、伏在静脈などの静脈である。

#### 【0039】

管状組織の表面上に微細な繊維を堆積する任意の有用な方法を用いることができるが、エレクトロスピニングは、実質的に均一な繊維をそのような表面上に堆積する有用な方法である。エレクトロスピニングは、自然の細胞外マトリックス(ECM)に規模および繊維状の性質が似ている足場の製作を可能にする。ECMは、サブミクロンおよびナノメートルサイズの規模の、繊維、細孔、およびその他の表面フィーチャからなる。そのようなフィーチャは、遊走および配向など、合成材料との細胞の相互作用に直接影響を及ぼす。エレクトロスピニングは、固有の異方性を有する足場をもたらす配向繊維の製作も可能にする。これらの位置合わせされた足場は、細胞の成長、形態、およびECM生産に影響を及ぼす可能性がある。例えば、Xuらは、ポリ(L-ラクチド-co-ε-カプロラクトン)繊維との平滑筋細胞(SMC)アライメントを見出し(Xu C. Y.、Inai R.、Kotaki M.、Ramakrishna S.、「Aligned bio degradable nanofibrous structure: a potential for blood vessel engineering」、Biomaterials 2004(25)877~86)、Leeらは、機械的刺激に対してアライメントされた非生体浸食性ポリウレタンを提示し、かつランダムに組織化された足場におけるよりもアライメントされた足場上で培養された細胞のほうが多くのECMを生産することを見出した(Lee C. H.、Shin H. J.、Cho I. H.、Kang Y. M.、Kim I. A.、Park K. D.、Shin J. W.、「Nanofiber alignment and direction of mechanical strain affect the ECM production of human ACL fibroblast」、Biomaterials 2005(26)1261~1270)。

20

30

40

#### 【0040】

一般に、エレクトロスピニングのプロセスは、針またはピペットの先端などの小さなオリフィスと定量ポンプとを備えたりザーバに、ポリマー含有流体(例えば、ポリマー溶液、ポリマー懸濁液、またはポリマー溶融体)を配置するステップを含む。高電圧源の1つの電極も、ポリマー含有流体またはオリフィスに電氣的に接触した状態で配置され、一方、その他の電極は、標的(典型的には、コレクタースクリーンまたは回転マンドレル)に電氣的に接触するように配置される。エレクトロスピニング中、ポリマー含有流体は、溶液またはオリフィスに高電圧(例えば、約3~15 kV)を印加することによって帯電し、次いで定常流を供給する定量ポンプによって小さなオリフィス内を強制的に通過する。

50

オリフィスのポリマー含有流体は、通常、表面張力により半球形状を有すると考えられるが、高電圧の印加によって、通常ならオリフィスで半球形状のポリマー含有流体は細長くなり、Taylorコーンとして知られる円錐形を形成する。十分高い電圧がポリマー含有流体および／またはオリフィスに印加されると、帯電したポリマー含有流体の反発する静電気力によって表面張力が克服され、帯電した流体噴流がTaylorコーンの先端から排出され、標的に向かって加速し、そこには典型的には $-2$ から $-10\text{ kV}$ の間でバイアスがかけられる。任意選択で、バイアスがかけられた（例えば、 $1\sim 10\text{ kV}$ ）焦点リングを使用して、ポリマー含有流体の帯電噴流の軌道の方角を定めることができる。流体の帯電噴流が、バイアスされた標的に向かって移動するにつれ、この噴流は、複雑化したホイッピングおよび曲げ運動を受ける。流体がポリマー溶液または懸濁液である場合、溶媒は、典型的には飛行中に蒸発し、バイアスされた標的上にポリマー繊維を残す。流体がポリマー溶融体である場合、この溶融したポリマーは飛行中に冷却され凝固し、バイアスされた標的上にポリマー繊維として収集される。ポリマー繊維が、バイアスされた標的上に蓄積されるにつれ、不織多孔質メッシュ（マトリックス）が、バイアスされた標的上に形成される。

10

#### 【0041】

エレクトロスピンニングされたエラストマーマトリックスの性質は、エレクトロスピンニング条件を変えることによって調整することができる。例えば、バイアスされた標的がオリフィスに比較的近い場合、結果的に得られるエレクトロスピンニングされたメッシュは、不均一に太い繊維を含有する傾向にあり、この繊維の一部の領域が「ビーズ状」の外観を有するようになる。しかし、バイアスされた標的がオリフィスからさらに遠くに離れていくにつれ、不織メッシュの繊維はその厚さがより均一になる傾向にある。さらに、バイアスされた標的は、オリフィスに対して移動することができる。ある実施形態では、バイアスされた標的は、規則的で周期的な状態で前後に移動し、不織メッシュの繊維は互いに実質的に平行になる。そのような場合、得られた不織メッシュは、繊維に直角な方向よりも繊維に平行な方向において、より高い歪み抵抗を有していてもよい。その他の実施形態では、バイアスされた標的は、オリフィスに対してランダムに移動し、その結果、不織メッシュの平面内の歪み抵抗は等方的になる。標的は、回転マンドレルにすることもできる。この場合、不織メッシュの性質は、回転速度を変えることによって変化させてもよい。エレクトロスピンニングされたエラストマー性の足場の性質は、エレクトロスピンニングシステムに印加された電圧の大きさを変化させることによって変えてもよい。特定の好ましい一実施形態において、エレクトロスピンニング装置は、 $12\text{ kV}$ にバイアスがかけられたオリフィスと、 $-7\text{ kV}$ にバイアスがかけられた標的と、 $3\text{ kV}$ にバイアスがかけられた焦点リングとを含む。さらに、有用なオリフィス直径は $0.12\text{ cm}$  ( $0.047\text{ ''}$ ) ( $I.D.$ ) であり、有用な標的距離は約 $23\text{ cm}$ である。ポリマー懸濁液または溶融体に印加される高電圧の有用な範囲は $0.5\sim 30\text{ kV}$ であり、より好ましくは $5\sim 25\text{ kV}$ であり、さらにより好ましくは $10\sim 15\text{ kV}$ である。

20

30

#### 【0042】

エレクトロスピンニングは、2つ以上のノズル、すなわち各ノズルが異なるポリマー溶液の供給源である2つ以上のノズルを使用して行ってもよい。ノズルには、得られる不織ポリマーメッシュの物理的および化学的性質を調整するために、異なるバイアスでまたは同じバイアスでバイアスをかけてもよい。さらに、多くの異なる標的を使用してもよい。平らなプレート状の標的に加え、マンドレルを標的として使用してもよい。

40

#### 【0043】

エレクトロスピンニングが、ポリマー懸濁液を使用して行われる場合、懸濁液中のポリマー成分の濃度は、エラストマー性の足場の物理的性質を修正することによって変えることもできる。例えば、ポリマー成分が比較的低い濃度で存在する場合、エレクトロスピンニングされた不織メッシュの、結果的に得られる繊維は、ポリマー成分が比較的高い濃度で存在する場合よりも小さい直径を有する。この理論によって如何様にも限定しようとするものではないが、より低い濃度の溶液はより低い粘度を有し、それがオリフィス内へのより

50

速い流れをもたらして、より細い繊維が生産されと考えられる。当業者なら、所望の特性の繊維が得られるように、ポリマー濃度を調節することができる。ポリマー成分の濃度の有用な範囲は、約1重量%から約15重量%、約4重量%から約10重量%、および約6重量%から約8重量%を含む。

#### 【0044】

使用中、マンドレルは静脈などの管状組織内に配置され、ポリマー繊維は、マンドレルの回転によって組織の少なくとも一部の円周方向に沿って堆積される。マンドレルは、スピナレットとコレクタとの間を長手方向に往復させて、管状組織の被覆範囲を増大させることができる。

#### 【0045】

マトリックスの厚さは、堆積されるポリマー組成物の粘度を調節することによって、かつ／またはエレクトロスピンニングの持続時間を調節することによって、制御することができる。より粘度の高いポリマー組成物の使用は、より太い繊維をもたらす可能性があり、所望の厚さのマトリックスを堆積するのに少しの時間しか必要としない。より低い粘度のポリマー組成物の使用は、より細い繊維をもたらす可能性があり、所望の厚さのマトリックスを堆積するのに長い堆積時間を必要とする。マトリックスの厚さおよびマトリックス内の繊維の太さは、マトリックスの生体浸食速度に影響を及ぼす。これらのパラメータは、所望のまたは最適な生理学的効果を発揮させるため、マトリックスの最終用途に応じて最適化される。

#### 【0046】

ポリマーマトリックスの生分解速度は、有用な時間にわたってマトリックスが分解するように、操作されてもよく、最適化されてもよく、またはその他の方法で調節されてもよい。例えば、冠動脈バイパスの場合、マトリックスは、グラフト上にかなりの量の突然の応力がかかるのを防止するように、12時間以上かけて溶解することが望ましい。ポリマーは、ポリマーマトリックスによって提供された機械的支持がその時間をかけて徐々に低下するように、かつ徐々に増加するCWSレベルに静脈が曝され得るように、所望の時間にわたって分解される。

#### 【0047】

この新しい手法には、2つの潜在的な適用例があると考えられる。第1の非限定的な適用例では、マトリックスを、AVGとしての使用が意図される静脈セグメントを修正するための外科周辺ツールとして使用することができる。静脈またはその他の管状組織または解剖学的構造の修正は、病床で、身体から除去した直後に、およびグラフト化する直前に、例えば限定するものではないが動脈バイパス手術中に行ってもよい。非限定的な一例では、伏在静脈が収集された後、かつ外科医が手術（グラフト）部位を露出させている間に、ポリマーラップを静脈表面にエレクトロスピンニングし、その直後にこれをバイパス処置に使用する。

#### 【0048】

第2の非限定的な実施形態では、ポリマーマトリックスを、AVGに支持体を送達するためのビヒクルとして使用することができる。経時的な静脈グラフトの機械的環境の修正そのものによって、AVGの開存度は改善されるが、活性剤および生物学的（細胞性）支持体のAVGへの送達は、多くの場合に望ましいことを証明することができる。所望の速度で分解するように、活性剤および／または生物学的物質が組み込まれているエレクトロスピンニングされたポリマーラップを調整することによって、これら支持体様式の送達速度を制御することができる。

#### 【0049】

AVGに支持体を送達するための、ラップの血管周囲配置への先の手法は、臨床解釈に対する律速障壁を有し、エレクトロスピンニングされた生分解性ポリマーを使用する本明細書に提示される手法は、これらの限定に対処する。

#### 【0050】

静脈グラフトの周りでの外部シースの使用は、最初にParsonnetらによって記

10

20

30

40

50

述された。彼らは、シースが拡張を防止することを示し、これは宿主組織により十分受け入れられ、支持された血管と支持されていない血管との間の引張り強さに相違はなかった (Parsonnet V、Lari A A、and Shah I H. New stent for support of veins in arterial grafts. Arch Surg. 1963; 87: 696~702)。Karayannacosらは、支持体のない対照グラフトに比べ、緩いフィッティングおよび緊密なフィッティングの両方のDacronメッシュシースを用いたAVGにおいて、少ない血栓および内皮下増殖を示した (Karayannacos P E、Hostetler J R、Bond M G、Kakos G S、Williams R A、Kilman J W、およびVasko J S. Late failure in vein grafts: Mediating factors in subendothelial fibromuscular hyperplasia. Ann Surg. 1978; 187 (2): 183~8)。Mehtaらは、外部のマクロ多孔性非拘束性ポリエステルステントの配置が、ブタ静脈グラフトで新生内膜形成を低減させることを実証した (Mehta D、George S J、Jeremy J Y、Izzat M B、Southgate K M、Bryan A J、Newby A C、およびAngelini G D. External stenting reduces long-term medial and neointimal thickening and platelet derived growth factor expression in a pig model of arteriovenous bypass grafting. Nat. Med. 1998; 4 (2): 235~9)。より最近では、ポリテトロフルオロエチレンのシースを使用して、動脈圧下でAVGが永続的に拡張しないようにし、この結果、ブタモデルでのIH形成が低減した (Liu S Q、Moore M M、Glucksberg M R、Mockros L F、Grotberg J B、およびMok A P. Partial prevention of monocyte and granulocyte activation in experimental vein grafts by using a biomechanical engineering approach. J. Biomech. 1999; 32 (11): 1165~75)。

#### 【0051】

AVGに対する永続的な機械的支持の臨床解釈は、血管適用例における生体耐久性の合成材料に対する好ましくない炎症応答に十中八九起因して、未だ報告されていない (Bunt T J. Synthetic vascular graft infections. I. Graft infections. Surgery. 1983; 93 (6): 733~46、およびEdwards W H、Jr.、Martin R S、3rd、Jenkins J M、Edwards W H、Sr.、およびMulherin J L、Jr. Primary graft infections. J Vasc Surg. 1987; 6 (3): 235~9)。この限定により、VijayanらおよびJeremyらは、ポリグラクチンをベースにした生分解性シースを使用してAVGにおけるIHを低減させようとした (Jeremy J Y、Bulbulia R、Johnson J L、Gadsdon P、Vijayan V、Shukla N、Smith F C、およびAngelini G D. A bioabsorbable (polyglactin)、nonrestrictive、external sheath inhibits porcine saphenous vein graft thickening. J Thorac Cardiovasc Surg. 2004; 127 (6): 1766~72; Vijayan V、Shukla N、Johnson J L、Gadsdon P、Angelini G D、Smith F C、Baird R、およびJeremy J Y. Long-term reduction of medial and intimal thickening in porcine saphenous vein grafts with a p

olylactin biodegradable external sheath. J Vasc Surg. 2004; 40 (5) : 1011~9; および Vijayan V、Smith F C、Angelini G D、Bulbulia R A、および Jeremy J Y. External supports and the prevention of neointima formation in vein grafts. Eur J Vasc Endovasc Surg. 2002; 24 (1) : 13~22)。顕著な有益な作用には、ラッピングされていない対照よりも高い新生栄養血管の発生が含まれた (Vijayan V、Shukla N、Johnson J L、Gadsdon P、Angelini G D、Smith F C、Baird R、および Jeremy J Y. Long-term reduction of medial and intimal thickening in porcine saphenous vein grafts with a polyglactin biodegradable external sheath. Vasc Surg. 2004; 40 (5) : 1011~9)。しかし、これらの生分解性シースは緩いフィッティングであり、AVGは動脈圧下でその最大直径にまで拡張され、したがって、高レベルのCWSに対する機械的支持が提供されなかった。Vijayanら (Vijayan V、Shukla N、Johnson J L、Gadsdon P、Angelini G D、Smith F C、Baird R、および Jeremy J Y. Long-term reduction of medial and intimal thickening in porcine saphenous vein grafts with a polyglactin biodegradable external sheath. J Vasc Surg. 2004; 40 (5) : 1011~9、および Vijayan V、Smith F C、Angelini G D、Bulbulia R A、および Jeremy J Y. External supports and the prevention of neointima formation in vein grafts. Eur J Vasc Endovasc Surg. 2002; 24 (1) : 13~22) および Jeremyら (Jeremy J Y、Bulbulia R、Johnson J L、Gadsdon P、Vijayan V、Shukla N、Smith F C、および Angelini G D. A bioabsorbable (polyglactin)、nonrestrictive、external sheath inhibits porcine saphenous vein graft thickening. J Thorac Cardiovasc Surg. 2004; 127 (6) : 1766~72) により使用された手法の前に、Huynhらは、一時的な外部コラーゲンチューブ支持体を使用して、ウサギ静脈グラフトでのIH形成を低減させた。これらのコラーゲンチューブも非拘束性であり、分解動態についての記述は報告されなかった (Huynh T T、Iaccarino G、Davies M G、Safi H J、Koch W J、および Hagen P O. External support modulates g protein expression and receptor coupling in experimental vein grafts. Surgery. 1999; 126 (2) : 127~34)。エレクトロスピニングされた架橋コラーゲンは水溶液中で非常に素早く分解することが報告されており (Rho K S、Jeong L、Lee G、Seo B M、Park Y J、Hong S D、Roh S、Cho J J、Park W H、および Min B M. Electrospinning of collagen nanofibers: Effects on the behavior of normal human keratinocytes and early-stage wound healing. Biomaterials. 2006; 27 (8) : 1452~61)、したがって、コラーゲン単独で作製されたシースによりAVGに対して提供された構造支持は、長時間にわたり効果を発揮するには非常に一時的なものでありすぎる可能性がある。Liaoらによ

り開発された外部AVGシースは、時間と共に徐々にCWSをAVGに移すために、所望の速度で分解するよう設計された。ポリ（乳酸- $\alpha$ -グリコール酸）シートは、Teflon棒の周りをラッピングすることによってチューブへと予め製作され、したがってシートは、各AVGに合わせてカスタマイズできない（Liao S W、Lu X、Putnam A J、およびKassab G S. A novel time-varying poly lactic- $\alpha$ -glycolic acid external sheath for vein grafts designed under physiological loading. Tissue Eng. 2007;13(12):2855~62）。すなわち、先の手法の場合のように、Liaoらの手法によれば、任意の機械的支持を送達する前に動脈圧下でAVGを拡張させる。本明細書に記述される中間-AVG-壁におけるものではなく、シースにおける分解動態および得られるCWS対時間プロファイルが報告された。本発明者らの手法は、上述の先の研究に関連した2つの主な限定、特に生体耐久性および／または非拘束性外部シースに対する限定に対処する。

10

#### 【0052】

AVGへの機械的支持の送達は、外膜ラップに関する1つの可能性に過ぎない。その他の適用例は、生化学的物質、薬物、遺伝子、または細胞の局所送達用のビヒクルとすることができる。Kanjickalらは、シクロスポリンからAVGへの持続的局所送達のためにポリ（エチレングリコール）ヒドロゲルを使用し、吻合IHの発症を首尾よく低減させた（Kanjickal D、Lopina S、Evancho-Chapman M M、Schmidt S、Donovan D、およびSpringhetti S. Polymeric sustained local drug delivery system for the prevention of vascular intimal hyperplasia. J Biomed Mater Res A. 2004;68(3):489~95）。別の研究では、Cagianosらが、ポリテトラフルオロエチレンのシースを使用してラバマイシン（シロリムス）をAVGに局所的に送達し、ブタモデルにおける吻合IHを効果的に低減させた（Cagianos C、Abul-Khoudoud O R、DeRijk W、Shell D Ht、Jennings L K、Tolley E A、Handorf C R、およびFabian T C. Rapamycin-coated expanded polytetrafluoroethylene bypass grafts exhibit decreased anastomotic neointimal hyperplasia in a porcine model. J Vasc Surg. 2005;42(5):980~8）。より最近では、Kohlerらが、生分解性メッシュを使用してパクリタキセルを送達することにより、透析アクセスのヒツジモデルにおけるグラフト-静脈吻合でのIHを効果的に低減させた（Kohler T R、Tolcik P M、Gravett D M、およびAvelar R L. Inhibition of neointimal hyperplasia in a sheep model of dialysis access failure with the bioabsorbable vascular wrap paclitaxel-eluting mesh. J Vasc Surg. 2007;45(5):1029~1037;discussion 1037~8）。そのような活性は、エレクトロスピニングされたポリマーラップ技法を使用して理論的に組み込むことができ、エレクトロスピニングされたポリマーラップの分解速度を調整することによりある程度まで送達速度を制御する可能性がある。

20

30

40

#### 【0053】

本発明者らの知見によれば、生分解性AVGラップ／シースを介した細胞の送達は、これまで報告されておらず、したがって、外膜ラップのこの可能性ある将来の適用例は新規であると考えられる。本明細書で使用されるポリマーは特徴付けられており（Stankus J J、Guan J、およびWagner W R. Fabrication

50

of biodegradable elastomeric scaffolds with sub-micron morphologies. J Biomed Mater Res A. 2004; 70 (4) : 603~14)、存続可能なSMCと共に首尾よく微細統合されており (Stankus J J、Guan J、Fujimoto K、およびWagner W R. Microintegrating smooth muscle cells into a biodegradable, elastomeric fiber matrix. Biomaterials. 2006; 27 (5) : 735~44)、それ自体をこの潜在的な将来の適用例に供することができると考えられる。

#### 【0054】

生分解性ポリマーは、ポリマーおよびその分解生成物が、非発癌性でありかつ非免疫原性であることも含めて実質的に無毒であるので、また実質的な毒性作用のない生物 (患者) などの生体系において一掃されまたはその他の方法で分解するので、「生体適合性」である。生体系内での分解メカニズムの非限定的な例には、化学反応、加水分解反応、および酵素切断が含まれる。生分解性ポリマーには、天然ポリマー、合成ポリマー、天然および合成ポリマーのブレンドが含まれる。例えば、限定するものではないが、天然ポリマーにはキトサン、コラーゲン、エラスチン、アルギネート、セルロース、ポリアルカノエート、ヒアルロン酸、またはゼラチンが含まれる。天然ポリマーは、天然の供給源から得ることができ、または本明細書に記述される技術の文脈におけるそれらの使用において、合成方法 (組換え方法によるものも含む) により調製することができる。合成ポリマーの非

#### 【0055】

本明細書で使用される「ポリマー組成物」という用語は、1種または複数のポリマーを含む組成物である。1つの種類として、「ポリマー」という用語には、ホモポリマー、ヘテロポリマー、コポリマー、ブロックポリマー、ブロックコポリマーが含まれ、天然および合成の両方にすることができる。ホモポリマーは1つのタイプの構成単位、またはモノマーを含有し、一方、コポリマーは、2つ以上のタイプのモノマーを含有する。例えば、限定するものではないが、ポリマーは、ポリラクチド、ポリ (ラクチド- $\alpha$ -グリコリド)、ポリ (L-ラクチド- $\epsilon$ -カプロラクトン)、ポリグリコール酸、ポリ (d,l-ラクチド- $\alpha$ -グリコリド)、ポリ (l-ラクチド- $\alpha$ -d,l-ラクチド) を含む、 $\alpha$ -ヒドロキシ酸由来のモノマーを含むポリマー; ポリヒドロキシブチレート、ポリヒドロキシバレレート、ポリジオキサノン、およびポリガラクトンを含む、エステル由来のモノマーを含むポリマー; ポリカプロラクトンを含む、ラクトン由来のモノマーを含むポリマー; ポリカーボネート、ポリグリコネート、ポリ (グリコリド- $\epsilon$ -トリメチレンカーボネート)、ポリ (グリコリド- $\epsilon$ -トリメチレンカーボネート- $\epsilon$ -ジオキサノン) を含む、カーボネート由来のモノマーを含むポリマー; ポリウレタン、ポリ (エステルウレタン) 尿素エラストマーを含む、ウレタン結合を通して接合されたモノマーを含むポリマーがある。

#### 【0056】

非限定的な実施形態によれば、ポリマー組成物は、コラーゲンおよびエラスチンの1種または両方を含む。コラーゲンは、一般的なECM成分であり、典型的には、多くの合成生体浸食性ポリマーよりも速い速度で *in vivo* で分解する。したがって、ポリマー組成物中のコラーゲン含量の操作は、*in vivo* での生体浸食速度を修正する方法として使用することができる。コラーゲンは、約2重量%から約95重量%を含むがこれらに限定することのない任意の有用な範囲でポリマー組成物中に存在してもよく、しかし、より典型的には約25重量%から約75重量%の範囲であって、それらの間の全ての範囲および点を含むものであり、約40重量%から約75重量%を含み、約75重量%から約42.3重量%を含む。エラスチンは、高い弾性を提供するために、ポリマー組成物に組み込まれていてもよい。エラスチンを使用することにより、静脈などの管状組織を支援し

て、動脈での使用などその新しい機能に適合させるため、拘束性マトリックスの円周方向のわずかな拡張をもたらすことができる。エラスチンは、任意の有用な範囲でポリマー組成物中に存在していてもよく、この範囲には、限定するものではないが約2重量%から約50重量%であってそれらの間の全ての範囲および点が含まれ、そこには約40重量%から約42.3重量%であってそれらの間の全ての整数および全ての点とそれらの均等物が含まれるものである。1つの非限定的な実施形態では、コラーゲンおよびエラスチンは、ポリマー組成物中にほぼ等量で存在する。別の実施形態では、ポリマー組成物中のコラーゲンおよびエラスチンの含量の合計は、任意の有用な範囲にあり、この範囲には、限定するものではないが約2重量%から約95重量%が含まれ、しかしより典型的には、約25重量%から約75重量%の範囲であってそれらの間の全ての範囲および点を含むものであり、約40重量%から約75重量%が含まれ、約75重量%から約42.3重量%が含まれる。

10

#### 【0057】

本明細書に記述される全ての範囲または数値は、「約」という用語が先行して存在してもいなくても、他に指示されない限り、測定の精度および機能的に均等な範囲のばらつきを説明するために、「約」という用語が先行して存在していると見なされる。例えば、コラーゲンは、10重量%でポリマー組成物中に存在していると言うことができるが、測定のばらつきにより、コラーゲンは、10重量%±0.05重量%、0.10重量%、または1.0重量%で文字通り存在していてもよく、そのような重量パーセンテージでは同じように機能するように見える。

20

#### 【0058】

本明細書で使用される「含んでいる (comprising)」、「含む (comprise)」、または「含んだ (comprised)」という用語、およびその変形例は、制約がないことを意味している。「a」および「an」という用語は、1つまたは複数を目指すものとする。

#### 【0059】

本明細書で使用される「患者」または「対象」という用語は、人間を含むがこれに限定されない動物界のメンバーを指す。

ポリマーは、モノマーがポリマーに組み込まれている場合、記述されるモノマーを「含む」または記述されるモノマー「から得られる」。したがって、ポリマーが含んでいる組み込まれたモノマーは、最低限でもある特定の末端基がポリマー主鎖に組み込まれているので、ポリマーに組み込まれる前のモノマーと同じではない。ポリマーは、結合がポリマー中に存在する場合、特定のタイプの結合を含むと言われる。

30

#### 【0060】

本明細書に記述される生分解性ポリマーは、生体浸食性と言われる。「生体浸食性」とは、体液および組織に移植されまた接触して配置された後、典型的にはかつしばしば好ましくは何時間、何日、何週間、または何カ月の期間にわたって体液および／または組織との化学反応を通して部分的にまたは完全に分解することになるポリマーを意味する。そのような化学反応の非限定的な例には、酸／塩基反応、加水分解反応、および酵素切断が含まれる。ある実施形態では、ポリマーは不安定な化学的部分を含有し、その例には、エステル、無水物、ポリ無水物、またはアミドが含まれる。あるいはポリマーは、その場に配置されると化学反応を受け易い構成単位としてペプチドまたは生体高分子を含有していてもよい。例えばポリマーは、ポリマーに酵素不安定性を与えるペプチド配列アラニン-アラニン-リジン含有していてもよい。別の実施形態では、ポリマーは、コラーゲンなど、構成単位として細胞外マトリックスタンパク質を含んでいてもよい。

40

#### 【0061】

1種または複数のポリマーは、典型的には、組織の機械的調整を最適化するためにある期間にわたりその場で分解するよう選択されることになる。その場での分解速度に有用な非限定的な例には、12時間から2週間の間が含まれ、かつそれらの間の増分変量である1、2、3、6、12、24、および／または48時間が含まれる。

50

## 【0062】

本明細書で有用な生分解性ポリマーを、エラストマー性にすることもできる。一般に、置換されまたは修復される軟質組織の場合に類似した性質を有する任意のエラストマーポリマーが、適切である。例えば、ある実施形態では、ラップを作製するのに使用されるポリマーは、非常に膨張性が高い。適切なポリマーの非限定的な例には、100%から1700%、より好ましくは200%から800%の間、さらにより好ましくは325%から600%の間の破断歪みを有するものが含まれる。特に好ましい実施形態では、ポリマーの破断歪みは5%から50%の間、より好ましくは10%から40%の間、さらにより好ましくは20%から30%の間である。さらに、10kPa~30MPa、より好ましくは5~25MPa、さらにより好ましくは8から20MPaの間の引張り強さを有するポリマーを選択することがしばしば有用である。ある実施形態では、初期モジュラスは10kPaから100MPaの間、より好ましくは10から90MPaの間、さらにより好ましくは20から70MPaの間である。

10

## 【0063】

ある実施形態では、本明細書で使用されるポリマーは、患者の体内で分解するときに治療薬も放出する。例えば、ポリマーの個々の構成単位は、分解プロセスを通してその場で放出されるときに構成単位自体が治療上の利益をもたらすように選択されてもよい。特定の好ましい一実施形態では、ポリマー構成単位の1つがプトレッシンであり、これは細胞成長および細胞分化を引き起こす物質として関与してきたものである。

## 【0064】

一実施形態では、繊維は、生分解性ポリ(エステルウレタン)尿素エラストマー(PEUU)を含む。PEUUの例は、ポリカプロラクトンジオール(MW2000)および1,4-ジオイソシアナトブタンと、連鎖延長剤としてのプトレッシンなどのジアミンから作製された、エラストマーポリマーである。適切なPEUUポリマーは、ポリカプロラクトンジオール(MW2000)、1,4-ジオイソシアナトブタン、およびプトレッシンが2:1:1のモル比で組み合わせられる2ステップ重合プロセスにより作製されてもよい。第1の重合ステップでは、1,4-ジオイソシアナトブタンをDMSOに溶かした15重量%溶液を、ジオールをDMSOに溶かした25重量%溶液と共に連続的に攪拌する。第2のステップでは、第1スズオクトエートを添加し、溶解が補助されるようにトリエチルアミンを添加しながら混合物を75℃で3時間反応させる。エラストマーポリマーは、ポリ(エーテルエステルウレタン)尿素エラストマー(PEEUU)であってもよい。例えばPEEUUは、ポリカプロラクトン-b-ポリエチレングリコール-b-ポリカプロラクトントリブロックコポリマーと1,4-ジオイソシアナトブタンおよびプトレッシンとを反応させることによって作製されてもよい。好ましい実施形態では、PEEUUは、1,4-ジオイソシアナトブタン:トリブロックコポリマー:プトレッシンを2:1:1の反応物化学量論量で使用する2ステップ反応によって、得られる。第1の重合ステップでは、1,4-ジオイソシアナトブタンをDMSOに溶かした15重量%溶液を、トリブロックコポリマージオールをDMSOに溶かした25重量%溶液と共に連続的に攪拌する。第2のステップでは、第1スズオクトエートを添加し、混合物を75℃で3時間反応させる。次いで反応混合物を室温まで冷却し、18時間継続させる。次いでPEEUUポリマー溶液を蒸留水で沈殿させ、湿潤ポリマーをイソプロパノール中に3日間浸漬することにより未反応のモノマーを除去し、真空乾燥する。

20

30

40

## 【0065】

その他の実施形態では、少なくとも1種の治療薬が生体浸食性繊維に添加される。有用な治療薬には、患者に治療上の利益をもたらすと考えられる、生体浸食性繊維にコーティングすることができ、取着させることができ、吸収させることができ、吸着させることができ、埋め込むことができ、またはその他の方法で関連付けることができる任意の物質が含まれる。治療薬は、ポリマーが処理されている間にこのポリマーとブレンドしてもよい。例えば治療薬は、溶媒(例えば、DMSO)に溶解してもよく、処理中にポリマーブレンドに添加してもよい。別の実施形態では、治療薬は担体ポリマー(例えば、限定するも

50

のではないがポリエチレングリコールヒドロゲルまたはポリ乳酸-グリコール酸微粒子)と混合され、これが引き続きエラストマーポリマーを用いて処理される。治療薬と担体ポリマーまたはエラストマーポリマーそのものとをブレンドすることによって、治療薬の放出速度をポリマー分解速度により制御することができる。一実施形態において、活性剤または細胞を含む生体浸食性ヒドロゲルは、管状組織の表面に付着された後に生体浸食性繊維に付着させる。

#### 【0066】

本明細書で使用される「生分解性」、「生体再吸収性」、および「生体浸食性」は、同義に使用される。また、記述語「管状」は、一定の直径および円形断面を有する幾何学的に完全なチューブを特に指すものではない。この記述語は、非円形の様々な断面を有する組織も含有し、可変直径を有することができ、したがって、管腔を取り囲んで隣接する壁（すなわち、中空である）と、液体、固体、または気体が1つの開口からその他の開口に移動することができる管腔内への2つの開口とを有する任意の形状を有することができる。本明細書に示されるように、特定の非限定的な、しかし例示的な管状組織の例には、動脈、尿道、腸、食道、尿管、気管、気管支、および卵管組織が含まれる。

#### 【0067】

さらに、生体浸食性繊維に組み込んでもよいその他の活性剤には、抗炎症性物質、例えば、限定するものではないがNSAID（非ステロイド系抗炎症薬）、例えばサリチル酸、インドメタシン、ナトリウムインドメタシン三水和物、サリチルアミド、ナプロキセン、コルヒチン、フェノプロフェン、スリダク、ジフルニサル、ジクロフェナク、インドプロフェンナトリウムサリチルアミド、抗炎症性サイトカイン、および抗炎症性タンパク質またはステロイド系抗炎症薬など；抗生剤；抗凝固薬、例えばヘパリン、ペバク、エノキサプリン、アスピリン、ヒルジン、プラビキス、ビバリルジン、プラスグレル、イドラパリヌクス、ワーファリン、クマジン、クロピドグレル、PPACK（D-フェニルアラニル-L-プロリル-L-アルギニルクロロメチルケトン）、およびGGACK（L-グルタミル-L-グリシル-L-アルギニルクロロメチルケトン）、組織プラスミノゲン活性化因子、ウロキナーゼ、およびストレプトキナーゼなど；成長因子などが含まれるが、これらに限定するものではない。その他の活性剤には：（1）免疫抑制剤；グルココルチコイド、例えばヒドロコルチゾン、ベタメチゾン、デキサメタゾン、フルメタゾン、イソフルプレドン、メチルプレドニゾロン、プレドニゾン、プレドニゾロン、およびトリアムシノロンアセトニドなど；（2）抗血管新生薬、例えば、フルオロウラシル、パクリタキセル、ドキソルビシン、シスプラチン、メトトレキセート、シクロホスファミド、エトポシド、ペガブタニブ、ルセンチス、トリプトファン-L-tyrosine、レタアン、CA4P、AdPEDF、VFGF-TRAP-EYE、AG-103958、アバスチン、JSM6427、TG100801、ATG3、OT-551、エンドスタチン、サリドマイド、ベカシズマブ、ネオバスタットなど；（3）抗増殖薬、例えば、シロリムス、パクリタキセル、ペリリルアルコール、ファルネシルトランスフェラーゼ阻害剤、FPTII、L744、抗増殖因子、Van-10/4、ドキソルビシン、5-FU、ダウノマイシン、マイトマイシン、デキサメタゾン、アザチオプリン、クロラムブシル、シクロホスファミド、メトトレキセート、モフェチル、血管作動性小腸ポリペプチド、およびPACAPなど；（4）抗体；インムノフィリンに作用する薬剤、例えば、シクロスポリン、ゾタロリムス、エベロリムス、タクロリムス、およびシロリムス（ラパマイシン）、インターフェロン、TNF結合タンパク質など；（5）タキサン、例えば、パクリタキセルおよびドセタキセルなど；スタチン、例えばアトルバスタチン、ロバスタチン、シムバスタチン、プラバスタチン、フルバスタチン、およびロスバスタチンなど；（6）酸化窒素供与体または前駆体、例えば、限定するものではないがAngeli塩、L-アルギニン、遊離塩基、ジエチルアミンNONOエート、ジエチルアミンNONOエート/AM、Glyco-SNAP-1、Glyco-SNAP-2、(±)-S-ニトロソーN-アセチルペニシラミン、S-ニトロソグルタチオン、NOC-5、NOC-7、NOC-9、NOC-12、NOC-18、NOR-1、NOR-3、SIN-1、塩酸塩、

10

20

30

40

50

ナトリウムニトロプルシド、二水和物、スペルミンNONOエート、ストレプトゾトシンなど；および（７）抗生剤、例えば、限定するものではないが：アシクロビル、アフロキサシン、アンピシリン、アンホテリシンB、アトバクオン、アジスロマイシン、シプロフロキサシン、クラリスロマイシン、クリンダマイシン、クロファジミン、ダブソン、ジクラザリル、ドキシサイクリン、エリスロマイシン、エタムブトール、フルコナゾール、フルオロキノロン、フォスカルネット、ガンシクロビル、ゲンタマイシン、イアトロコナゾール、イソニアジド、ケトコナゾール、レボフロキサシン、リンコマイシン、ミコナゾール、ネオマイシン、ノルフロキサシン、オフロキサシン、パロモマイシン、ペニシリン、ペンタミジン、ポリミキシンB、ピラジナミド、ピリメタミン、リファブチン、リファムピン、スパルフロキサシン、ストレプトマイシン、スルファジアジン、テトラサイクリン、トブラマイシン、トリフルオロウリジン、トリメトプリムスルフェート、Zn-ピリチオン、および塩化物や臭化物、ヨウ化物、および過ヨウ素酸塩などの銀塩などが含まれるが、これらに限定するものではない。

10

#### 【0068】

細胞は、様々な方法を使用して、拘束性の生体浸食性マトリックスに微細統合されていてもよい。例えば、マトリックスは、問題となっている細胞に適した成長培地に浸漬され、次いで細胞に直接曝してもよい。細胞を、マトリックスの表面上および隙間に増殖させる。次いでマトリックスを成長培地から除去し、必要に応じて洗浄し、移植する。しかしエレクトロスピンニングされた不織布はしばしば、比較的小さい孔径を有するので（例えば、塩浸出または熱により誘導された相分離などのその他の方法によって製作された不織布の孔径に比べて）、足場の表面での細胞の培養は、通常、エラストマー性の足場の表面付近でのみ細胞の微細統合が望まれる場合に使用される。

20

#### 【0069】

別の実施形態では、問題となっている細胞を適切な溶液（例えば、成長培地または緩衝液）に溶解し、次いで拘束性の生体浸食性マトリックスに、このマトリックスをエレクトロスピンニングにより形成しながら噴霧する。この方法は、高度に細胞化された組織設計製作構造が望まれる場合に、特に適している。一実施形態では、圧力噴霧（すなわち、加圧下でノズルから細胞を噴霧する）を使用して、細胞に堆積させる。別の場合では、エレクトロスピンニング中に、不織メッシュに細胞をエレクトロスプレーする。本明細書に記述されるように、エレクトロスプレーでは、適切な粘度および濃度を有する細胞含有溶液を、細胞を含有する溶液の小さな荷電液滴のスプレーを生成するのに十分な電界に曝す。一実験では（図示せず）、細胞生存度を、異なる条件下でスプレーされた平滑筋細胞（SMC）に関して試験した。これらの異なる条件には、スプレー単独、 $-15\text{ kV}$ で帯電した標的へのスプレー、 $-15\text{ kV}$ で帯電した標的へのスプレーと共にPEUUエレクトロスピンニング、 $-15\text{ kV}$ で帯電した標的への $10\text{ kV}$ でのエレクトロスプレー、および $-15\text{ kV}$ で帯電した標的への $10\text{ kV}$ でのエレクトロスプレーと共にPEUUエレクトロスピンニングが含まれる。SMC生存度の著しい低下は、ノズルを通した細胞スプレーから生じた。理論に如何ようにも拘束するものではないが、溶媒を処理するために細胞への曝露と組み合わせた加圧スプレーの物理的な力は、生存度がスプレー単独の場合に失われかつエレクトロスピンニングされたPEUU（e-PEUU）の製作中のスプレーによる場合にはなおさら失われることから、この結果をもたらしたと考えられる。細胞エアロゾルスプレーにより低下した生存度は、他者により報告されており、ノズル直径、スプレー圧、および溶液粘度に大きく依存することが見出された（Veazey W. S.、Anusavice K. J.、Moore K.、「Mammalian cell delivery via aerosol deposition」、J. Biomed. Mater. Res. 2005（72B）334～8）。したがって細胞は、ゼラチンが補われた培地からもスプレーされて、粘度を増大させかつ細胞を機械的および化学的応力から保護するのを助けた。生存度は回復し、それでもPEUUマトリックスの機械的一体性は、繊維網状構造内のゲル化によって崩壊した。

30

40

#### 【0070】

50

加圧スプレーとは対照的に、エレクトロスプレーされた細胞は、細胞の生存度または増殖に著しい影響を及ぼさなかった。これは、細胞が高電圧電界への曝露を生き抜くことができるという他者による報告に矛盾していない（例えば、Nedovic V. A.、Obradovic B.、Poncellet D.、Goosen M. F. A.、Leskosek-Cukalovic O.、Bugarski B.、「Cell immobilization by electrostatic droplet generation」、Landbauforsch Volk 2002、(241) 11~17; Temple M. D.、Bashari E.、Lu J.、Zong W. X.、Thompson C. B.、Pinto N. J.、Monohar S. K.、King R. C. Y.、MacDiamid A. G.、「Electrostatic transportation of living cells through air」、Abstracts of Papers、223 ACS National Meeting、Orlando、FL、Apr. 7~11、2002参照）。PEUUエレクトロスピニングの存在下であってもSMC生存度は低下せず、これはおそらく、正に帯電したエレクトロスピニングおよびエレクトロスプレーの流れが互いに反発し、堆積前に溶媒に細胞が曝されるのを回避したからである。また、23 cmという比較的大きなエレクトロスピニング距離により、PEUU繊維は、堆積されるときまで溶媒を含んでいないようであった。ゼラチンが補われた培地からのエレクトロスプレーは、ゼラチンを含まない培地からのエレクトロスプレーに比べ、より多くの数の生存可能な細胞をもたらした。しかし、ゼラチンの使用により、構造の機械的性質が低下する。したがって、多くの場合、培地のみからのエレクトロスプレーが、好ましい細胞組込み法と考えられる。

#### 【0071】

生体浸食性マトリックスの表面または内部に組み込まれてもよい細胞には、幹細胞、前駆（前駆体）細胞、平滑筋細胞、骨格筋芽細胞、心筋細胞、内皮細胞、内皮前駆細胞、骨髓由来の間葉細胞、および遺伝子組換え細胞が含まれる。ある実施形態では、遺伝子組換え細胞は、成長因子などの治療物質を発現することが可能である。適切な成長因子の例には、組換え技法を使用して任意選択で得ることができる血管新生または神経栄養因子が含まれる。成長因子の非限定的な例には、塩基性線維芽細胞成長因子（bFGF）、酸性線維芽細胞成長因子（aFGF）、血管内皮成長因子（VEGF）、肝細胞成長因子（HGF）、インスリン様成長因子（IGF）、トランスフォーミング成長因子- $\beta$ プレイオトロフィンタンパク質、ミッドカインタンパク質が含まれる。好ましい一実施形態では、成長因子がIGF-1である。

#### 【0072】

##### 実施例

自家伏在静脈は、冠動脈（毎年500,000）および抹消動脈（毎年80,000）の両方のバイパス処置で、依然として選択されるグラフトである。AVGの失敗は、依然として主要な課題であり、失敗したグラフトを有する患者は死亡することになりまたは再手術を必要とすることになる。IHは、全てのAVGの失敗の20%から40%を占める。IHは、AVGが、動脈循環の過酷な新しい生体力学環境と動脈系に関連した高レベルのCWS（自然の静脈条件に比べて140倍の増加）とに突然曝されることによって誘発され则认为られる。本明細書の作業仮説は、AVGを動脈レベルのCWSにさらに次第に曝すことによって、IHの応答を低減させまたはなくすることができるというものである。すなわち、AVGに、その新しい環境のストレスに適応しリモデリングされる豊富な機会が与えられる場合、細胞損傷を低減させることができ、したがってIHの開始メカニズムを制限することができる。明らかに、IHプロセスの初期事象を防止する信頼性ある手段を開発することは、動脈バイパス処置の臨床成果の改善に著しく寄与すると考えられる。したがって、この研究の長期目標は、その場でAVGを安全にかつ機能的に「動脈化」するために、外膜周囲に配置された生分解性ポリマーラップの形をした新しい機械的調整パラダイムを開発することである。ポリマーラップは、所望の時間をかけて分解するにつ

れ、ポリマーラップによって提供された機械的支持が低減されるように、かつ静脈がその場で高レベルのCWSに徐々に曝されるように、調整される。

【0073】

本明細書に概略的に示される分子シグナルのいくつかと、それらをこの研究のエンドポイントとして選択するための根拠を、表1にまとめる。

【0074】

【表1-1】

表 1

この研究で選択されたエンドポイントの概要および根拠。

10

| この研究で<br>提案された<br>エンドポイント | IHにおける役割         | 文献により裏付けられた根拠                                                                                     |
|---------------------------|------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------|
| ゴルジ複合体                    | 表現型修飾<br>タンパク質合成 | 合成対収縮SMCにおける高い量 <sup>a</sup>                                                                      |
| PCNA                      | 増殖               | 突然曝されたAVGにおける<br>多量の細胞増殖 <sup>b</sup>                                                             |
| TUNEL                     | アポトーシス           | 突然曝されたAVGにおける<br>変化したアポトーシス <sup>c</sup>                                                          |
| コンプライアンス                  | 臨床性能             | AVG開存度の重要な予測子 <sup>d</sup><br>コンプライアンスは、突然曝された<br>動脈化AVGにおいて低下し、それによ<br>ってコンプライアンスのミスマッチが<br>増大する |
| 剛性                        | 臨床性能             | 剛性は、突然曝された動脈化AVGに<br>おいて低下し、低い臨床性能に関与<br>する可能性がある <sup>f</sup>                                    |

20

30

【0075】

## 【表 1 - 2】

<sup>a</sup>Moriszki N<sup>5</sup>、Cell cycle-dependent inhibition of DNA synthesis by prostaglandin in 12 in cultured rabbit aortic smooth muscle cells. Atherosclerosis. 1988;71(2~3):165~71; Campbell G R<sup>5</sup>、Arterial smooth muscle. A multifunctional mesenchymal cell. Arch Pathol Lab Med. 1988;112(10):977~86; および Nagai R<sup>5</sup>、Identification of two types of smooth muscle myosin heavy chain isoforms by cDNA cloning and immunoblot analysis. The Journal of Biological Chemistry. 1989;264(17):9347~7。

<sup>b</sup>Nishibe T<sup>5</sup>、Induction of angiotensin converting enzyme in neointima after intravascular stent placement. Int Angiol. 2002;21(3):250~5, および Zuckerbraun B<sup>5</sup>、Over expression of mutated ikappaalpha inhibits vascular smooth muscle cell proliferation and intimal hyperplasia formation. J Vasc Surg. 2003;38(4):812~9。

<sup>c</sup>Wang G J<sup>5</sup>、Regulation of vein graft hyperplasia by survivin, an inhibitor of apoptosis protein. Arterioscler Thromb Vasc Biol. 2005;25(10):2081~7, および Wang A Y<sup>5</sup>、Expression of apoptosis-related proteins and structural features of cell death in explanted aortocoronary saphenous vein bypass grafts. Cardiovasc Surg. 2001;9(4):319~28。

<sup>d</sup>Davies A H<sup>5</sup>、Prevention of malalignment during non-reversed femorodistal bypass. Ann R Coll Surg Engl. 1992;74(6):434~5。

<sup>e</sup>Jacot J G<sup>5</sup>、Early adaptation of human lower extremity vein grafts: Wall stiffness changes accompany geometric remodeling. J Vasc Surg. 2004;39(3):547~55。

<sup>f</sup>Tai N R<sup>5</sup>、Compliance properties of conduits used in vascular reconstruction. Br J Surg. 2000;87(11):1516~24, および Jacot J G、Vasc Surg. 2004;39(3):547~55。

## 【実施例 1】

## 【0076】

## PEUU構造の製作

シリンジポンプにより、11.4cm(4.5")の直径のアルミニウムマンドレル上に垂直に吊り下げた13cmのステンレス鋼毛管中に、ヘキサフルオロイソプロパノール(HFIP)に溶かした5重量%PEUU溶液を1.0mL/時で供給した。PEUUを+12kVで帯電させ、アルミニウム標的は、高電圧発生器(Gamma High Voltage Research)を使用して-7kVで帯電させた。並べたPEUU繊維は、0.0から13.8n/秒に及ぶ速度で回転している標的に、エレクトロスピンングにより形成した。足場を室温で一晩乾燥させ、次いで真空中に、30℃で48時間置いた。各サンプルの一部を、繊維の配向がX線ビームに平行になるように標準X線回折ホルダに載置して、分析に供した。サンプルを、銅の放射を使用してPANalytical X'Pert Pro回折計に流した。PEUUの数平均および重量平均分子量は、それぞれ228,700および87,600であり、その結果、多分散性指数は2.61になった。DSCは、ガラス遷移温度が-54.6℃であり、PEUU軟質セグメントの溶融温度が41.0℃であることを実証した。

## 【0077】

血管組織設計製作のためのエレクトロスピンングされた管状構造

この実施例は、実質的なエラストマー性の機械的支持を提供することも可能な、高度に細胞化された血管構造を生成する1つの方法について記述する。この方法は微細統合手法を含み、サブミクロンのエラストマー繊維のメッシュ構造が、細胞配置プロセスを用いてまたは用いることなく血管壁へと構築される。細胞充実度は、*in vitro*培養法または*in vivo*を通して発生させることができる。これらの方法は、本明細書に記載されるように、管状組織のコーティングに適用可能である。

#### 【0078】

この実施例は、本明細書で記載される管状組織をコーティングするのに使用してもよい、小さな直径のエレクトロスピンニングされたポリウレタン導管を、管腔の表面に播く方法を提供する。エレクトロスピンニング技術は、組織の開発をより良好に促進させるため、足場の製作中に細胞を組み込むのに使用される。

10

#### 【0079】

ポリ(エステルウレタン)尿素を、プトレッシン連鎖延長剤を用いてポリ( $\epsilon$ -カプロラクトン)ジオールおよび1,4-ジイソシアナトブタンから合成した。PEUUを、ヘキサフルオロイソプロパノール中に6重量%溶解し、エレクトロスピンニングした。エレクトロスピンニング条件は、溶液体積流量1.0 mL/時、ノズルと標的との間の距離13.5 cm、ノズルに対する電圧+12 kV、および標的に対する電圧-3 kVを含んでいた。移植用の小さな直径のチューブを製作するのに使用された標的は、250 rpmで回転する直径1.3 mmのType 316ステンレス鋼マンドレルであった。

#### 【0080】

マンドレルを、その軸に沿って、約8 cm/秒の速度で線形ステージ上で8 cm並進移動させて、より均一な導管の厚さをもたらした。サンプルを15分間エレクトロスピンニングして、壁の厚さが150から200  $\mu$ m程度の多孔質管状構造を生成した。内皮化の研究のため、代わりの4.7 mmのステンレスマンドレルを、同じプロセス条件で利用した。

20

#### 【0081】

HFIP中6重量%のPEUUを、負に帯電した回転マンドレル上に250 rpmでエレクトロスピンニングすることにより、管状構造を生成した。エレクトロスピンニングされたチューブは、内径1.3 mm、長さは最長8 cm、および壁の厚さは150~200  $\mu$ mであった。繊維サイズは、およそ1000  $\mu$ mの範囲内であった。さらに、これらの構成は接合可能であり、かつそれらの管腔を維持した。

30

#### 【0082】

製作後、鋼製マンドレルからさらに容易に除去するために、マンドレルを70%エタノールに浸漬した。次いで、導管を脱イオン水中で多数回濯ぎ、拭き取って乾燥させ、次いで室温で24から48時間真空乾燥した。次いで導管を、その全体の構造について解剖顕微鏡を用いて、またはその繊維形態について走査型電子顕微鏡を用いて検査した。途切れない繊維断面を見るために、サンプルを液体N<sub>2</sub>中に1分間浸漬し、次いで破碎し、その後SEM用にスパッタコーティングした。

#### 【0083】

PEUU導管(4.7 mm)を、注文設計された回転式真空播種デバイス内に配置し、 $20 \times 10^6$ 個の筋肉由来幹細胞(MDSC)を播種した。より具体的には、エレクトロスピンニングされた導管を金属スタブ上に配置し、軽い真空を導管の外部に適用した。次いで継代培養したMDSCを、導管の管腔を通して灌流し、真空によってチューブの繊維性管腔側壁内に強制的に押し遣った。構造を、ペトリ皿で24時間、静置条件下で培養した。静置培養の24時間後、細胞は生存可能であり、管腔に接着しており、単層を形成した。

40

#### 【0084】

多孔質で内径1.3 mmの管状の、エレクトロスピンニングされた足場を、ラットの腹部大動脈に間置グラフトとして移植した。構造は接合可能であり、*in vivo*でその管腔を容易に保持した。重さ250~300 gのメスのルイスラットを、1%イソフルラン

50

および 2.5 mg / 100 g のケタミンを用いて麻酔した。腹部中央切開を行い、後腹膜腔を露出させた。腎臓レベルよりも下の下行大動脈を切開し、近位側および遠位側の切断部分を鉗子で留めて、1 cm の隙間を作製した。次いでエレクトロスピングされた導管を、10.0 プロレン縫合糸を使用して切縁間に移植した。200 単位 / kg で、鉗子で留める前に、静脈内ヘパリンを投与した。腹壁を、2.0 バイクリル縫合糸で2層に閉じた。ラットは、四肢を機能させながら、手術から回復することができた。ラットを2週間で犠牲にし、サンプル外植片を、室温で、10%の中性緩衝ホルマリンに固定した。移植後2週間で、グラフトは開存したままでありかつ機能的であった。次いでサンプルをパラフィン中に包埋し、切断し、その後、ヘマトキシリンおよびエオシンまたはMassonのトリクロームで染色した。ヘマトキシリンおよびエオシン染色は、外植グラフトの周りに外部カプセルが形成されたことを実証した。Massonのトリクローム染色は、カプセルが、新しく発生した毛細血管の存在と共に整列したコラーゲンからなるものであることを示した。成長中の細胞および組織を、コラーゲンの発生の存在により構造全体にわたって観察した。細胞は、構造管腔の周りの位置で単層を形成したことも実証した。

10

#### 【0085】

先の実施例が *in vivo* 手法を提供したのに対し、生分解性および細胞適合性のエラストマー性ポリ（エステルウレタン）尿素は、ラットモデルでの移植に適した小さな直径のチューブにエレクトロスピングされた。

#### 【0086】

先の実施例と同様に、この実施例は、実質的なエラストマー性の機械的支持も提供する高度に細胞化した血管構造を製作するための方法を提供する。しかし、先のモデルは、生分解性および細胞適合性エラストマー性ポリ（エステルウレタン）尿素が、ラットモデルでの移植に適した小さな直径のチューブにエレクトロスピングされる *in vivo* 手法であった。この実施例は、微細統合技法を使用した足場製作と同時に、エレクトロスピングされたナノ繊維中にSMCを播種した、*in vivo* 手法を提供する。

20

#### 【0087】

ラット大動脈から単離した血管平滑筋細胞（SMC）を、10%ウシ胎児血清および1%ペニシリンーストレプトマイシンが補われたDulbecco修飾イーグル培地（DMEM）の下で組織培養ポリスチレン（TCPS）培養プレート上に拡げた。微細統合を、前述と同様に、かつより小さな直径のエレクトロスプレー／エレクトロスピングマンドレルを可能にするようないくつかの修正を行って実施した。

30

#### 【0088】

$7.5 \times 10^6$  SMC / mL を、培地中で継代培養し、8.5 kV で帯電させかつ標的から 4.5 cm 離して位置付けられた滅菌 Type 316 ステンレス鋼毛管中に、0.11 mL / 分で供給した。HFIP に溶かした 6 重量 % の PEUU または 6 重量 % の PEUU / コラーゲン（75 / 25）を、12 kV で帯電させかつ標的から 23 cm 離して位置付けられた毛管中に、1.5 mL / 分で供給した。標的は、-3 kV で帯電しかつその軸に沿って 1.6 mm / 秒で 8 cm 並進移動しながら 250 rpm で回転している、滅菌ステンレス鋼マンドレル（直径 4.7 mm）から構成された。30 分という製作時間を使用して、それぞれ微細統合された導管を生成した。製作後、導管およびマンドレルをローボトル中に無菌法により静かに配置し、16 時間静的に培養した。16 時間後、サンプルをマンドレルから静かに取り出して、培養に供した。次いでサンプルを 15 mm の長さに切断し、金属スタブに接合し、図 3 に実質的に示される通り、デバイス内で 3 日間、拍動性の流れにより培地を灌流した。

40

#### 【0089】

製作後 1 日および 4 日の時点で、サンプルを特徴付けた。MTT ミトコンドリアアッセイを、細胞生存度を測定するのに使用した。組織学的調査のため、サンプルを、室温の 10% 中性緩衝ホルマリン中に固定した。次いでサンプルをパラフィン中に包埋し、切断し、ヘマトキシリンおよびエオシンにより染色した。サンプルを、製作直後にそれらの生体力学的性質に関して分析した。測定された性質には、環の強度、動的コンプライアンス、

50

および破裂圧力が含まれた。環の強度を測定するために、ステンレス鋼製ステープルを 5 mm 長の管状切片中に挿入し、次いで一軸引張試験機 (A T S) のグリップ内に挿入した。4. 5 k g ( 1 0 l b ) 負荷細胞および 1 0 . 0 5 mm / 分の変位速度を使用して、サンプルが破断するまで引っ張った。

#### 【 0 0 9 0 】

動的コンプライアンスおよび破裂強度に関しては、1 5 mm 長の管状サンプルを、遠心ポンプ ( B i o m e d i c u s ) により駆動されるフローループ内に載置し、3 7 ° C の P B S 中に浸漬した。標準的なインライン歪みゲージ圧力変換器および P C 収集ボードを使用して、圧力を監視かつ 3 0 H z で記録した。血管構造を、拍動性の流れ ( 1 1 0 / 7 0 mm H g 、 1 . 2 H z ) で灌流し、動的コンプライアンス C を、H e - N e レーザーマイクロメータ ( B e t a L a s e r m i k e ) によってサンプルの外径を記録することにより測定した。コンプライアンスは、各パルスごとに下記の通り計算された：

10

#### 【 0 0 9 1 】

##### 【数 1】

$$C = \frac{(OD_s - OD_d / OD_d)}{P_s - P_d}$$

#### 【 0 0 9 2 】

( D = 最大または最小直径、 P = 最大圧力または最小圧力 ) 。ブタ乳腺動脈を、コンプライアンス研究における微細統合された P E U U との比較のための、対照として使用した。破裂圧力を測定するため、サンプル出口を密封し、チューブが破裂するまで流れを増加させた。破裂前の最大圧力を、破裂圧力と見なした。

20

#### 【 0 0 9 3 】

細胞微細統合の技術を小さな直径のチューブにまで拡張するために、直径 4 . 7 mm のステンレス鋼マンドレルを、シート微細統合用に以前用いられた直径 1 9 mm のマンドレルの代わりに使用した。高度に細胞性でありかつ欠陥のない管状構造を微細統合するには、先の方法に比べてエレクトロスプレー距離を 0 . 5 c m わずかに短縮し、かつマンドレルの負の電荷 - 1 0 k V から - 3 k V 低下させることが有用であった。製作中、P E U U はピンク色に見え、均一な細胞エレクトロスプレーであることを示すマンドレル上のキラキラした輝きを示した。マンドレルから取り外した後、P E U U または P E U U / コラーゲン ( 7 5 / 2 5 ) のいずれかのサンプルは、接合可能でありかつ圧縮後もその管腔を維持できるので、機械的に堅牢であることがわかった。

30

#### 【 0 0 9 4 】

S M C 微細統合構造における細胞の配置および生存度を最初に調べ、静置または灌流培養の 4 日後に再び調べた。灌流後、サンプルをスタブから静かに取り出し、次いで M T T および組織学用に代表的な切片を切り取った。M T T の結果は、製作の 1 日後の生存可能な細胞を示した。さらに、細胞は、静置または灌流培養のいずれかから 4 日目でも生存可能なままであり、その細胞数の値は、灌流培養の場合のほうがわずかに多いことが報告された。サンプルを固定し、ヘマトキシリンおよびエオシン染色で染色した。H & E 染色は、管状構造内における均一な初期細胞統合を示した。

40

#### 【 0 0 9 5 】

環の強度、破裂圧力、および接合維持強度を、製作後の微細統合された構造において評価した。小さなチューブ切片 ( 環 ) は、機械的に堅牢でありかつ柔軟性があり、その最大応力および歪みの値はそれぞれ 6 . 3 M P a および 1 7 0 % であった。環のサンプルは、それぞれの場合にきれいに破断せず、極限応力値を過ぎてから引き裂かれまた層剥離するようであった。微細統合された構造の動的コンプライアンスを算出するために、サンプルを拍動性の流れに曝し、圧力 / 直径の関係を評価した。この関係を、同じ拍動性の流れに曝されたブタ乳腺動脈 ( p M A ) と比較した。p M A および微細統合された P E U U の両方に関する機械的応答は、非常に類似しており、両サンプルに関する値は互いの値の範囲

50

内に包含されていた。コンプライアンス値は、pMAに関して $1.02 \pm 0.33 \times 10^{-3} \text{ mmHg}^{-1}$ であり、SMC微細統合PEUUに関して $0.71 \pm 0.13 \times 10^{-3} \text{ mmHg}^{-1}$ であった。全てのサンプルに関する破裂圧力の値は、 $1500 \text{ mmHg}$ よりも大きかった。破裂圧力の値は、微細統合チューブの多孔質の性質により、近似値であった。

#### 【0096】

この方法は、高度に細胞化したエラストマー性の足場を生成した。細胞は、製作後に生存可能であり、灌流培養下で増殖した。この技術を拡張して、血管の原型としての小さな直径の管状構造内に細胞を微細統合するには、変えることのできるいくつかのプロセスを修正することが有利であった。例えば、より小さな直径のマンドレルを標的としかつこのマンドレル上に細胞をエレクトロスプレーするために、エレクトロスプレーノズルとマンドレルとの間の距離を短縮することが有用であった。また、マンドレル上の大きな負のバイアスを回避することが有用であった。回転するマンドレルに対して高い負の電荷を使用することにより、標的はポリマー突出欠陥をもたらし、または導管の完全性および細胞生存度を破壊する可能性のあるチューブ内の「スパイク」をもたらした。したがって、マンドレルの電荷を低下させて、均質な細胞性および繊維性の管状導管をもたらすことが有用であった。次いでこれらの構造を灌流バイオリアクタ内で培養して、チューブ内の細胞に対して栄養、廃棄物、および酸素のより良好な交換を促した。H&EおよびMTTの結果は、製作および灌流培養後に、構造内は生存可能な細胞が存在することを示した。

#### 【実施例2】

#### 【0097】

静脈グラフトの動脈化による機械的性質の変化

動脈圧の範囲において、AVGは、その過剰な膨張の程度により本質的に剛性のチューブである (Stooker W、Gok M、Sipkema P、Niessen H W、Baidoshvili A、Westerhof N、Jansen E K、Wildevuur C R、およびEijisman L. Pressure-diameter relationship in the human greater saphenous vein. *Ann Thorac Surg.* 2003; 76 (5) : 1533~8)。これを確認するため、本発明者らは、圧力上昇実験を行った。この実験の結果を図4に示す。静脈は、約 $30 \text{ mmHg}$ で最大膨張に到達することがわかる。その結果、動脈レベルの圧力では静脈が非常に強く、本発明者らは、一時的な外部構造支持に生分解性外膜ラップを設けることにより、この現象を打ち消すことを望む。

#### 【0098】

AVG膨張の程度は、コンプライアンスなどの静脈特性に直接関係し、すなわち、Daviesらによる開存率に関連している (Davies A H、Magee T R、Baird R N、およびHorrocks M. Prevention of malalignment during non-reversed femorodistal bypass. *Ann R Coll Surg Engl.* 1992; 74 (6) : 434~5、およびDavies A H、Magee T R、Baird R N、Sheffield E、およびHorrocks M. Pre-bypass morphological changes in vein grafts. *Eur J Vasc Surg.* 1993; 7 (6) : 642~7)、末梢バイパス手術における低コンプライアンスAVGのより低い開存率を報告した。この低下した開存度は、AVGと移植される自然の動脈との間のコンプライアンスのミスマッチに大きく関与していた (Bandyk D FおよびMills J L. The failing graft: An evolving concept. *Semin Vasc Surg.* 1993; 6 (2) : 75~7; Bassiouny H S、White S、Glagov S、Choi E、Giddens D P、およびZarins C K. Anastomatic intimal hyperplasia: Mechanical injury or flow induced. *J Vasc Surg.* 1992

; 15 (4) : 708 ~ 16 ; discussion 716 ~ 7 ; および Berkowitz H D、Fox A D、および Deaton D H. Reversed vein graft stenosis : Early diagnosis and management. J Vasc Surg. 1992 ; 15 (1) : 130 ~ 41 ; discussion 141 ~ 2 ) 。 静脈は、動脈よりもともとコンプライアンスが低く (Tai N R、Salacinski H J、Edwards A、Hamilton G、および Seifalian A M. Compliance properties of conduits used in vascular reconstruction. Br J. Surg. 2000 ; 87 (11) : 1516 ~ 24 ) 、突然曝された動脈化の後にはさらに低いコンプライアンスになる (Jacot J G、Abdullah I、Belkin M、Gerhard-Herman M、Gaccione P、Polak J F、Donaldson M C、Whittemore A D、および Conte M S. Early adaptation of human lower extremity vein grafts : Wall stiffness changes accompany geometric remodeling. J Vasc Surg. 2004 ; 39 (3) : 547 ~ 55 ) 。 AVGコンプライアンスの変化はAVGの失敗の重要な予測判断材料であるかのように見える。

### 【実施例 3】

#### 【0099】

拘束性ポリマーマトリクスでコーティングされたAVG

本明細書に提供されたデータは、進行中の研究の2つの異なる領域、すなわち：i) 動脈血行動態に対する無傷の静脈セグメントの機械的病理生物学的応答の調査、およびii) 外膜ラップとして使用される生分解性のエレクトロスピンニングされたポリマーの開発を包含する。

#### 【0100】

ex vivo 血管灌流装置を開発して、現実的な、十分制御された生体力学および代謝的条件に対する、無傷の血管セグメントおよびグラフトの応答について研究した。図3は、そのようなデバイスを示す。このデバイスは、精密に制御された血行動態および溶解ガス (pH、 $pO_2$ 、 $pCO_2$ ) に対するブタ内頸静脈セグメントのex vivo曝露を可能にして、静脈および現実的なAVG環境を含む様々な状態をシミュレートすることができる。これらの制御された状態の実現は、2つの独立した灌流／器官培養システム (図3に概略的に示す) を使用することにより達成される。閉鎖ループ灌流デザインは、滅菌灌流液 (1%ウシ胎児血清、0.5 g / リットルのセフォキシチンが補われた組織培地199) の循環を可能にする。第2のローラーポンプは、密封されたチャンバ内に載置された試料の周りで外膜浴 (1%ウシ胎児血清および0.5 g / リットルのセフォキシチンを有するDMEM) を循環させる。

#### 【0101】

自然の静脈の血行動態および生体力学をシミュレートするため、ローラーポンプおよび灌流ループの流れ抵抗器を、20 ml / 分の非拍動性の流れおよび20 mmHgの圧力が提供されるように設定する。AVG血行動態をシミュレートするには、ポンプおよび流れ抵抗器を、120 / 80 mmHgの拍動性圧力波形および100 ml / 分の平均灌流液流量が得られるように設定する。「AVG調整」レジメンは、まず、上述の動脈条件が提供されるように灌流システムを設定することによって開始される。灌流静脈セグメントにおける円周方向の壁応力は、調整された生分解性の血管周囲にエレクトロスピンニングされたポリマーラップの付着を介して制御されることになる。すなわち、中静脈壁円周方向壁応力対時間プロファイルでは、静脈 (約25 KPa) レベルから動脈 (約140 KPaのピーク) レベルまで、徐々に負荷が加えられて、24または192時間にわたり線形に増加することになる。この所望の分解速度を実現することによって、AVGのin vivoでの機械的調整は、おそらくは全てのAVGの開存率を改善する、可能性のある治療の代

替例になると考えられる。

#### 【0102】

ex vivo 灌流能力をさらに有効にするため、静脈対動脈条件下で灌流した静脈セグメントの組織生存度分析を行い、その結果を、組織生存度の基準レベルに対して比較した。ex vivo 灌流の48時間後に、走査型電子顕微鏡法、H&E染色、Live/Dead（商標）染色、およびTUNEL分析を行った（図5参照）。走査型電子顕微鏡法およびH&E染色は、組織の形態学的完全性が、収集後および灌流の48時間後に無傷であることを示した。Live/dead分析およびTUNEL分析は、48時間での基準ラインと比較した場合、静脈または動脈条件のいずれにおいても、有意なネクロシスまたはアポトーシスをそれぞれ示さなかった。同様の観察を、このシステムの初期世代を使用して、14日間続く灌流についても行った（Ligush, J., R. F. Labadie, S. A. Berceli, J. B. Ochoa, および H. S. Borovetz, Evaluation of endothelium derived nitric oxide mediated vasodilation utilizing ex vivo perfusion of an intact vessel. The Journal of Surgical Research, 1992. 52: (5): 416~21頁）。これらの実験は、滅菌状態および組織生存度を維持しながら、提示されたex vivoブタ内頸静脈灌流を行う能力を実証する。

#### 【0103】

いくつかの組のex vivo血管灌流実験を行った。最初に、一組の実験（一組あたりN=6の動物）を行って、動脈生体力学的条件に突然曝されたPIJVに対する急性過形成応答を確立し、この応答と、自然の静脈条件に曝されたPIJVとを比較した。図6は、この実験デザインを示す概略図であり、これについては以下に詳細に記述する。次いで本発明者らは、有効なex vivo血管灌流システム（EVPS）圧力の手動調節を介して、所望のCWSプロファイルにブタ内頸静脈セグメント（PIJV）を徐々に曝すことにより、この急性過形成応答を減弱させようとした。図7は、やはり以下に詳細に記述されるこの実験デザインを示す概略図である。これらの実験は、突然曝された動脈条件と比較された、漸進的に負荷された状態でex vivoで灌流された新たに切り取られた静脈セグメントによって、低い急性過形成応答を実現するのに必要なCWSプロファイルを確立することに直接関係していた。これらの結果を使用して、本発明者らは、同じCWSプロファイルが実現されるように外膜生分解性ポリマーラップの分解速度も調整することを望み、次いでこのラップを使用して、ラッピングされていない対照と比較してPIJVにおける急性過形成応答を減弱しようとした。図8は、やはり以下に詳細に記述される、この実験デザインを示す概略図である。上述の実験のそれぞれは、動物間でのばらつきが説明されるように「対」にされ、一般に、下記の通り進められた。両側性PIJVを若いブタから外科的に採取し、個別の独立したEVPS中に結びつけた（以下参照）。調査中のエンドポイントの大部分は、これらの時点の数時間以内に首尾よく検出されたので（上記表1の言及を参照）、血管灌流実験は、24または72時間にわたり実施した。各実験の完了時に、組織を生物学的アッセイ用に処理して（以下参照）、表1で概説されるエンドポイントを評価した。

#### 【0104】

組織の採取および輸送

ブタ内頸静脈（PIJV）をモデルとして選択したが、それはヒトのより大きな伏在静脈に内径および壁の厚さが類似しているからであり、かつこの組織は動脈血行動態条件に曝された静脈の病理学的応答を調査するのに既に使用されていたからである。この外科的な採取手順は、バイパス用の伏在静脈切除術の手法で行った。簡単に言うと、麻酔をかけた動物を仰臥位に配置し、頸部切開を両側で行い、頸部の血管筋膜まで層内で切開を行った。各PIJVを同定し、頸部交会部の近位側および頸静脈孔の遠位側を切開した。全ての支流を同定し、漏れが生じないように慎重に結紮した。所望の長さ（6~8cm）を露出させた後、アヒルの嘴状の血管カニューレの各端部で、セグメントにカニューレを挿入

した。外植の直前に、注文設計された血管鉗子 (Ligush J、Labadie R F、Berceli SA、Ochoa JB、およびBorovetz HS. Evaluation of endothelium-derived nitric oxide mediated vasodilation utilizing ex vivo perfusion of an intact vessel. J Surg Res. 1992; 52 (5): 416~21) を、カニューレの端部に取着して、取り出された後の血管の *in vivo* 長を維持した。次いで血管を、鉗子で留めたカニューレと結紮部との間のそれぞれの側で切断した。取り出した直後に、血管を、滅菌輸送箱 (ヘパリン (500 単位/リットル)、パパベリン (60 mg/リットル)、およびセフォキシチン (1.0 g/リットル) が補われた乳酸加リンガー溶液を含有する) 内に配置した。組織採取と以下に記述される灌流システム内への載置との間の時間は、常に1時間未満であった。

10

#### 【0105】

エレクトロスピンニングされた生分解性ポリマーラップの血管周囲配置

外膜ラップを形成するのに使用される生分解性ポリマー複合体は、Guanらにより開発され (Guan J、Sacks MS、Beckman EJ、およびWagner WR. Synthesis, characterization, and cytocompatibility of elastomeric, biodegradable poly (ester-urethane) ureas based on poly (caprolactone) and putrescine. J Biomed Mater Res. 2002; 61 (3): 493-503)、Stankusらによりエレクトロスピンニングされたフォーマットでさらに特徴付けられた (Stankus JJ、Guan J、およびWagner WR. Fabrication of biodegradable elastomeric scaffolds with sub-micron morphologies. J Biomed Mater Res A. 2004; 70 (4): 603~14; およびStankus JJ、Guan J、Fujimoto K、およびWagner WR. Microintegrating smooth muscle cells into a biodegradable, elastomeric fiber matrix. Biomaterials. 2006; 27 (5): 735~44)、ポリ (エステルウレタン) 尿素 (PEUU) 材料をベースにした。このポリマーは、非細胞毒性分解生成物へと *in vitro* で加水分解し、*in vivo* では約3カ月でほぼ完了するように分解することが示された (Fujimoto KL、Guan J、Oshima H、Sakai T、およびWagner WR. In vivo evaluation of a porous, elastic, biodegradable patch for reconstructive cardiac procedures. Ann Thorac Surg. 2007; 83 (2): 648~54; およびFujimoto KL、Tobita K、Merryman WD、Guan J、Momoï N、Stolz DB、Sacks MS、Keller BB、およびWagner WR. An elastic, biodegradable cardiac patch induces contractile smooth muscle and improves cardiac remodeling and function in subacute myocardial infarction. J Am Coll Cardiol. 2007; 49 (23): 2292~300)。ラップの分解速度を制御するため、PEUU、コラーゲン、およびエラスチンタンパク質の複合物を、質量喪失を速めるのに使用されるタンパク質添加と共に利用した。

20

30

40

#### 【0106】

PEUUを、プトレッシン連鎖延長剤を用いてポリ ( $\epsilon$ -カプロラクトン) ジオールおよび1, 4-ジオキシシアナトブタンから合成した。PEUU、コラーゲン、およびエラスチンを、1, 1, 1, 3, 3, 3-ヘキサフルオロ-2-プロパノール (HFIP) に溶

50

かした溶液中で組み合わせ、次いで他の部分で詳細に説明される手順を使用してPIJVセグメント上にエレクトロスピンニングした (Stankus JJ、Guan J、およびWagner WR. Fabrication of biodegradable elastomeric scaffolds with sub-micron morphologies. J Biomed Mater Res A. 2004;70(4):603~14)。簡単に言うと、エレクトロスピンニング条件は、混合溶液体積流量0.28  $\mu\text{L}/\text{秒}$ 、ノズルと標的の間の距離17 cm、ノズルに対する電荷+12 kVおよび標的に対する電荷-3 kVを含んでいた。移植用にスピニングされたAVGの製作に使用される標的は、直径3 mmのType 316ステンレス鋼マンドレルであり、これは内皮損傷を回避するためにAVG管腔内に慎重に挿入された。マンドレルおよび同軸静脈を250 rpmで一緒に回転し、約8 cm/秒の速度で10 cmにわたり線形ステージ上で軸方向に並進移動させて、より均一なコーディング厚を生成した。

10

## 【0107】

ポリマーの機械的性質および分解速度を調整するのに使用される3つのパラメータ、すなわち：1) 混合溶液中の最終ポリマー濃度；2) 混合溶液中のPEUU：コラーゲン：エラスチン比；および3) エレクトロスピンニング時間に比例したラップ厚が存在した。これらのパラメータの、試験がなされた全ての組合せの概要を、表2に示す。

## 【0108】

## 【表2】

20

表2

| ポリマー調整パラメータの組合せの概要。 |                           |                          |      |
|---------------------|---------------------------|--------------------------|------|
| 組合せ                 | PEUU：<br>コラーゲン：エラスチン<br>% | エレクトロス<br>ピンニング時間<br>(分) | 最終濃度 |
| A                   | 14.3：42.3：42.3            | 20                       | 6    |
| B                   | 25：75：0                   | 15                       | 6    |
| C                   | 50：50：0                   | 15                       | 6    |
| D                   | 50：50：0                   | 20                       | 12   |

30

## 【0109】

## Ex vivo 灌流条件

静脈セグメントを、本発明者らによる十分確立された有効なex vivo血管灌流／器官培養システム内に載置した (EVPS、例えば、Labadie RF、Antaki JF、Williams JL、Katyal S、Ligush J、Watkins SC、Pham SM、およびBorovetz HS. Pulsatile perfusion system for ex vivo investigation of biochemical pathways in intact vascular tissue. Am J Physiol. 1996;270(2 Pt 2):H760~8; Severyn DA、Muluk SC、およびVorp DA. The influence of hemodynamics and wall biomechanics on the thrombogenicity of vein segments perfused in vitro. J Surg Res. 2004;121(1):31~7; およびMuluk SC、Vorp DA、Severyn DA、Gleixner S、Johnson PC、およびWebster MW. Enhancement of tissue factor expres

40

50

sion by vein segments exposed to coronary arterial hemodynamics. Journal of Vascular Surgery: Official Publication, the Society For Vascular Surgery [and] International Society For Cardiovascular Surgery, North American Chapter. 1998; 27 (3): 521~7 参照)。簡単に言うと、閉鎖ループ灌流デザインは、血管セグメントを通した無菌灌流液（1%ウシ胎児血清および1.0g/リットルのセフォキシチンが補われた組織培地199）の循環、ならびに密封チャンバ内での外膜浴（1%ウシ胎児血清および1.0g/リットルのセフォキシチンを有するDMEM）の循環を可能にする。灌流液および浴培地は共に、37℃でかつ溶解ガスの生理学的レベルで維持された。実験は、2つのシミュレートされた血行動態条件（Severyn DA、Muluk SC、およびVorp DA. The influence of hemodynamics and wall biomechanics on the thrombogenicity of vein segments perfused in vitro. J Surg Res. 2004; 121 (1): 31~7; およびMuluk SC、Vorp DA、Severyn DA、Gleixner S、Johnson PC、およびWebster MW. Enhancement of tissue factor expression by vein segments exposed to coronary arterial hemodynamics. Journal of Vascular Surgery: Official Publication, the Society For Vascular Surgery [and] International Society For Cardiovascular Surgery, North American Chapter. 1998; 27 (3): 521~7）—自然の静脈（VEN）または動脈（ART）条件のいずれかを利用した。VEN血行動態をシミュレートするため、灌流ループを、非拍動性の流れ20ml/分および圧力20mmHgが提供されるように設定した。ART血行動態をシミュレートするため、このシステムを、拍動性圧力波120/80mmHgおよび平均灌流液流量100ml/分が提供されるように設定した。別の実験を行って、VENまたはART条件下でラッピングされていない静脈について検査し、ART条件（wART）下でラッピングされた静脈を検査した。各灌流実験を24時間継続し、管腔内圧力、外径、および流量を、毎時間測定した。次いで静脈セグメントを、以下に記述されるよう組織学的にまたは免疫組織化学を介して分析した。

#### 【0110】

##### VEN対ART実験

図6は、行われた最初の組のex vivo実験を示す概略図である。これらの実験において、本発明者らは、ART条件に突然曝されたPIJV対24時間にわたりVEN条件に曝されたPIJVに対する、生分解性のエレクトロスピンニングされたポリマーラップのPIJVへの有益な作用について評価した。

#### 【0111】

##### ART対cART実験

図7は、行われた第2の組ex vivo実験を示す概略図である。これらの実験において、本発明者らは、PIJV対24時間および72時間にわたりART条件に突然曝されたPIJVに対する、機械的調整パラダイム（cART条件）の作用を評価した。

#### 【0112】

##### ART対wART実験

図8は、行われた第3の組のex vivo実験を示す概略図である。本発明者らは、ART条件（wART条件）に対するPIJV対24時間にわたりART条件に曝されたラッピングされていないPIJVに対する、調整された生分解性ポリマーラップの有益な作用について評価した。

## 【0113】

化合物シリンダにおけるCWSの計算

AVGを動脈レベルのCWSに突然曝すことは、それらが失敗した様式に關与する可能性があると考えられているので、本發明者らは、エレクトロスピニングされた生分解性ポリマーラップの1つの可能性がある適用例が、AVGを動脈レベルのCWSに徐曝することであるとする。外部シースを使用してCWSを制限しようとする以前の試みは、それらが生体耐久性でありかつ／またはゆとりのあるフィッティング状態のいずれかであったので、完全に首尾よく行われなかった。ラップがどのようにCWSを修飾し得るのか、かつ所望の結果を実現するのにラップをどのように調整し得るのかを実証するため、本發明者らは、表1に示されるラップの組合せのそれぞれについてCWS－対－時間プロファイルを検査し、これらと、静脈または動脈条件に曝されたラッピングされていない静脈セグメントとを比較した。これは、ex vivo 灌流実験から収集されたデータとCWSに關する数学的モデルとを使用して實現された。

10

## 【0114】

生体力学的モデリングを目的として、静脈／ラップ複合体の理想的な断面を示す、図9の概略図について検討する。2層化合物チューブの外層は、エレクトロスピニングされたポリマーラップとして得られ、同心状の内層は静脈セグメントである。

## 【0115】

次いで以下の仮定を行った (Vorp DA, Raghavan ML, Borovetz HS, Greisler HP, および Webster MW. Modeling the transmural stress distribution during healing of bioresorbable vascular prostheses. Ann Biomed Eng. 1995; 23 (2) : 178 ~ 88) :

20

i) 層間に滑りまたは剥離はない

ii) 界面全体にわたる変形の適合性は維持される

iii) 平均動脈圧下では少しの変形しか存在しない

iv) システムは平面応力の状態の下にある

v) 両方の層は、非圧縮性、等方性、均質、および線形弾性の材料である

vi) 個別の層のそれぞれは、内部および外部圧力に曝される単一の、壁の厚いシリンダとして一般化されてもよい

30

Vorpらにより開発された数学的モデル (Id.) を、図9により表されるモデルに適合させた。手短に言えば、本發明者らは、内部および外部圧力の作用下にある開放端を有する厚い壁のシリンダにおいて (Id.) 、半径方向および円周方向の壁応力 (それぞれ、 $\sigma_r$  および  $\sigma_\theta$ ) と、任意の半径  $r$  での半径方向の変形 ( $U_r$ ) とに關し、古典的なラメ解法を使用した。図9に示される内部 (静脈) 層に關し、本發明者らは、(Id.) を得る :

## 【0116】

【数2】

$$\sigma_{r,v} = \frac{a^2 P_i - b^2 P_2}{b^2 - a^2} - \frac{(P_i - P_2) a^2 b^2}{(b^2 - a^2) r^2} \quad (15a)$$

$$\sigma_{\theta,v} = \frac{a^2 P_i - b^2 P_2}{b^2 - a^2} + \frac{(P_i - P_2) a^2 b^2}{(b^2 - a^2) r^2} \quad (15b)$$

$$u_{r,v} = \frac{1 - \nu_v}{E_v} \frac{(a^2 P_i - b^2 P_2) r}{b^2 - a^2} + \frac{1 + \nu_v}{E_v} \frac{(P_i - P_2) a^2 b^2}{(b^2 - a^2) r} \quad (16)$$

40

## 【0117】

50

(式中、下付き文字「V」は、静脈に関する量を指し、aおよびbは、それぞれ静脈層の内部半径および外部半径である。P<sub>i</sub>は内部圧力であり、P<sub>2</sub>は、同心状のシリンダの2層の間で作用する、それらの機械的性質の相違から生じる界面圧力である。Vはポワソン比であり、Eはヤングの弾性率である)。図9に示される外部(ラップ)層に関し、本発明者らは、下式を有する:

【0118】

【数3】

$$\left. \begin{aligned} \sigma_{r,w} &= \frac{b^2 P_2 - c^2 P_o}{c^2 - b^2} - \frac{(P_2 - P_o) b^2 c^2}{(c^2 - b^2) r^2} \\ \sigma_{\theta,w} &= \frac{b^2 P_2 - c^2 P_o}{c^2 - b^2} + \frac{(P_2 - P_o) b^2 c^2}{(c^2 - b^2) r^2} \\ u_{r,w} &= \frac{1 - \nu_w}{E_w} \frac{(b^2 P_2 - c^2 P_o) r}{c^2 - b^2} + \frac{1 + \nu_w}{E_w} \frac{(P_2 - P_o) b^2 c^2}{(c^2 - b^2) r} \end{aligned} \right\} \text{for } b \leq r \leq c \quad \begin{matrix} (17a) \\ (17b) \\ (18) \end{matrix}$$

10

【0119】

(式中、下付き文字「W」は、ラップにより占有された領域の量を指し、bおよびcはそれぞれラップ層の内部半径および外部半径である。P<sub>o</sub>は外部圧力である)。層間の界面全体にわたる変形の適合性により、下記の通りでなければならない

20

$$u_r, v = u_r, w \quad (r = b \text{ で}) \quad (19)$$

(16)および(18)を(19)に置換することにより、 $v_w = v_v = v = 0.5$ とし(両方の材料は共に非圧縮性であると仮定する)、P<sub>o</sub> = 0と設定し(すなわち、大気圧)、P<sub>2</sub>に関して解くことにより、下式を得る:

【0120】

【数4】

$$P_2 = \frac{a^2 P_i (1 - \nu) E_w b (c^2 - b^2) + (1 + \nu) E_w (c^2 - b^2) b a^2 P_i}{b^2 (1 - \nu) E_w b (c^2 - b^2) + (1 - \nu) a^3 E_v (b^2 - a^2) + (1 + \nu) E_w (c^2 - b^2) b a^2 + c^2 E_v b (b^2 - a^2)}$$

30

(20).

【0121】

P<sub>1</sub>および外径(すなわち、c)は、本発明者らのex vivo灌流実験で測定したことを思い起こされたい。したがって本発明者らは、測定されたP<sub>1</sub>およびcのそれぞれの組に関して、内部(r = a)および界面(r = b)半径を計算しなければならなかった。本発明者らは、静脈およびラップの両方が非圧縮性の材料であり、したがって各シリンダの容積が任意の変形状態で一定である必要があるという仮説を利用したので、下式の通りでなければならない:

【0122】

【数5】

$$[\pi(r_o^2 - r_i^2)L]_u = [\pi(r_o^2 - r_i^2)L]_p \quad (21)$$

40

【0123】

(式中、r<sub>o</sub>およびr<sub>i</sub>はそれぞれ外部および内部半径であり、Lは各シリンダの長さであり、下付き文字uおよびpは、非加圧および加圧状態をそれぞれ指す)。方程式(21)を図9の「ラップ」シリンダの幾何形状に適用することにより、下式が得られる:

【0124】

【数 6】

$$b_p = \sqrt{\frac{c_p^2 L_p - (c_u^2 - b_u^2) L_u}{L_p}} \quad (22).$$

【0125】

したがって、任意の測定された  $c_p$  および  $L_p$  に関し、 $b_p$  の値を計算することができる。同様に、図 9 の「静脈」シリンダのみを考慮し、かつ  $b_p$  に関して方程式 (22) を使用することにより、本発明者らは、下式を見出す：

【0126】

10

【数 7】

$$a_p = \sqrt{\frac{\left( \frac{c_p^2 L_p (c_u^2 - b_u^2) L_u}{L_p} \right) L_p - (b_u^2 - a_u^2) L_u}{L_p}} \quad (23).$$

【0127】

方程式 (20)、(22)、および (23) を方程式 (1Sb) に置換し、かつ平均動脈圧でおよび下式で評価することにより、

20

【0128】

【数 8】

$$r = \frac{a_p + b_p}{2}$$

【0129】

本発明者らは、ポリマーラッピングされた静脈における中間壁 CWS を計算することができる。本発明者らは、本発明者らの計算において、 $E_w = 7.5 \text{ MPa}$  であり (Stankus J J、Guan J、および Wagner W R. Fabrication of biodegradable elastomeric scaffolds with sub-micron morphologies. J Biomed Mater Res A. 2004; 70 (4) : 603~14)、 $E_v = 600 \text{ KPa}$  である (Wesly R L、Vaishnav R N、Fuchs J C、Patel D J、および Greenfield J C. Static linear and nonlinear elastic properties of normal and arterialized venous tissue in dog and man. Circulation Research (Online). 1975; 37 (4) : 509~20) と仮定した。

30

【0130】

血管運動性チャレンジ実験

40

組織生存度に対するエレクトロスピニングプロセスの作用を評価するため、本発明者らは、所定の位置にポリマーラップが存在し (「スピニングされた」) および存在しない (「見せかけの」) PIJV セグメント、ならびに未処理の真新しい切除 (「対照」) 組織について、試験をした。エレクトロスピニングされたポリマーラップなしの見せかけの PIJV セグメントの場合、本発明者らは、ポリマーラップが実際に配置される点までエレクトロスピニングプロセスを模倣した (すなわち、マンドレルの挿入を含み、静脈を電界内で回転／並進移動させる)。組織の機能を、上述の *ex vivo* 血管運動性チャレンジを使用して評価した (Labadie RF、Antaki JF、Williams J L、Katyal S、Ligush J、Watkins SC、Pham SM、および Borovetz HS. Pulsatile perfusion syst

50

em for ex vivo investigation of biochemical pathways in intact vascular tissue. Am J Physiol. 1996; 270 (2 Pt 2): H760~8; および Ligush J、Labadie RF、Berceli SA、Ochoa JB、および Borovetz HS. Evaluation of endothelium-derived nitric oxide mediated vasodilation utilizing ex vivo perfusion of an intact vessel. J Surg Res. 1992; 52 (5): 416~21)。  
 。手短に言うと、血管セグメントにカニューレを挿入し、20mmHgの一定の管腔内圧力下に配置し、漸増する用量のエピネフリン (EPI) に曝した。実験の全体を通して、外部血管直径 (D) をレーザーマイクロメータで連続的に測定した (Labadie RF、Antaki JF、Williams JL、Katyal S、Ligush J、Watkins SC、Pham SM、および Borovetz HS. Pulsatile perfusion system for ex vivo investigation of biochemical pathways in intact vascular tissue. Am J Physiol. 1996; 270 (2 Pt 2): H760~8; Brant AM、Rodgers GJ、および Borovetz HS. Measurement in vitro of pulsatile arterial diameter using a helium-neon laser. J Appl Physiol. 1987; 62 (2): 679~83; および Ligush J、Labadie RF、Berceli SA、Ochoa JB、および Borovetz HS. Evaluation of endothelium-derived nitric oxide mediated vasodilation utilizing ex vivo perfusion of an intact vessel. J Surg Res. 1992; 52 (5): 416~21)。  
 基準ラインの直径 ( $D_{\text{基準ライン}}$ ) を、最初の用量の EPI の注射前に測定した。引き続き EPI を、1、4.5、および 10 分でそれぞれ  $2 \times 10^{-5}$ 、 $2 \times 10^{-4}$ 、および  $2 \times 10^{-3}$  mg/ml の最終濃度にまで注射した。各用量による最大血管収縮を観察した後、引き続きそれぞれの用量を投与した。最大用量の EPI を投与し、かつ最大レベルの収縮 ( $D_{\text{収縮}}$ ) を観察した後、25mg/ml のナトリウムニトロプルシド (SNP) 2ml をボラス注射することにより、0.125mg/ml の最終濃度を得た。完全な拡張を観察されたとき、 $D_{\text{拡張}}$  を記録した。EPI に応答する収縮レベルは、下記の通り計算し：

【0131】

【数9】

$$\% \text{収縮} = \frac{D_{\text{基準ライン}} - D_{\text{収縮した}}}{D_{\text{収縮した}}} * 100 \quad (24)$$

【0132】

同様に、SNP に応答した拡張レベルを下記の通り計算した：

【0133】

【数10】

$$\% \text{拡張} = \frac{D_{\text{拡張した}} - D_{\text{収縮した}}}{D_{\text{収縮した}}} * 100 \quad (25)$$

【0134】

コンプライアンスおよび  $\beta$  - 剛性の測定

外径 (OD) および管腔内拍動性圧力 (P) の時間毎の測定を、上述の ART 対 wART の 24 時間灌流実験 (N=6) 中に行った。これらの測定値は、スピニングされた PI

J Vおよび見せかけの対照 P I J Vの両方に関するコンプライアンス (C) および  $\beta$  - 剛性 ( $\beta$ ) を算出するのに使用した。サンプリング周波数 150 Hz を使用して、時間毎の測定を 5 秒間行って、データのほぼ 5 回の完全な「心臓周期」が収集されるようにした。次いで、獲得されたシグナルをフィルタリングし、プロットした。各サイクルごとの最大 ( $OD_s$  および  $P_s$ ) および最小 ( $OD_d$  および  $P_d$ ) 値を使用して、方程式 26 を使用して C を計算し、方程式 27 を使用して  $\beta$  を計算した (Hayashi K. Experimental approaches on measuring the mechanical properties and constitutive laws of arterial walls. J Biomech Eng. 1993; 115 (4B): 481-8)。5つの値を平均し、C および  $\beta$  の単一の値を毎時計算した。

10

【0135】

【数11】

$$C = \frac{\left( \frac{OD_s - OD_d}{OD_d} \right)}{P_s - P_d} \quad (26)$$

$$\beta = \frac{\ln(P_s - P_d)}{\left( \frac{OD_s - OD_d}{OD_d} \right)} \quad (27)$$

20

【0136】

灌流後組織処理

本発明者らは、1日、および3日間の実験からエンドポイントを評価することになる。本発明者らは、新たに切除された血管セグメントを利用する場合、組織生存度の維持がこの灌流持続時間の間に実現可能であることを確立した (Ligush J, Labadie RF, Berceli SA, Ochoa JB, および Borovetz HS. Evaluation of endothelium-derived nitric oxide mediated vasodilation utilizing ex vivo perfusion of an intact vessel. J Surg Res. 1992; 52 (5): 416-21)。静脈の過形成応答は、セクション 1. 2 でまとめられた様々な慎重に選択されたエンドポイントを測定することにより、定量化されることになる。これらのエンドポイントは、必要とされる組織処理に基づいて3つのカテゴリーに、すなわち：i) 組織学 (微細/超微細構造を含む)；ii) RNA 分析；および iii) タンパク質分析にグループ分けすることができる。全ての静脈セグメントをセグメント化し、図 10 に従って処理した。

30

【0137】

生物学的分析

上記にて提示された生物学的エンドポイントは、必要とされるアッセイのタイプに関して組織学に基づくかまたは分子に基づくかのいずれかとして特徴付けることができる。組織学的エンドポイントには、ミクロ構造、アポトーシス、増殖、SMC 表現型マーカー、および細胞-接着マーカーの評価が含まれた。タンパク質および遺伝子の発現のエンドポイントは、タンパク質および RNA の単離が必要であり、かつ分子として分類される。

40

【0138】

組織学的分析 (図 10) 専用のサンプルを冷凍庫から取り出し、Tissue Freezing Medium (商標) (Triangle Biomedical Sciences, Durham, N. C.) に即座に包埋し、 $-65^{\circ}\text{C}$  で凍結させた。5ミクロンの断面を、クリオトームを使用して切り出し、正に帯電したガラス顕微鏡スライド上に配置した。組織学的または免疫組織化学的アッセイ用に処理することができるまで、ス

50

ライドを $-80^{\circ}\text{C}$ で保存した。

#### 【0139】

##### 組織学

ex vivo灌流システムから静脈を取り出した後、それらを4%パラホルムアルデヒド中で4時間、 $4^{\circ}\text{C}$ で固定し、その後、30%スクロースにより $4^{\circ}\text{C}$ で一晩固定した。5mmの組織環を切断し、PBSで洗浄し、Tissue Freezing Medium (商標) (Triangle Biomedical Sciences, Durham, N. C.) 中に包埋し、 $5\mu\text{m}$ の切片に切断した。組織切片を、ヘマトキシリンおよびエオシン染色 (H&E)、Massonのトリクローム染色 (MTC)、ピクロシリウスレッド、またはMovatのペンタクローム染色のいずれかにより染色した。次いで染色された組織切片を、Olympus Provis光学顕微鏡 (Olympus, Center Valley, Pa., USA) を使用して可視化し、定性的に比較した。

10

#### 【0140】

##### 走査型電子顕微鏡法

エレクトロスピンニングされた、ラッピングされたPIJVを、走査型電子顕微鏡法 (SEM) の下で検査した。手短に言うと、SEM用に設計された組織セグメントを、超高純度の2.5%グルタルアルデヒド中に固定し、段階的な濃度のエタノール溶液 (30~100%) を通して脱水し、臨界点乾燥し (Emscope, CPD 750, Ashford, Kent, UK)、次いで気化した炭素でオーバーコーティングした (Cressington Freeze Fracture Device, Cressington, Cranberry, PA, USA)。組織を、JEOL JEM-6335F電界放出電子銃SEM (JEOL, Peabody, Mass., USA) を使用して可視化した。

20

#### 【0141】

##### ネクロシス

組織生存度に対するエレクトロスピンニングプロセスの作用を評価するため、本発明者らは、スピニングされたPIJVセグメントおよび見せかけのPIJVセグメント、ならびに未処理の真新しい切除組織 (「対照」) について試験をした。組織のネクロシスを、製造業者の指示に従って、低温切開片のLive/Dead (商標) 染色 (Molecular Probes, Carlsbad, Calif., USA) を使用して試験をした。Live/Dead (商標) 染色が意図される各セグメント (対照、見せかけの対照、およびスピニングされたもの) を半分に切断し、標準的なインキュベーター条件下でペトリ皿内の静置培養中に配置した。各セグメントの半分を、培養の18時間後に評価し、残りの半分を、92時間後に評価した。5mmの環を各サンプルから切り出し、低温マトリックス (TBS, Durham, N. C.) 中に包埋し、次いで凍結させた。5つの $8\mu\text{m}$ 切片を各環から切断し、落射蛍光顕微鏡 (Nikon, Model E800, Melville, N. Y., USA) を使用して、倍率20×で撮像した。切片あたり2つの画像を撮影し、合計で10視野が、PIJVセグメント当たりで定量化されるようにした。Scion Image (Version Beta 4.02, NIH, Bethesda, Md.) を使用して、視野中の細胞の総数をカウントした。視野中の生細胞のパーセンテージを決定するため、死細胞を手作業でカウントし、細胞の総数で割り、100%を乗じた。死細胞のパーセンテージを100%から差し引いて、生細胞のパーセンテージを計算した。

30

40

#### 【0142】

##### アポトーシス

アポトーシスを、In Situ細胞死キット、フルオレセイン (TUNEL) (Roche Applied Science, Indianapolis, Ind.) を使用して評価した。このアッセイは、アポトーシスのゲノムDNA切断成分を同定するTUNEL技術を使用する。簡単に言うと、断面 $37^{\circ}\text{C}$ で20分間乾燥し、4%パラホルムアルデヒド中で20分間固定し、リン酸緩衝生理食塩液 (PBS) 中で30分間再水和した

50

。次いでサンプルを、 $10\mu\text{g}/\text{ml}$ のProteinase K中で、その後、新たに調製した0.1%Triton X-100および0.1%クエン酸ナトリウムの溶液中で、それぞれ室温で10分間インキュベーションして、膜の透過処理を行った。DNA鎖切断を、末端デオキシヌクレオチジルトランスフェラーゼおよびフルオレセイン標識dUTP（共にRocheからキットに入った状態で提供された）を用いて、 $37^{\circ}\text{C}$ で1時間インキュベートすることにより同定した。核を、Hoechst 33258で対比染色した。小さな組のサンプルについて、有効性を確認するために、アッセイが行われるごとに陽性対照として作用するように $100\text{U}/\text{ml}$ のDNase Iで処理した。インキュベーションの時間、温度、および試薬濃度を含む全てのサンプル調製パラメータを、DNase Iで処理した陽性対照を使用して最適化した。陰性対照は、トランスフェラーゼ酵素なしで、標識dUTPと共にインキュベートした。

10

#### 【0143】

TUNEL陽性細胞のパーセントの定量化を、手作業でカウントする手順を使用して行った。所与の $5\mu\text{m}$ の断面から得られた5つのFOV（視野）のそれぞれからの陽性細胞を平均して、その断面に関する陽性細胞の平均パーセントを定めた。1つのセグメントから得られたTUNEL陽性細胞の平均パーセント（図10）を決定した。

#### 【0144】

##### 増殖

増殖を、免疫組織化学により決定された増殖性細胞核抗原（PCNA）の発現によって評価した。 $5\mu\text{m}$ の断面を乾燥し、固定し、TUNELアッセイで記述されたように透過化した。抗体の非特異的結合は、サンプルを、PBSに溶かした1%ウマ血清と共に15分間インキュベートすることにより遮断した。この後、サンプルを、ヒトPCNAに対する1次マウスモノクローナル抗体（Dako Cytomation、Clone PC10、Denmark）と共に、 $4^{\circ}\text{C}$ で一晩、サンプルが乾燥しないように加湿したチャンバ内でインキュベートした。結合していない1次抗体は、その後にPBS中で洗浄することにより除去した。次に、断面を、Vectastain Elite（商標）ホースーラディッシュペルオキシダーゼおよびアビジン-ビオチン検出システム（Vector Labs、Cat. #PK-6200、Burlingame、Calif.）の一部であるユニバーサル（抗マウスおよび抗ウサギ）ビオチン化2次抗体と共に、 $37^{\circ}\text{C}$ で60分間、加湿されたチャンバ内でインキュベートし、次いでPBSで3回濯いだ。次いでVectastain（商標）試薬を用いたインキュベーションを、室温にて30分間行った。陽性染色された細胞を検出するため、ジアミノベンジン（DAB）基質（Vector Labs、Cat. #SK-4100、Burlingame、Calif.）を使用した。酵素反応によって、PCNA陽性細胞は褐色に染色され、これを、所望のレベルの染色が実現されるまで顕微鏡（倍率 $100\times$ ）を介して可視化した。次いで反応を、スライドを脱イオン水中に配置することにより停止させた。核を可視化するため、細胞を、製造業者の指示に従いヘマトキシリン（Vector Labs、Cat. #H-3401、Burlingame、Calif.）で対比染色した。PCNA陽性細胞のパーセントの定量化は、TUNELの場合と同じ方法を使用して行った。

20

30

#### 【0145】

##### SMC表現型

合成SMC表現型を検出するため、本発明者らは、ヒトゴルジ複合体に対して生成されたマウスモノクローナル抗体（Abcam、Cat. #ab14487、Cambridge、Mass.）を使用した。上述の場合（PCNA）と同じ手順を使用して、静脈のセグメントあたりのゴルジ複合体陽性細胞の平均パーセンテージを定量した。

40

#### 【0146】

##### 統計

血管運動性チャレンジのデータ、および免疫組織化学的画像の定量化データに関し、平均に関する対応スチューデントt検定を行い、 $P < 0.05$ を統計的に有意と見なした。特に指示されない限り、全てのデータは、平均±平均の標準誤差として示される。

50

## 【0147】

## 結果

## CWSプロファイル

ラップにより静脈に提供された構造的支持は、本発明者らが図11の外径プロファイルを試験する際に、明らかである。ラップを有する静脈は、ラップのない静脈と同じ程度まで、ART条件の下では拡張しないことが示された。直径が減少すると、以下に記述される動脈圧と同じレベルでは、ラッピングされていない対照に対して静脈壁におけるCWSが効果的に減少した。

## 【0148】

表2のポリマー溶液の組合せに関するCWS対時間プロファイルは、実に変わり易いものであった(図12)。ある場合(組合せB)では、ラップが素早く分解し、ART条件下でのCWSの素早い増加をもたらした。その他の組合せ(CおよびD)は、十分に素早く分解せず、24時間にわたりCWSの目に見える増加は生じなかった。組合せAは、CWSのVENレベルとARTレベルとの間で24時間にわたりほぼ線形的な変化を生じさせる速度で分解された。この組合せを繰り返し(N=7)、その作用が再現可能であることが見出された。

## 【0149】

## 血管運動性チャレンジの結果

典型的な血管運動性チャレンジ実験の結果を、図13に示す。見せかけのPIJVセグメントは、EPIによる刺激に対して予測可能な用量依存的手法で応答し、一方、スピニ 20  
ングされたPIJVは、最低用量のEPIで開始する1回の収縮を示した。SNPに 20  
応答する血管拡張は、対照およびスピニングされたPIJVの両方に関して類似しており、それぞれは、基準ラインの場合よりも大きな外径をもたらし、見せかけおよびスピニ 20  
ングされた両方のPIJVにおいてある特定レベルの基本的なトーンが示唆された。全体として、見せかけのPIJVセグメントとスピニングされたPIJVセグメントとの間には、収 20  
縮(図14A)または拡張(図14B)のレベルに有意差がなかった。

## 【0150】

## コンプライアンスおよびβ-剛性

図15Aおよび15Cにおいて、本発明者らは、動脈レベルの圧力に曝された場合、P 30  
IJVが非常に堅い(従って順応性が非常に低い)ことがわかった。同じ血流力学的条件 30  
下で、PIJVの外膜表面にスピニングされた調整されたポリマーラップは、低い剛性( 30  
図15B)および高いコンプライアンス(図15D)により明らかな構造的支持を提供し 30  
た。技術的な問題により、見せかけの対照の1つに関する圧力および直径の測定値は可能 30  
ではなく、したがってスピニングされた群(N=6)よりも1つ少ないデータ集合(N= 30  
5)であったことに留意されたい。

## 【0151】

## 生物学的分析

## 組織学

組織学的画像は、ポリマーラップが静脈の外膜表面に十分取着していたことも示され 40  
かつほぼ均一な厚さでエレクトロスピンングできるという点で、SEM画像と矛盾のないも 40  
のであった(図16Aおよび19C)。さらにポリマーは、24時間の灌流時間の後、ほ 40  
ぼ完全に分解した(図16Bおよび16D)。

## 【0152】

図17は、ピクロシリウスレッドで染色された静脈セクションの代表的な複屈折画像を 50  
示す。各画像において、赤から緑までの色の範囲は、コラーゲン繊維の組織化の範囲を示 50  
し、赤は最も組織化された状態を、また緑はそれほど組織化されていない状態を示す。染 50  
色の顆粒状の外観は、天然の襞状のコラーゲン繊維状態を示し、一方、延伸された繊維は 50  
顆粒状ではなく線状に見える。これらの結果は、24時間にわたりART条件下でex 50  
vivoで灌流された対照PIJVセグメントと比較した場合、ポリマーラップは、コラ 50  
ーゲン繊維の延伸レベルを低下させることを示唆している(より大きく組織化されかつ襞 50

がより少なくなったことを含む)。

#### 【0153】

M o v a t のペンタクロームで染色された組織セクションの代表的な画像を、図18に示す。V E Nおよびw A R Tの両方の条件と比較した場合、A R T条件下で灌流されたP I J Vでは、内部弾性薄層が破壊されたように見える。ピクロシリウスレッド染色の場合のように、このデータは、ポリマーラップがA R T条件に曝された場合に静脈壁内の延伸レベルの減少を首尾よく行ったことを示唆している。

#### 【0154】

##### S E M

エレクトロスピンニングされた外膜ラップは、高い多孔度と、静脈の外膜表面への緊密な接着とを示しており(図19A~19C)、これは組織中への外膜栄養素およびガスの拡散を阻害することなく、ラップがA V Gに対して構造的支持をもたらしたことを示唆している。別の重要な知見は、エレクトロスピンニングプロセスが内皮層に損傷を与えないようであり、それが連続的に維持されるということであった(図19D)。

#### 【0155】

##### ネクローシス

各時点ごとの各実験群の間には、組織生存度に有意差はなかった(図20)。

##### アポトーシス

図21は、上述の4種全てのe x v i v o血管灌流実験から得られた、T U N E L染色の代表的な、対になった蛍光免疫組織化学画像を示す。図22は、これらの実験から得られた定量化T U N E L分析の結果を示す。V E N対照に対し、A R T条件に突然曝されたP I J Vにおけるアポトーシス細胞には、統計的に有意な増加があることがわかる。しかし、c A R T条件を介して(24および72時間の両方に関し)また生分解性のエレクトロスピンニングされたポリマーラップを介して(w A R T条件)課された機械的調整パラダイムは、A R T対照条件に比べ、P I J V内のアポトーシス細胞の数を統計的に有意に減少させた。

#### 【0156】

##### 増殖

図23は、上述の4種全てのe x v i v o血管灌流実験から得られた、代表的な、対になった、H R P / A B Cに基づくP C N A染色の免疫組織化学画像を示す。図24は、これらの実験から得られた定量化P C N A分析結果を示す。V E N対照に比べ、A R T条件に突然曝されたP I J V内の増殖性細胞は、統計的に有意に減少していることがわかる。しかし、c A R T条件(24時間)を介して、また生分解性のエレクトロスピンニングされたポリマーラップ(w A R T条件)を介して課された機械的調整パラダイムは、A R T対照条件に比べ、P I J V内の増殖細胞の数の減少を、統計的に有意に阻害した。72時間にわたりc A R T条件に曝されたP I J V内の増殖細胞の数は、A R T対照の場合と統計的に有意な相違はなかった。

#### 【0157】

##### S M C表現型

図25は、上述の4種全てのe x v i v o血管灌流実験から得られた、代表的な、対になった、H R P / A B Cに基づくゴルジ複合体染色の免疫組織化学画像を示す。図26は、これらの実験から得られた、定量化ゴルジ複合体分析の結果を示す。A R T条件に突然曝されたP I J V内のゴルジ複合体に関する陽性染色された細胞の数は、V E N対照と比較して、統計的に有意に増加することがわかる。c A R T条件(24および72時間の両方に関し)を介して、また生分解性のエレクトロスピンニングされたポリマーラップ(w A R T条件)を介して課された機械的調整パラダイムは、A R T対照条件と比較すると、P I J V内のゴルジ複合体に関して陽性染色された細胞数の増加を、統計的に有意に阻害するという傾向のみを示唆している。

#### 【0158】

##### 考察

この章で示される成果は、生分解性のエレクトロスピンニングされたポリマーラップが均一に（図16）かつ安全に（図13および14）静脈セグメント上にエレクトロスピンニングすることができ、かつCWSが所望の速度でAVGに付着されるように（図12）ラップを完全に分解するよう調整できることを示す（図16）。外膜に配置されたエレクトロスピンニングされたポリマーラップの生分解速度を制御することにより、それ自体に、AVGでのIHを減弱するための3つの潜在的に有益な支持様式をもたらすことができた。本明細書に示されるように、生体力学的支持は、所望の速度で送達することができる。その結果、生化学的（薬物）および生物学的（細胞性）な支持の送達は共に、同じ手法を使用して理論的には実現することができる（Stankus JJ、Guan J、Fujimoto K、およびWagner WR. *Microintegrating smooth muscle cells into a biodegradable, elastomeric fiber matrix. Biomaterials.* 2006; 27(5): 735~44; およびStankus JJ、Soletti L、Kazuro F、Hong Y、およびVorp DA. *Fabrication of cell microintegrated blood vessel constructs through electrohydrodynamic atomization.* 2007; Accepted)。AVGマイクロ構造に対するポリマーラップの潜在的に有益な作用は、ピクロシリウスレッドおよびMovatのペンタクローム染色から得られた（それぞれ、図17および18）。ポリマーラップは、AVGに構造的サポートをもたらしてコラーゲン繊維のより自然な襞状の構造（図17）を引き起こし、ならびに内部弾性薄層のより少ない損傷（図18）をもたらすように見える。AVG壁を含む構造タンパク質の完全性を維持することは、血管ECおよびSMCにより受け取られる有害な機械的誘因を最小限に抑えるのを助けることができ、したがってAVGにおけるIHを減弱するのを助けることもできる。本発明者らは、エレクトロスピンニングされたPIJVでのLive/Dead（商標）染色を介してネクロシスレベルも評価し、見せかけのおよび静的な対照に比べ、エレクトロスピンニングによるネクロシスの目に見える増加は示されなかった（図19）。このデータは、血管運動性チャレンジデータに加え（図13および14）、組織生存度がエレクトロスピンニングにより影響を受けないことを示すことが、より明らかである。

#### 【0159】

免疫組織化学の結果は、動脈レベルのCWSにAVGを突然曝すのではなく、徐々に曝すことが有益と考えられることを示唆している。図22および24にそれぞれ示されるように、アポトーシスと増殖との間のバランスは、VEN対照に比べ、PIJVをART条件に突然曝すことにより破壊されることが示された。ART条件下で灌流されたPIJVで観察された、アポトーシスの増加および増殖の減少は、静脈の生体力学的環境が変化したことにより細胞機能の急激なシフトが存在することが示唆される。静脈内の細胞機能のこのシフトは、cARTおよびwARTのex vivo灌流条件を介したCWSの動脈レベルのより段階的な負荷により阻害されることが示された。さらに、予測されるように、ART条件に曝されたPIJVでのゴルジ複合体発現レベルは、VEN対照に比べて上昇し（図26）、SMC表現型の修飾がより合成的な状態になるまで行われることを示唆している。この観察された細胞機能のシフトは、cARTまたはwART条件を介してARTレベルのCWSに徐々に曝すことによって、統計的に有意には阻害されなかった。しかし、このシフトの阻害に向けて観察された傾向は、図26に示された。この傾向が統計的に有意になるか否かを決定するには、追加の実験が必要である。

#### 【0160】

ART条件にPIJVを曝すことから生じるSMC表現型で観察された変化は、以前報告されたデータと一致する（Simosa HF、Wang G、Sui X、Peterson T、Narra V、Altieri DC、およびConte MS. *Survivin expression is up-regulated in vascular injury and identifies a distinct c*

cellular phenotype. J Vasc Surg. 2005; 41 (4) : 682~90; Zhang WD、Bai HZ、Sawa Y、Yamakawa T、Kadoba K、Taniguchi K、Masuda J、Ogata J、Shirakura R、およびMatsuda H. Association of smooth muscle cell phenotypic modulation with extracellular matrix alterations during neointima formation in rabbit vein grafts. J Vasc Surg. 1999; 30 (1) : 169~83; およびWolff RA、Malinowski RL、Heaton NS、Hullett DA、およびHoch JR. Transforming growth factor- $\beta$  antisense treatment of rat vein grafts reduces the accumulation of collagen and increases the accumulation of h-caldesmon. J Vasc Surg. 2006; 43 (5) : 1028~36)。AVGに、動脈レベルのCWSをより徐々に負荷するという概念は、これまで報告されておらず、しかしSMCの表現型修飾を遅延させまたは阻害する手段をもたらすことができ、その結果、過形成応答を低減させることができる。ARTに曝されたPIJVでのアポトーシスの低減も、VEN条件と比較すると、公開された結果と一致している (Liu B、Itoh H、Louie O、Kubota K、およびKent KC. The signaling protein rho is necessary for vascular smooth muscle migration and survival but not for proliferation. Surgery. 2002; 132 (2) : 317~25; Pintucci G、Saunders PC、Gulkarov I、Sharony R、Kadian-Dodov D、Bohmann K、Baumann FG、Galloway AC、およびMignatti P. Anti-proliferative and anti-inflammatory effects of topical mapk inhibition in arterialized vein grafts. Faseb J. 2006; 20 (2) : 398~400; Alcocer F、Whitley D、Salazar J、Jordan W、およびBland KI. Mutual exclusion of apoptosis and hsp70 in human vein intimal hyperplasia in vitro. J Surg Res. 2001; 96 (1) : 75~80; Igase M、Okura T、Kitami Y、およびHiwada K. Apoptosis and bcl-x<sub>s</sub> in the intimal thickening of balloon-injured carotid arteries. 1999; 96 (6) : 605~12; Kamenz J、Seibold W、Wohlfrom M、Hanke S、Heise N、Lenz C、およびHanke H. Incidence of intimal proliferation and apoptosis following balloon angioplasty in an atherosclerotic rabbit model. Cardiovasc Res. 2000; 45 (3) : 766~76; およびWang GJ、Sui XX、Simosa HF、Jain MK、Altieri DC、およびConte MS. Regulation of vein graft hyperplasia by survivin, an inhibitor of apoptosis protein. Arterioscler Thromb Vasc Biol. 2005; 25 (10) : 2081~7)。しかし、VEN、cART、およびwART群に対し、ART灌流されたPIJVでの増殖の減少は、いくつかの公開されたデータとは一致していなかった (Nishibe T、Miyazaki K、Kudo F、Flores J、Nagato M、Kumada T、およびYasuda K. Induction of angiot

ensin converting enzyme in neointima after intravascular stent placement. *Int Angiol.* 2002; 21 (3) : 250~5; Predel HG、Yang Z、von Segesser L、Turina M、Buhler FR、および Lüscher TF. Implications of pulsatile stretch on growth of saphenous vein and mammary artery smooth muscle. *Lancet.* 1992; 340 (8824) : 878~9、および Dethlefsen SM、Shepro D、および D'Amore PA. Comparison of the effects of mechanical stimulation on venous and arterial smooth muscle cells in vitro. *J Vasc Res.* 1996; 33 (5) : 405~13)。しかし Liu らは、動脈血行動態に起因する機械的延伸が細胞死を引き起こし、それがおそらくは後続の細胞増殖を媒介することを示唆した (Liu B、Itoh H、Louie O、Kubota K、および Kent KC. The signaling protein rho is necessary for vascular smooth muscle migration and survival but not for proliferation. *Surgery.* 2002; 132 (2) : 317~25)。この論文で研究された短期の時点は、ART 灌流した PIJV でのアポトーシスの初期増加後の増殖が上昇するのがわかるように十分長いものではなかった。

#### 【0161】

この章のいくつかの制限に留意すべきである。Live/Dead (商標) アッセイは、生細胞および組織中のネクローシスを評価するのに広く使用されているが、ほぼ間違いなく、本発明者らの適用例に理想的には適していなかった。これは、血管組織の厚みを通して試薬が拡散することのできる、限られた距離に起因する。染色は、静脈壁の内膜および外膜層で主に生じるが、培地はシグナルが非常に不十分であることが観察された。ポリマーラップと静脈壁との間の接触領域 (すなわち、外膜) で、ならびにマンドレルと静脈壁との接触領域 (すなわち、管腔) で、エレクトロスピンングプロセスの悪影響が生じた可能性があったことは確かである。Live/Dead (商標) アッセイは、これらの領域の両方で十分作用したように見え、対照組織と比較した場合、ネクローシスのレベルに目に見える上昇は示されなかった。さらに、血管運動性チャレンジデータは、スピニングされた PIJV が、見せかけの対照と同じ強度で接触できたことを示し、組織の中間層を含む SMC の生存度が実証された。最後に、本発明者らは、見せかけのおよびスピニングされた PIJV の血管運動性応答と、基準ライン対照の応答—すなわち、新しく切除された PIJV セグメントとを、観念的に比較した。しかし、本発明者らは動物あたり 2 つの PIJV セグメントしか得ることができなかったもので、即座に行われる試験に向けて PIJV の第 3 のセグメントを得ることは、実現不可能であった。本発明者らは、エレクトロスピンングのみに関連付けられた相違を評価しようとしたので、本発明者らは、基準ライン対照よりも見せかけの対照を選択したことが許容可能であったと感じる。

#### 【0162】

##### 結論

本発明者らはここで、生存度または機能を損なうことなく、調整可能なポリマーラップを静脈セグメントに適用することができることを示し、ある潜在的な適用例；すなわち、動脈レベルの圧力に曝されたラッピングされた静脈で、中間壁 CWS を徐々に課することを実証した。突然曝すのではなく、動脈レベルの CWS を徐々に課することは、AVG の過形成応答を低減させる重要な新しい手段とすることができ、それどころか安全な動脈化を促進させることができる。

#### 【0163】

医薬品または細胞のいずれかを外膜ポリマーラップに組み込むことは、可能性のある将来の適用例を示し、AVG の開存度をさらに向上させることができる。本発明者らの知る

限り、生分解性AVGラップ／シースを介した細胞支持の制御された送達は、これまで報告されておらず、したがって、外膜ラップというこの可能性のある将来の適用例は、新規であると考えられる。この報告で使用されたポリマーは特徴付けられており、生存可能なSMCに首尾よく微細統合され、それ自体がこの可能性のある将来の適用例に供されると考えられる。

#### 【実施例4】

##### 【0164】

##### In Vivo動脈性静脈移植

8つ(n=8)の「概念実証」頸動脈間置静脈グラフト実験を行った。本発明者らは、前臨床モデルにおいて、頸動脈間置グラフトとして移植された静脈セグメントの急性および慢性過形成応答に対する、エレクトロスピンニングされたPEUU外膜ラップの穏やかな作用を評価しようとした。このため、本発明者らは、ブタに関して片側性自家頸動脈間置グラフトプロトコルを使用した。ブタを2つの群に、すなわち：「スピニング」されたAVG群と「見せかけの対照」のAVG群とに分けた。各動物は、それ自体の静脈グラフトドナーとして働いた。手短に言うと、PIJVを、実施例2で述べたように収集し、そこに記述されたエレクトロスピンニングプロセスを使用してその実施例で記述されたものと同じラップ組成および厚さでスピニングし、または見せかけの対照として示した。この場合も、エレクトロスピンニングされたポリマーラップがない見せかけのPIJVセグメントでは、本発明者らは、ポリマーラップを実際に配置する点までエレクトロスピンニングプロセスを模倣した(すなわち、マンドレルの挿入を含み、電界内で静脈を回転し／並進移動させる)。次いでAVGを、頸動脈間置グラフトとして(以下に記述されるように)30日間(または不可逆的な合併症が観察されるまで)、すなわち見せかけの対照群においてIHが非常に明らかにされるよう十分な移植期間移植し(Angelini GD、Bryan AJ、Williams HM、Morgan R、およびNewby AC. Distention promotes platelet and leukocyte adhesion and reduces short-term patency in pig arteriovenous bypass grafts. J Thorac Cardiovasc Surg. 1990;99(3):433~9; Vijayan V、Shukla N、Johnson JL、Gadsdon P、Angelini GD、Smith FC、Baird R、およびJeremy JY. Long-term reduction of medial and intimal thickening in porcine saphenous vein grafts with a polyglactin biodegradable external sheath. J Vasc Surg. 2004;40(5):1011~9; およびJeremy JY、Dashwood MR、Timm M、Izzat MB、Mehta D、Bryan AJ、およびAngelini GD. Nitric oxide synthase and adenylyl and guanylyl cyclase activity in porcine interposition vein grafts. Ann Thorac Surg. 1997;63(2):470~6)、スピニングされた群と比較した。血管造影を介して開存度を評価することに加え、外植したAVGを、IHの組織学的評価のために処理した。in vivo研究の定量エンドポイントは、その性質が厳密に組織学的なものであったことにどうか留意されたい。

##### 【0165】

##### 方法

##### 片側性ブタ頸動脈間置移植

動物を、実験日の7~10日前に施設に入れ、手術前にNPOで12時間維持した。手術の前に、動物にアセプロマジン0.15mg/kg 1Mおよびケタミン15.0mg/kg、1Mの組み合わせで麻酔をし、挿管し、イソフルラン(酸素中1~3%)で外科的麻酔レベルに維持した。各動物を剃毛し、処置に備えた後、動物を手術着内に移動し、

陽圧換気上に配置し、監視装置（ECG）を取り付けた。パルスオキシメトリーおよび血圧を外科処置の全体を通して監視した。麻酔誘導の後、無菌手術を行った。

#### 【0166】

片側性頸部切開を行って、総頸動脈を露出させた。次いで動物をヘパリン化し（300 U I / K g）、非外傷性血管鉗子を使用して動脈の近位および遠位を鉗子で留めた。鉗子間のセグメントを切り出した（約6 cm）。各ブタは、それ自体のグラフトドナーとして働いた。新たな片側性 I J V の採取を、上述のようにブタで行った。次いで採取された I J V をスピニングし（上述のように、および S t a n k u s ら、[47] に記載されるように）、または見せかけの対照として示した。次いで、静脈セグメントを、断続7-0 プロレン縫合を使用して片側性頸動脈間置グラフト（端-端）として移植した。

10

#### 【0167】

術後に、動物を回復させ、集中治療ユニット内に収容した。外科処置および吸入麻酔の中断後、嚥下反射および防御的咳反射が機能していることが示されたら、動物から抜管した。動物を、24時間連続して監視し、以下のパラメータ、すなわち：脈拍数、脈拍強度、毛細血管再充填時間、呼吸数、尿量、および排便を毎時間記録した。体温を測定し、2時間毎に記録した。動物を温かく乾燥した状態に維持して、低体温症を予防した。ブプレノルフィン塩酸塩（0.005~0.01 mg / k g、I M、q 12 h）を、疼痛用に一定の間隔で4日間投与し、疼痛の兆候が示された場合には疼痛管理のために継続して投与した。動物における急性疼痛は、防御、発声、切断、情動不安、普通ではない長時間の横臥、抑鬱（動く気がなくまたは起きることが難しい）、または異常な外観（頭が下がり、押し込まれた腹部、猫背）によって表される。皮膚のステープル／縫合は、術後10日で除去した。全ての動物は、獣医師、登録獣医技術者、および動物介護士の訓練を受けたスタッフによって毎日監視した。

20

#### 【0168】

抗凝固レジメンを、血栓を介した急性 A V G 機能不全に立ち向かうのに使用した。アスピリン（325 mg / 日）およびプラビックス（75 mg / 日）の経口用量を、共に手術の3日前から開始した。アスピリンは、術後の30日間全てにわたり毎日投与し、プラビックスは、術後14日間だけ毎日投与した。

#### 【0169】

30日間の生存期間の後（または不可逆的な合併症が観察された後）、動物を安楽死させた。ブタに、アセプロマジン0.15 mg / k g I M、およびケタミン30.0 mg / k g I M の組合せで深く麻酔をかけ、次いで心停止が誘導されるように過剰用量の静脈内塩化カリウムを注射することによって、動物を安楽死させた。バイタルサインを、確認のためモニタリングした。

30

#### 【0170】

##### 蛍光透視血管造影

安楽死の後およびグラフト外植の直前に、蛍光透視血管造影を行ってグラフト開存度を評価した。頸動脈を、近位グラフト吻合の上流約3 cmを鉗子で留め、造影剤を、鉗子のすぐ遠位側の頸動脈中に注入した。血管造影図を記録して（Model OEC 9800 Plus、General Electric Inc.）、グラフトセグメント全体を通した流れを確認した。流れがグラフトを通して確立できない場合（すなわち、閉塞により）、血管造影は行わなかった。

40

#### 【0171】

##### 外植後組織処理

グラフトを抽出し、組織の1/2を、4%パラホルムアルデヒド中で即座に固定し、以下に記述されるように組織学的に分析した。組織の残り1/2を、上記セクションで記述したようにSEM分析用の超高純度2.5%グルタルアルデヒド中に固定した。

#### 【0172】

##### I H の組織学的測定

形態分析を、外植グラフトの中央領域から得られた切片で行った。標準的なM o v a t

50

のペンタクローム染色技術を使用して、内膜および中膜の厚さを測定した。内膜対中膜厚比を、これらの測定値から計算した。測定を4視野から行い、平均化して、各AVG切片に関する単一の値を得た。

#### 【0173】

##### 走査型電子顕微鏡法

上述と同じ手順を使用して、*in vivo*実験から得られた外植AVGを処理しかつ撮像した。

#### 【0174】

##### 統計

非対応スチューデントt検定を、内膜対中膜厚比のデータに関して行った。 $P < 0.05$ は統計的に有意であると見なした。他に指示されない限り、データは、平均±平均の標準誤差として示される。

#### 【0175】

##### 結果

外膜ポリマーラップは、動脈圧下で自然の静脈の場合と矛盾のないある直径でAVGを維持するという、すぐに明らかにされる効果を発揮した(図27の中央および右側を比較)。さらに、ラッピングされたAVGは、自然の頸動脈に類似した拍動性の半径方向偏移(すなわち、コンプライアンス)を示し、逸れに対してラッピングされていないAVGは、検出可能な拍動のない堅いチューブのように見えた。すなわち、対照グラフトを通して流れを確立する際に、自然の頸動脈およびスピニングされた静脈とは異なって、見せかけの対照静脈は、拍動性の圧力に応答して直径が変化しなかったことが観察された。

#### 【0176】

行われた8回の*in vivo*実験のうち、わずか1回の実験が、完全に成功した。すなわち、スピニングされたおよび見せかけの両方のブタ由来のAVGは、30日後に100%の開存度であった。これらのAVG血管造影画像は、図28に見ることができる。実験の残りは、下記の3つの理由のうちの1つにより首尾よく行われなかったと見なされ、その理由とは：1) IHまたは血栓に起因した、スピニングされたおよび見せかけのAVGの一方または両方の部分的な閉塞；2) スピニングされた群の1匹の動物の死亡をもたらす、術後の合併症；および3) 術後1週間で、スピニングされた群の1匹の動物を安楽死させる必要性をもたらした感染症である。しかし、2つの開存性AVGおよび部分的にのみ閉塞したAVGについて(見せかけ、 $N = 6$ ；スピニングされたもの、 $N = 4$ )、本発明者らは形態測定を行って、2つの群の間の比較のためにIHの発症を評価した。形態分析で使用されたMovatのペンタクローム染色の代表的な画像を、図29に示すが、これはサンプル測定も示している。定量化された結果を図30に見ることができる。スピニングされた群対見せかけの対照群の、内膜対中膜比の間には、統計的な有意性への傾向のみ存在するように見える。

#### 【0177】

AVGのSEM画像を、1つの完全に首尾よく行われた実験から(図31Aおよび31B)、ならびにAVGが完全には閉塞しなかった別の実験から(図31Cおよび31D)から撮影した。縫合線により明らかにされる静脈グラフトと動脈との間の吻合界面を、各画像に見ることができる。

#### 【0178】

##### 考察

本発明者らは、スピニングされた群と見せかけの群との間の内膜対中膜厚比の統計的有意差への傾向のみ観察したが、この差は、実験数が増加した場合に統計的に有意になると考えられる。定量化された形態学的結果ならびに定性SEMの結果は、エレクトロスピニングされた生分解性ポリマーラップがAVGに対して好ましい効果を発揮することが示唆される。しかし、これらの効果が実際に一貫して有益か否かを決定するには、さらなる調査が必要である。機械的病理生物学的データに関連した固有のばらつきに加え、様々な経験を有する3名の外科医が手術を行うことによって、本発明者らの結果にばらつきが導

入された。正常な1層状態のAVG（見せかけの群）の代わりに2層状態のAVG（スピニングされた群）を使用して吻合を生成したことに関連して、「学習曲線」が存在することも事実である。任意の新しい外科処置法と同様に、手術を行う外科医の快適度が上昇するにつれ、手術の成功率が結果的に上昇する。

#### 【0179】

上述の、AVG IHが低減されるように外部シースを使用することを試みた以前の研究は、様々な動物モデルにおけるAVGへの機械的（この文献で記述された）および生化学的支持を送達することに焦点を当てた。これらの以前の手法の臨床解釈は、2つの主要な制限に起因して実現されなかった。具体的には、それらは全て、緩いフィッティング／生分解性または緩いフィッティング／生物耐久性のシースのいずれかを使用した。この研究では、本発明者らは、緊密なフィッティングおよび生分解性ポリマーでAVGを安全に「ラップ」する手段を開発することによって、これらの制限に対処しようとした。

#### 【0180】

本明細書に示される研究に対して制限が存在する。見せかけの対照がスピニングされたAVG（すなわち、同じブタ由来の）に対応していないという事実は、この研究における統計的検出力を低下させる。しかし、使用された、対応していない実験デザインは、動物における術後合併症を回避するために、必要であると見なされた。本発明者らは、脳からの静脈血液の戻りが過剰に変化しないように、両側性ではなく片側性手術を行うことがより安全であると感じた。別の制限は、処置を行った外科医の様々な経験から生じる。この結果は、AVGの開存度が増す場合には、より統計的に有意になると考えられるようである。処置が、最も経験のある外科医によって全て行われた場合、エレクトロスピニングされた生分解性ポリマーラップは、見せかけの対照に比べ、AVGでのIHを有意に減少させることができる。第3の制限は、30日という移植持続時間が短すぎたことである。より長い実験、おそらく6カ月程度に長い期間の実験が、AVG IHを低減させる際の本発明者らの手法の効力が経時的に持続されるか否かを決定するのに必要である。

#### 【0181】

次に図32を参照すると、本発明の管状グラフトデバイスの側断面図が示されており、このデバイスは、このデバイスの長さの少なくとも一部に沿ってその厚さが変化する、周囲を取り囲む繊維マトリックスを有する管状部材を含む。デバイス100は、管状部材140、典型的には患者から採取された欠陥グラフトを含む。代替の実施形態では、管状部材140は、Dacron、PTFE、もしくはePTFEチューブなどの人工グラフト、または当業者に周知のその他の管状材料であってもよい。管状材料140は、繊維マトリックス120に類似したまたは異なる材料のポリマーを含み、またはNitinol、ステンレス鋼、エルジロイ、タンタル、MP35N、もしくは様々なその他の生体適合性金属などの金属、またはマグネシウムなどの再吸収金属、または上述のような異なる材料の組合せを含む、固体の、編み組まれた、編み上げられた、または巻き上げられた材料のチューブまたはコイルなどの、編組構造を含んでいてもよい。管状部材140は、その近位端、すなわち第1の端部101から、その遠位端、すなわち第2の端部102まで、管腔150を含む。周囲を取り囲む管状部材140は、第1の長手部分120aおよび第2の長手部分120bを含む繊維マトリックスである。

#### 【0182】

図32に示されるように、部分120aの近位端101は、デバイス100の中間の部分120bよりも厚い壁を有し、これは、繊維堆積プロセス（例えば、エレクトロスピニングプロセス）中に、部分120により多くの繊維を付着させることによって実現することができる。端部120に近い部分120cは、部分120aに近い厚さを有する壁のように、より厚い壁を有していてもよい。連続テープが、第1の端部101からデバイス100の中間点へと設けられており、これは中間点から第2の端部102に向かって対称的に反転した状態になっている。あるいは、ステップ状の壁厚の変化を用いることもできる。デバイス100の長さに沿った可変壁厚は、多数の機能を提供するのに役立つことができる。より厚い部分120aおよび120cは、第1の端部101と患者の大動脈との

間、および第2の端部102と患者の閉塞動脈の遠位点との間にある、縫合または鉗子ベースの端側吻合などの吻合を支持するために、より良好な強度および／または引裂抵抗をもたらしてもよい。部分120bの、より薄い壁は、血管グラフトが動脈圧下で特定の速度で拡張するよう調整された半径方向の力など、小さな半径方向の力をもたらすように構成されていてもよい。部分120a、120b、および120cの壁厚のばらつきは、特定の流れ条件が生成されるように、移植されたときにデバイス100の様々な曲線をなす幾何形状が支持されるように、座屈が防止されるように、かつその他の機能が提供されるように、構成することができる。

#### 【0183】

あるいは、またはさらに、部分120a、部分120b、および／または部分120cは、異なる繊維サイズ、異なるマトリックス多孔度、およびその他の構造の相違など、追加の構造またはマンドレルの相違（すなわち、厚さとは異なる）を有していてもよい。あるいは、またはさらに、部分120a、120b、および／または120cは、異なる引裂強さ、歪み抵抗、または生分解特性などの異なる機械的性質を有する材料など、1種または複数の異なる材料で構成されていてもよい。あるいは、またはさらに、ある部分は医薬品薬物または細胞ベースの薬剤などの薬剤を含んでいてもよく、またはある部分は第1の薬剤を含んでいてもよくかつ別の部分は第2の異なる薬剤を含む。

#### 【0184】

次に図33aおよび33bを参照すると、本発明の管状グラフトデバイスの側断面図および端面図がそれぞれ示されており、これらの図には、このデバイスの少なくとも一部に沿って、その円周に沿って厚さが変化する、周囲を取り囲む繊維マトリックスを有する管状部材が含まれる。デバイス100'は、管状部材140を含み、典型的には患者から採取された血管グラフトまたは上述のような人工グラフトを含む。管状部材140は、その近位端である第1の端部101からその遠位端である第2の端部102まで、管腔150を含む。周囲を取り囲む管状部材140は、上部120dおよび底部120eを含む繊維マトリックスである。

#### 【0185】

図33aおよび33bに示されるように、円周の上部120dは底部120eよりも厚い壁を有し、これは繊維堆積プロセス（例えば、エレクトロスピンニングプロセス）中に、部分120dにより多くの繊維を付着させることによって実現することができる。デバイス100'の長さに沿ってばらつきのある壁厚は、好ましくはデバイス100'の円周に沿った連続的テーパであり、多数の臨床的および／または機械的機能を発揮するのに役立てることができる。部分120dおよび120eの壁厚のばらつきは、特定の流れ条件が生成されるように、デバイス100'の様々な曲線をなす幾何形状が支持されるように、座屈が防止されるように、好ましい拡張幾何形状が生成されるように、かつその他の機能が発揮されるように、構成することができる。

#### 【0186】

あるいは、またはさらに、部分120dおよび部分120eは、異なる繊維サイズ、異なるマトリックス多孔度、およびその他の構造の相違など、追加の構造の相違（すなわち、厚さとは異なる）を有していてもよい。あるいは、またはさらに、部分120dおよび部分120eは、異なる引裂強さ、歪み抵抗、または生分解特性などの異なる機械的性質を有する材料など、1種または複数の異なる材料で構成されていてもよい。あるいは、またはさらに、ある部分は医薬品薬物または細胞ベースの薬剤などの薬剤を含んでいてもよく、またはある部分は第1の薬剤を含んでいてもよくかつ別の部分は第2の異なる薬剤を含む。

#### 【0187】

次に図34を参照すると、本発明の管状グラフトデバイスの側断面図が示されており、このデバイスの長さの少なくとも一部に沿って性質が変化する、周囲を取り囲む繊維マトリックスを有する、管状部材が含まれている。デバイス100''は、管状部材140、典型的には患者から採取された血管グラフトを含む。代替の実施形態では、管状部材140

は、人工グラフトまたは上述のようなその他の管状材料であってもよい。管状部材 140 は、その近位端である第 1 の端部 101 からその遠位端である第 2 の端部 102 まで、管腔 150 を含む。周囲を取り囲む管状部材 140 は、第 1 の長手部分 120 f、第 2 の長手部分 120 g、および第 3 の長手部分 120 h を含む繊維マトリックスである。

#### 【0188】

第 1 の端部 101 に近い部分 120 f は、デバイス 100 ” の中間点にある部分 120 g とは異なる構造のものである。部分 120 g は、部分 120 h とは異なる構造のものである。あるいは、デバイス 100 ” は、異なる構造の 4 つ以上のセクションを含んでいてもよい。各部分の構造は、構成方法および幾何形状ならびに使用される繊維材料を含めた数多くの方法で変化してもよい。デバイス 100 ” の長さに沿って変化する材料の性質は、上述のような多数の機能を発揮させるのに役立てることができる。デバイス 100 ” において、部分 120 f、120 g、および 120 h はそれぞれが個々に、類似した構造幾何形状、方法、および材料を有する均質な管状セクションを含む。代替の実施形態では、構造幾何形状、方法、および／または材料の連続的変化が、第 1 の端部 101 から第 2 の端部 102 まで存在する。別の代替の実施形態では、デバイス 100 ” は、連続的に変化する部分と、切り離された均質部分とを含む。

#### 【0189】

次に図 35 を参照すると、本発明の管状グラフトデバイスの側断面図が示されており、このデバイスには、繊維マトリックスと第 2 の足場構造との両方により取り囲まれた管状部材が含まれている。デバイス 100 ' ' ' は、管状部材 140、典型的には患者から採取された血管グラフトを含む。代替の実施形態では、管状部材 140 は、人工グラフトまたは上述のようなその他の管状材料であってもよい。管状部材 140 は、その近位端である第 1 の端部 101 からその遠位端である第 2 の端部 102 まで、管腔 150 を含む。周囲を取り囲む管状部材 140 は、上記にて詳述されるような繊維マトリックス 120 である。繊維マトリックス 120 は：少なくとも均質な部分；少なくとも 2 つの異なる均質な部分；および少なくとも連続的に変化する性質を有する部分の、1 つまたは複数を含む。周囲を取り囲む繊維マトリックス 120 は、当業者に周知の、好ましくはステント状構造の足場 130 である。代替の実施形態では、足場 130 は、繊維マトリックスの付着中に管状部材が保護されるように（例えば、ポリマー溶液中の溶媒、ポリマー溶融体に送達される熱などから保護されるように）、かつ／またはその他の機能が発揮されるように、管状部材 140 と繊維マトリックス 120 との間に位置付けられる。

#### 【0190】

足場 130 は、ステンレス鋼および Nitinol を含む生体適合性金属、または 1 種もしくは複数のポリマーの組合せなどの生体適合性プラスチックなどの、生体適合性材料で構成される。足場 130 は、繊維マトリックス 120 に類似したまたは異なる速度で生分解する材料などの、生分解性材料で構成されてもよい。繊維マトリックス 120 は生分解性構造であってもよく、足場 130 は永続的な構造であって、最初に移植されたときに第 1 の大きさと管状部材 140 に半径方向の支持力を提供するようになされており、生分解期間が経過すると共に低下し、しかし移植の寿命の間は第 1 の大きさよりも小さい第 2 の大きさと力を提供するようになされている。足場 130 は、均質な半径方向の支持力をもたらしてもよく、またはこの力は、足場 130 の 1 つまたは複数の端部近くにより大きな半径方向の力を提供することなどによって、その長さに沿って変化してもよい。足場 130 は、自己拡張または収縮に向けて弾力的にバイアスがかけられていてもよく；管状部材 140 の周りに適切に適合するように拡張されまたは圧縮されるように、可塑的に変形可能であってもよく；または弾力的にバイアスがかけられた（例えば、自己拡張または収縮）、可塑的に変形可能な部分を含んでいてもよい。足場 130 は、デバイス 100 ' ' ' の中間部分に提供された半径方向の力よりも大きな半径方向の力を提供する各端部に近い部分など、上述の図 32 から 34 までのデバイスの繊維マトリックス 120 を参照しながら記述されたようにその長さまたは円周に沿って 1 つまたは複数の異なる部分を含んでいてもよい。好ましい実施形態では、足場 130 によって提供された半径方向の支持力は

、足場 130 の長さに沿って変化する。足場 130 は、コイル巻き、編組み、編上げ、またはその他の製作方法を使用した織物構造または不織構造など、メッシュ構造のものであってもよい。足場 130 は、膜または被膜堆積の技法を使用して構成されてもよく、その後、針穿孔、レーザー切断、凍結乾燥、熱誘導型相分離、エレクトロポレーション、および／または塩浸出を介するなどして多孔度をもたらしように処理されてもよい。足場 130 は、事前に決定された多孔度および／孔径で製造されてもよく、異方的性質を示してもよい。2 層のまたはラミネート構造として図 35 に示されるが、足場 130 および繊維マトリックス 120 は、単層または複合体構造を含んでいてもよい。複合体構造は、機械的に撚り合わせ、一緒に溶融し、またはその他の方法で同じ層に存在させた足場 130 および繊維マトリックス 120 によって形成することができる。足場 130 は、デバイス 100' ' ' に固着メカニズムを提供してもよい。一実施形態では、上述のように、足場 130 が管状部材 140 と繊維マトリックス 120 との間に配置される。堆積された繊維マトリックス 120 は、足場 130 および繊維マトリックス 120 の構造材料が類似している場合など（例えば、溶媒結合のため）、足場 130 と共に溶媒結合メカニズムをもたらしてもよい。あるいは、またはさらに、堆積された繊維マトリックス 120 は、足場 130 が低融着点を有する熱可塑性ポリマーである場合および足場 130 が繊維マトリックス付着中に繊維マトリックス 120 の加熱ポリマーに接触したときに融解する場合など、足場 130 と共に温度結合メカニズムをもたらしてもよい。

#### 【0191】

あるいは、足場 130 は、管状部材 140 または繊維マトリックス 120 が付着された管状部材 140 を、取着された柔軟性カバーをもたらし液体溶液中に浸漬することによって実現された、浸漬カバーなどの柔軟性カバーであってもよい。管腔 150 は、管状部材 140 の内部がカバーされないように、浸漬プロセス中に充填および／またはカバーされてもよく、または 140 の内部は柔軟性カバーを含んでいてもよい。柔軟性カバーは、高い半径方向の支持、または機械的損傷もしくは汚染からのデバイス 100' ' ' の保護など、1 つまたは複数の機能を発揮するのに使用されてもよい。柔軟性カバーは、生分解性であってもよく、経時的に放出されるよう構成された 1 種または複数の薬剤を含んでいてもよい。足場 130 は、浸漬カバーならびに図 35 のステント状構造を含んでいてもよい。

#### 【0192】

あるいは、足場 130 は、管状部材 140 または繊維マトリックス 120 が付着された管状部材 140 の周りで拡張し配置され、次いで解放されて固定を引き起こす、人工グラフト材料などの人工グラフト材料であってもよい。人工グラフトは、Darc on、PTFE、ePTFE チューブなどの生体適合性材料、または当業者に周知のその他のグラフト材料で構成される。人工グラフトカバーは、高い半径方向の支持、または機械的損傷もしくは汚染からのデバイス 100' ' ' の保護など、1 つまたは複数の機能を発揮させるのに使用してもよい。人工グラフトは生分解性であってもよく、経時的に放出されるよう構成された 1 種または複数の薬剤を含んでいてもよい。足場 130 は、人工グラフトならびに図 35 のステント状構造および／または上述の浸漬カバーを含んでいてもよい。

#### 【0193】

次に図 36 を参照すると、本発明の管状グラフトデバイスを製造する方法の一実施形態のフローチャートが示されており、患者評価手順を行うステップと、患者評価から得られたデータに基づいて管状部材に繊維マトリックスを付着させるステップとが含まれる。ステップ 200 は、1 つまたは複数の患者評価手順の実行を含む。患者評価手順は、年齢；性別；人種；血圧；血液検査情報；家族歴情報；ストレス試験データ；およびこれらの組合せに関する情報を含む、医院またはその他の医療設備で行われた評価を含むことができる。評価は、1 つまたは複数の試験または侵襲的な患者治療の間に行われるその他の手順を含んでいてもよく、例えば介入検査室または手術室で行われる評価など、例えば血管造影手順または管状グラフトデバイス移植手順などを含んでいてもよい。好ましい実施形態では、伏在静脈などの血管を採取し、1 つまたは複数の観察またはその他の試験（例えば

、直径または血管壁の測定などのサイズ決め；または血管の弾性試験などの機械的性質試験）を行って、患者から採取された血管に関するデータを得る。

#### 【0194】

ステップ210では、伏在静脈の一部などの血管を、患者から採取する。ステップ210は、ステップ200の間に、ステップ200と同時に、またはステップ200の後に、例えばステップ200が採取された血管の分析を含む場合などには行うことができる。代替の実施形態では、ステップ210は、編み組まれまたは押し出された材料で構成された細長いチューブなどの人工グラフトの製作を含む。採取された血管は、静脈または動脈を含んでいてもよく、適用可能なヒトまたはその他の動物ドナーなど、管状グラフトデバイスまたは代用物を受容した患者から採取されてもよい。

10

#### 【0195】

ステップ220では、ステップ200で得られたデータに基づいて、繊維マトリックスを、採取された血管または本発明のその他の管状部材に付着させる。繊維マトリックスの付着は、管状グラフトデバイスが曲線をなす形状で配置されるような場合など、管状グラフトデバイスが移植される解剖学的位置に応じて変えてもよい。採取された血管の1つまたは複数の性質は、採取された血管の弱くなった部分を強化し、または血管の幾何形状もしくは構造特性をその他の方法で順応させるなどのため、繊維マトリックスの構成を決定してもよい。患者のパラメータにより最適化されまたはその他の方法で決定される繊維マトリックスの構成は、限定するものではないが：一定のまたは可変の厚さなどの繊維マトリックス形状；繊維マトリックスの材料または材料の組合せ；繊維マトリックスの半径方向および／または円周方向および／または軸方向の強度；繊維マトリックスの半径方向および／または円周方向および／または軸方向の剛性；繊維マトリックスの曲げ剛性；繊維マトリックスの弾性および／または粘弾性；繊維直径分布；繊維分解速度；繊維マトリックス分解速度、繊維マトリックス拡散特性、繊維マトリックス湿潤性；およびこれらの組合せを含んでいてもよい。

20

#### 【0196】

患者評価に基づく最適化の非限定的な例として、ある実施形態では、繊維マトリックスの厚さを調整して、下にある血管（例えば、下にある静脈）の機械的強化を順応させまたは修正する。すなわち、繊維マトリックスの堆積厚は、この実施例ではラプラスの法則に従いカスタマイズすることにより、患者の静脈評価に基づいて安定化して強化された下にある血管が得られる。一般に、より大きな静脈は、同様のレベルの機械的強化を得るために、より小さい静脈よりもより厚い繊維マトリックスの壁厚を必要とする。血管または静脈サイズに基づいて機械的強化を補償しまたは修正するには、繊維マトリックスの堆積をカスタマイズすることができる。

30

#### 【0197】

例えば、マンドレル（すなわち、繊維マトリックス堆積中の血管保持ツール）のサイズは、採取された静脈または選択された管状血管に実質的に一致しまたは順応する、管状血管または静脈の内部管腔内に嵌合したオスサイジングツールを使用して、選択することができる。下にある血管がマンドレル上に配置されたら、血管の外径を、サイズが特定されたいくつかの穴を有する滅菌されたクレジットカードサイズのシートなど、メスサイジングツールを使用して測定することができる。この測定、または患者評価は単一プロセスで行うことができ、または測定は、可変性を考慮するのを助けるため、血管の長さの端から端までの数個の測定値の平均を使用して行うことができる。その他の実施形態では、測定値を血管の全長に沿ってマッピングして、長さに沿ったそれぞれの位置での望ましい厚さがわかるようにすることができる。

40

#### 【0198】

管状血管または静脈の目標サイズが定められたら、可塑性変形を経験することなくその下にある管状血管または静脈の管腔加圧（静的および／または動的）および幾何学的構成（静的および／または動的）を支持するために、管状繊維マトリックスによって耐えられるように必要とされる材料の引張り強さ／張力レベル（2つの円筒方向のそれぞれに関し

50

て)を評価することによって、繊維マトリックス堆積の所望の厚さ(おそらくは、管状血管または静脈の各軸方向の位置に合わせてカスタマイズされている)を決定することができる。実施形態では、必要とされる材料の引張り強さ／張力のレベルは、所望の安全係数によって過大評価されることになる。

#### 【0199】

繊維マトリックスの機械的要件をカスタマイズするのに使用される方法の非限定的な例は、材料の、必要とされる円周方向の強度に基づいており、これは、管状繊維マトリックスの軸方向の長さの単位当たりの引張り円周方向力と定義される。それぞれの特定の材料の強度は、その厚さに比例しており、材料の異なる厚さに関して引張り試験装置を使用して実験により特徴付けることができる。

10

#### 【0200】

管状繊維マトリックスに必要とされる円周方向の強度(したがって、その厚さ)を計算する方法の非限定的な例は、ラプラスの法則であり、加圧された薄い壁の円筒状導管の円周方向の張力( $\sigma$ )(すなわち、管状繊維マトリックス断面積の単位当たりの引張り円周方向力として定義される)を、下式に従い推定するものである： $\sigma = P r / h$ (式中、 $P$ は、血管壁に作用する血管内の圧力であり、 $r$ は、血管の内径半径であり、 $h$ は、血管の壁厚である(血管の外径－内径))。

#### 【0201】

上記実施例では、内径血管測定、外径血管測定、ラプラスの法則を介して得られた円周方向の張力を安全に支持するのに必要とされる強度のレベル、および実験的測定を介して得られた特定の材料強度とその厚さとの間の関係の知識に基づいて、ポリマー流量またはその他の堆積変数を、カスタマイズされた機械的強度が実現されるように変化させることができる。患者評価に基づいて堆積条件を調整するこのプロセス(すなわち、内径および外径血管測定)は、熟練技術者によって、あるいは測定した厚さの入力後にコンピュータ／ソフトウェア制御によって自動的に、実現することができる。

20

#### 【0202】

繊維マトリックスの付着は、同時にまたは順次送達される、異なる機械的性質を有する2種以上の繊維など、多数のタイプの繊維の送達を含んでもよい。

次に図37を参照すると、本発明の管状グラフトデバイスを製造する方法の一実施形態のフローチャートが示されており、繊維マトリックスを管状部材に付着させる間に1つまたは複数のプロセス出力パラメータを監視するステップを含む。ステップ300は、上記にて詳述されたエレクトロスピンニングプロセスなど、繊維マトリックスの堆積中またはその他の付着中に、管状構造を保持するよう構成されたマンドレルなどのホルダ上に、採取した血管または人工グラフトなどの管状部材を配置するステップを含む。湿式スピニング；乾式スピニング；ゲルスピンニング；熔融スピニング；および繊維マトリックスを付着させるよう構成されたその他のプロセスを含むがこれらに限定されない数多くのプロセスを、エレクトロスピンニングプロセスの代わりにまたは追加として使用してもよい。

30

#### 【0203】

ステップ310では、繊維マトリックス付着プロセスを開始する。数多くのプロセス入力パラメータを、上記にて詳述されたように繊維マトリックス付着プロセスで使用する。好ましい実施形態では、典型的なおよび／または好ましいプロセス入力パラメータが、下記の表3の値から選択される。管状グラフトに対する材料付着デバイス(例えば、ノズル)の相対運動に関するプロセスパラメータは、材料付着デバイス、管状グラフト、またはその両方を動かすことによって実現されてもよい。

40

#### 【0204】

【表 3 - 1】

表 3

| システムパラメータ                                 | 典型的な値                        | 好ましい値                         |
|-------------------------------------------|------------------------------|-------------------------------|
| ノズルの並進速度<br>および周波数                        | 速度: 0から1m/秒、<br>周波数: 0から10Hz | 速度: 0から0.5m/秒、<br>周波数: 0から5Hz |
| ノズルの並進加速/<br>減速                           | 0から10m/秒 <sup>2</sup>        | 0から5m/秒 <sup>2</sup>          |
| ノズルの並進変位                                  | 0から0.5m(すなわち、<br>静脈の1mの長さ)   | 0から0.15m(すなわち、<br>静脈の0.3mの長さ) |
| ノズルの半径方向の<br>距離                           | 0.1から30cm                    | 0.5から15cm                     |
| マンドレルの回転<br>速度または指向的<br>振幅速度              | 0から1000RPM                   | 10から500RPM                    |
| E界/電荷/電圧<br>エミッタ(ノズル)                     | 電圧=0.1から30kV                 | 電圧=1から15kV                    |
| E界/電荷/<br>電圧ターゲット<br>(マンドレル)              | 電圧=-0.1から-30kV               | 電圧=-1から-15kV                  |
| ノズルとマンドレル<br>との間のE界<br>(例えば、繊維パスに<br>沿って) | 電圧=0.2から60kV                 | 電圧=2から30kV                    |
| 周囲温度                                      | 0から40℃                       | 4から37℃                        |
| 周囲湿度                                      | 0から100%                      | 30から80%                       |

【 0 2 0 5 】

10

20

30

40

【表 3 - 2】

| システム/パラメータ                | 典型的な値                                                                                                                                  | 好ましい値                                                                                                                                  |
|---------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 周囲ガス混合物                   | 空気;窒素;酸素;<br>不活性ガス;水分;<br>二酸化炭素                                                                                                        |                                                                                                                                        |
| マンドレル/<br>静脈温度            | 0から40℃                                                                                                                                 | 4から37℃                                                                                                                                 |
| 静脈管腔内体積                   | 0~50mL                                                                                                                                 | 0~50mL                                                                                                                                 |
| ポリマー溶液<br>および/または<br>流れ温度 | 20~50C                                                                                                                                 | 20~50C                                                                                                                                 |
| ポリマー候補                    | PCL; PCL-PLLA/PLA/PGA<br>PVDF-HFP; SIBS; シルク                                                                                           | PCL; PCL-PLLA/PLA/PGA<br>PVDF-HFP; SIBS; シルク                                                                                           |
| 溶媒候補                      | HFIP; DMSO; クロロ<br>ホルム; THF; DMF;<br>ジクロロメタン; DMAC;<br>ジオキサン; トルエン;<br>水; アセトン; メタノール;<br>プロパノール; エタノール;<br>臭化リチウム; 水性溶液<br>(アルカリ性/酸性) | HFIP; DMSO; クロロ<br>ホルム; THF; DMF;<br>ジクロロメタン; DMAC;<br>ジオキサン; トルエン;<br>水; アセトン; メタノール;<br>プロパノール; エタノール;<br>臭化リチウム; 水性溶液<br>(アルカリ性/酸性) |
| 溶液粘度                      | 0.001~1000cP                                                                                                                           | 0.001~1000cP                                                                                                                           |
| ポリマー溶液密度                  | 0.5~2g/cc                                                                                                                              | 0.5~2g/cc                                                                                                                              |
| ポリマー溶液濃度                  | 0.1~50%(重量/体積)                                                                                                                         | 0.1~50%(重量/体積)                                                                                                                         |
| ポリマー溶液流量                  | 0.01~5mL/分                                                                                                                             | 0.01~5mL/分                                                                                                                             |
| ポリマー溶液体積                  | 0.05~5mL                                                                                                                               | 0.05~5mL                                                                                                                               |

【0206】

10

20

30

40

【表 3 - 3】

| システムパラメータ                               | 典型的な値                   | 好ましい値                   |
|-----------------------------------------|-------------------------|-------------------------|
| 堆積したポリマー<br>(ラップ)の厚さ                    | 10~1000 $\mu\text{m}$   | 10~1000 $\mu\text{m}$   |
| ラップ多孔度                                  | 50~95%                  | 50~95%                  |
| ラップ孔径範囲                                 | 0.001~500 $\mu\text{m}$ | 0.001~500 $\mu\text{m}$ |
| ラップ孔径分布                                 | ガウス; 均一; 多峰性            | ガウス; 均一; 多峰性            |
| ラップ透過性<br>(水圧式; 酸素;<br>栄養素; および<br>細胞性) | 全て; 酸素/栄養素のみ;           | 全て; 酸素/栄養素のみ;           |
| 繊維サイズ範囲                                 | 0.1~250 $\mu\text{m}$   | 0.1~250 $\mu\text{m}$   |

## 【0207】

連続的に変化する性質を含む1つもしくは複数の部分を有する繊維マトリックス、および／または1つもしくは複数の均質な部分を有する繊維マトリックスを実現するプロセス入力パラメータなど、数多くのその他のプロセス入力パラメータを使用することができる。特定の実施形態では、繊維マトリックスは、少なくとも1つの均質な部分；少なくとも2つの異なる均質な部分；少なくとも連続的に変化する性質を有する部分；およびこれらの組合せを含む。

## 【0208】

ステップ310の間、1つまたは複数のプロセス出力パラメータを、付着中監視する。監視されたプロセス出力パラメータは、現行の管状グラフトデバイスの直径および／または厚さを典型的には含む。デバイス温度および／または室温などの温度、室内の湿度、堆積速度、堆積持続時間、溶媒濃度、粘度、電界強度、マンドレル回転速度、ノズル並進速度、ターゲットからのノズルの距離；およびこれらの組合せといった現行（実時間）の値からなる群から選択されたパラメータなど、数多くの出力パラメータを監視することができる。

## 【0209】

ステップ310の付着プロセス中に連続的に行われるステップ320では、監視された出力パラメータの比較を、この測定値と目標または特定の値、すなわち以下でプロセス目標値と呼ぶ値との間で行う。プロセス目標値は、1つもしくは複数のプロセスパラメータに関する、個別の値または好ましいおよび／もしくは許容される値の範囲であってもよい。1つまたは複数のプロセス出力パラメータが仕様外にあると決定された場合、ステップ325を行って、プロセス入力パラメータを調節する。調節されたプロセス入力パラメータは：デバイス温度および／または室温などの温度、湿度、堆積速度、堆積持続時間、溶媒濃度、粘度、電界強度、マンドレル回転速度、ノズル並進速度、ターゲットからのノズルの距離；およびこれらの組合せを含んでもよいが、これらに限定するものではない。代替の実施形態では、変化するプロセス入力パラメータは、堆積される材料への変化、

または堆積される材料の混合物の変化を含んでいてもよい。

【0210】

ステップ320で監視されるプロセス出力パラメータの全てが仕様の範囲内であると決定された場合、ステップ330を行って、プロセス完了チェックを行う。プロセスの完了は、所定のプロセス時間の完了、または1つもしくは複数のプロセスパラメータがその意図される目標（例えば、管状グラフトデバイスおよび／または付着された繊維マトリックスの所望の厚さ）に到達したことの確認など、1つまたは複数の方法で決定することができる。プロセスの完了が確認された場合、管状グラフトデバイスは移植の準備ができたことになる。プロセスの完了が確認されない場合、完了するまでステップ310および320を継続する。

10

【0211】

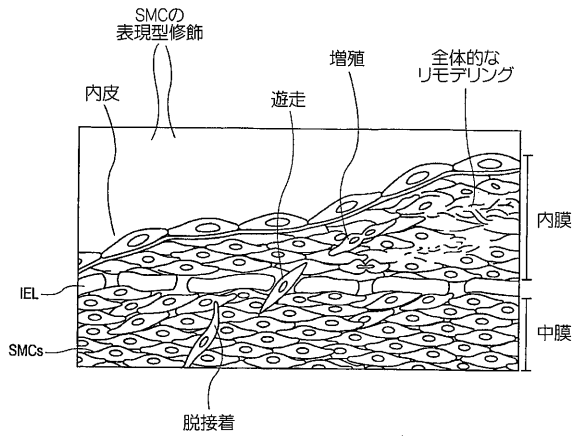
図37の方法は、管状グラフトデバイスおよび／または管状グラフトデバイスの構成要素の追加の分析をさらに含んでいてもよい。分析は、付着ステップを一時的に停止させ、おそらくは不完全な管状グラフトデバイスを保持デバイスから除去することを必要としてもよい。分析は、管状部材を保持デバイス上に配置する前に、または繊維付着堆積が完了した後に含まれてもよい。この分析は：デバイスまたはマトリックスの厚さ、デバイスまたはマトリックスの剛性、堆積されるポリマーの量、マトリックス中の溶媒の定量化、穿刺の存在、および静脈の焼けなどの管状部材の存在または焼けの、1つまたは複数に関する情報を生成してもよい。分析の結果は、管状グラフトデバイスを廃棄する（すなわち、患者に移植しない）ことを必要としてもよい。

20

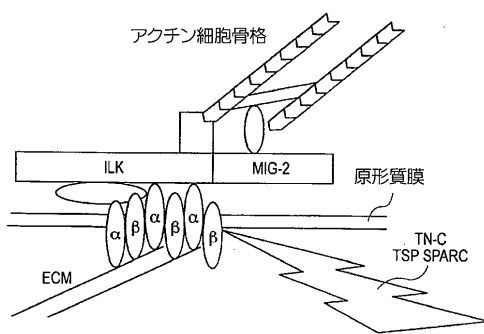
【0212】

本発明のその他の実施形態は、本明細書を考慮することによりかつ本明細書に開示される本発明を実施することにより、当業者に明らかにされよう。仕様および実施例は単なる例示と見なされ、本発明の真の範囲および精神は下記の特許請求の範囲によって示されることが意図される。さらに、本出願が方法または手順のステップを特定の順序で示した場合、いくつかのステップが行われる順序を変更することが可能でありまたはある状況ではさらに好都合であると考えられ、以下に示される方法または手順の請求項の特定のステップは、そのような順序の特異性が請求項で明示されない限り、順序に特異的であると解釈するものではない。

【図 1】



【図 2】



【図 5】

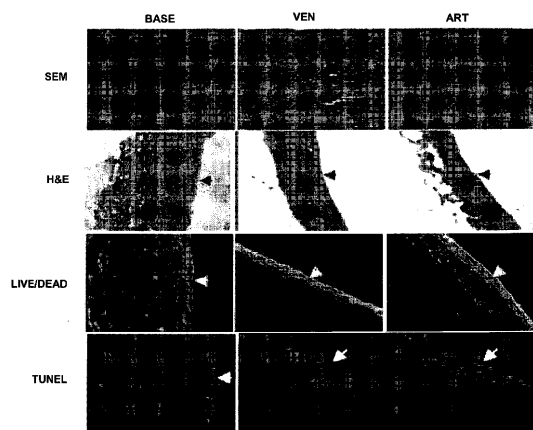
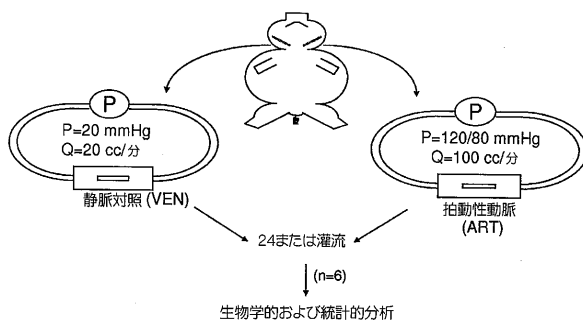


Fig. 5

【図 6】



【図 3】

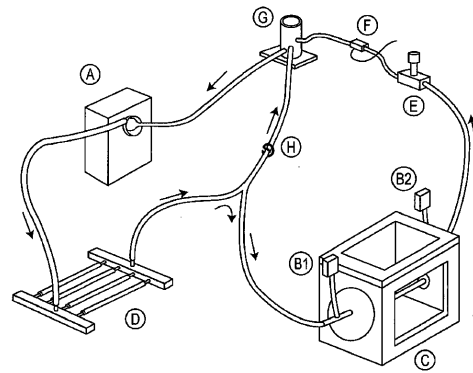
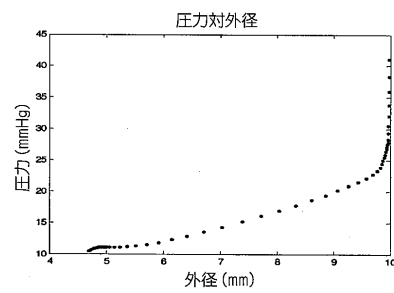
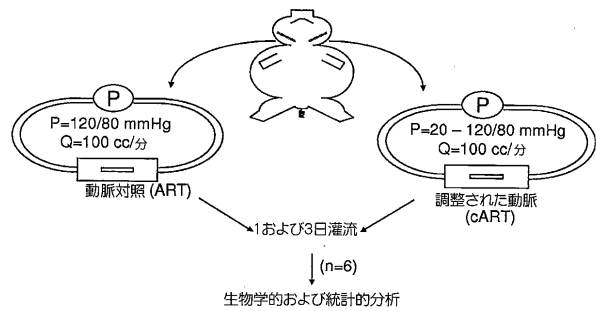


Fig. 3

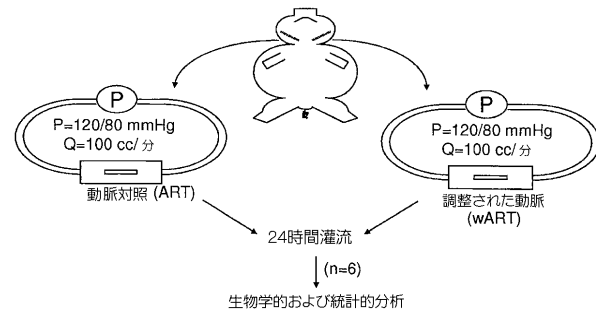
【図 4】



【図 7】



【図 8】



【図 9】

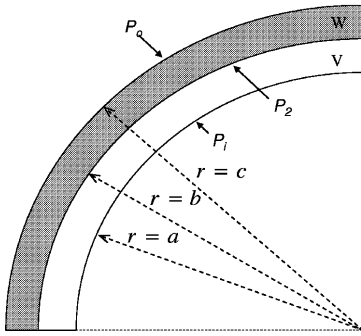
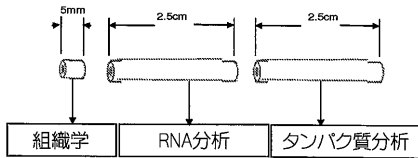
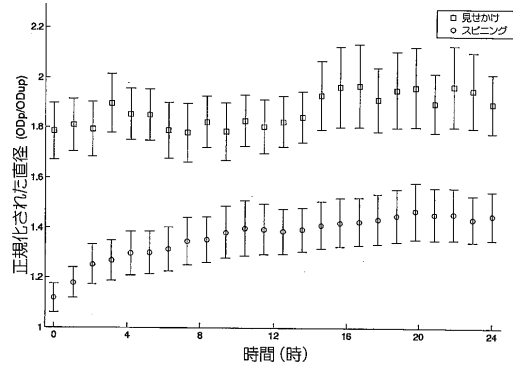


Fig. 9

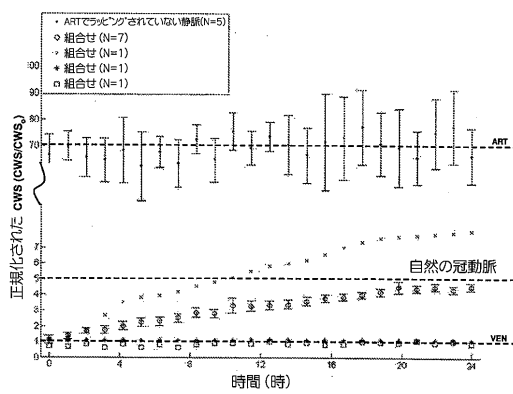
【図 10】



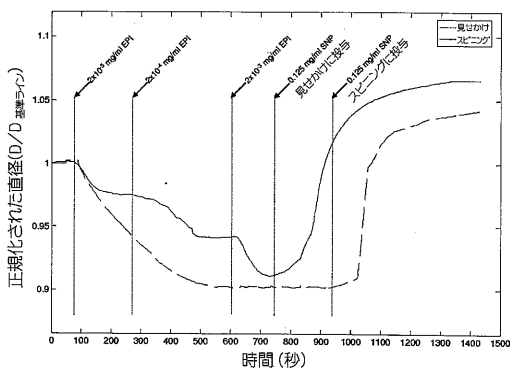
【図 11】



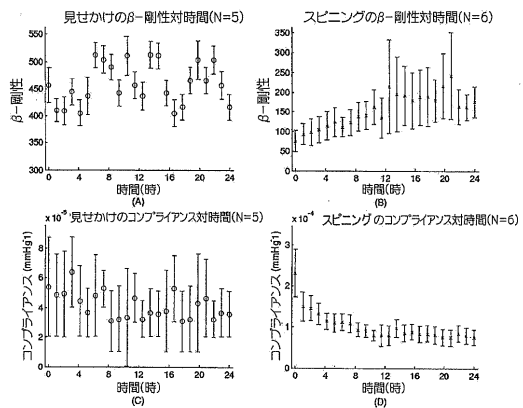
【図 12】



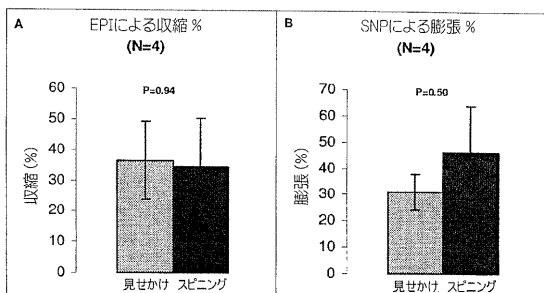
【図 13】



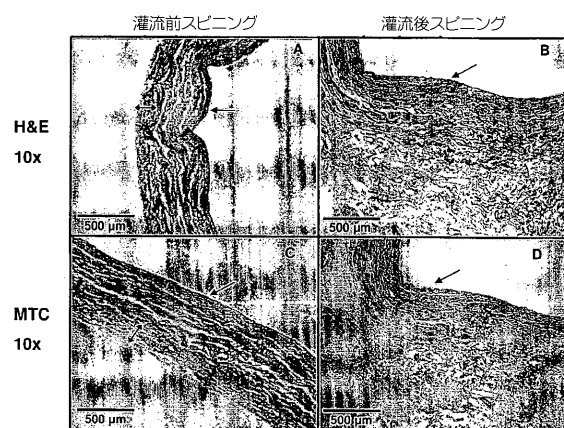
【図 15】



【図 14】



【図 16】



【図 17】

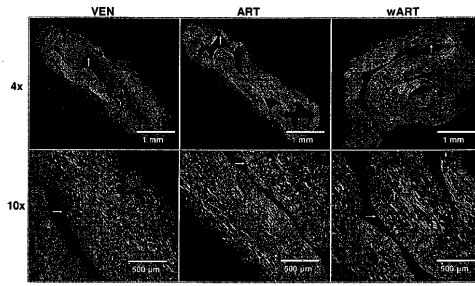


Fig. 17

【図 18】

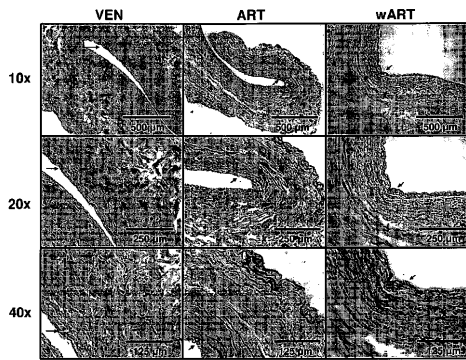


Fig. 18

【図 21】

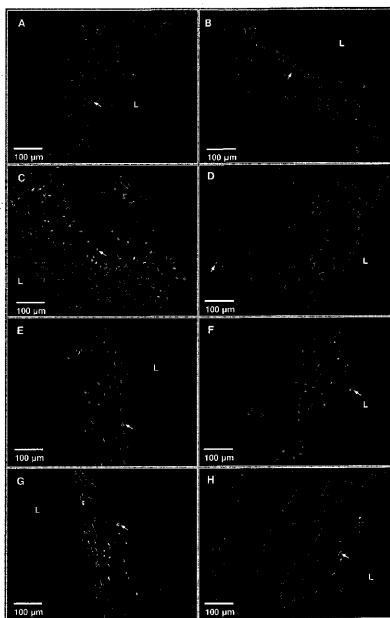


Fig. 21

【図 19】

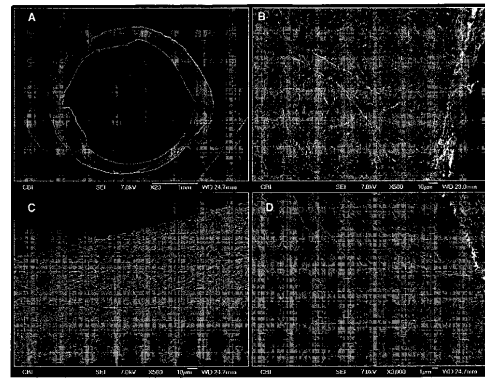
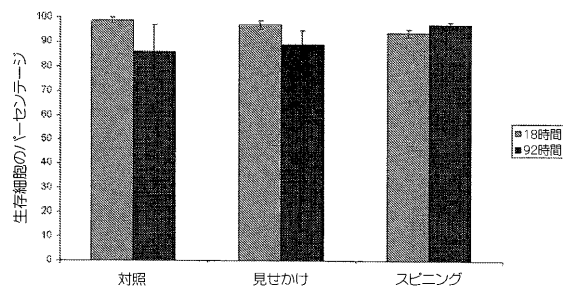


Fig. 19

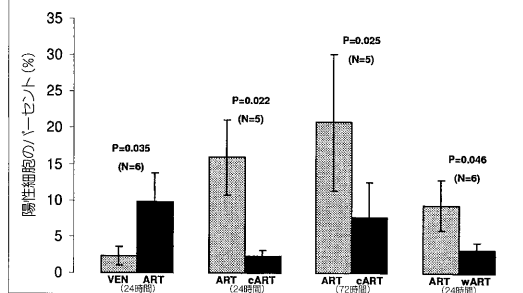
【図 20】

Live/Dead(商標)染色による組織生存度  
(N=1)



【図 22】

TUNEL分析結果



【図 2 3】

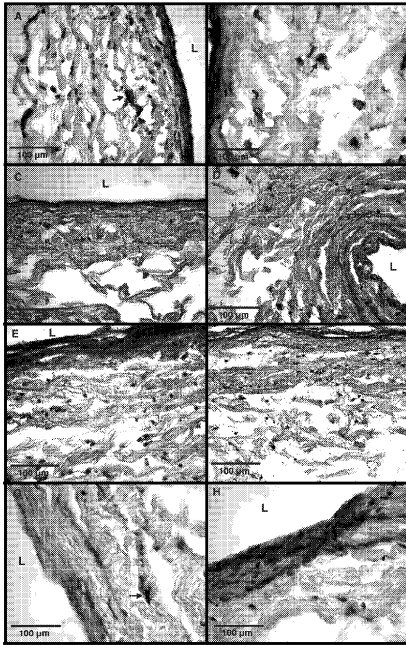
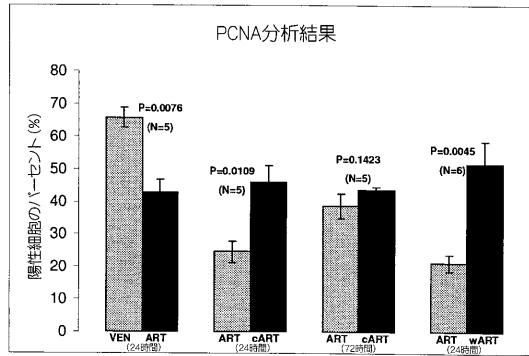


Fig. 23

【図 2 4】



【図 2 5】

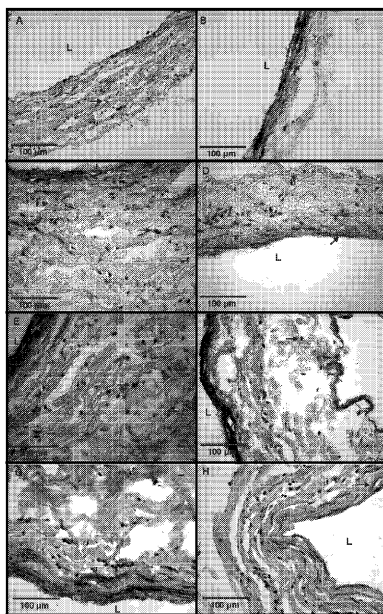
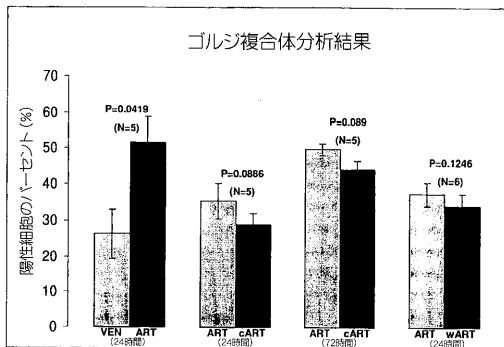


Fig. 25

【図 2 6】

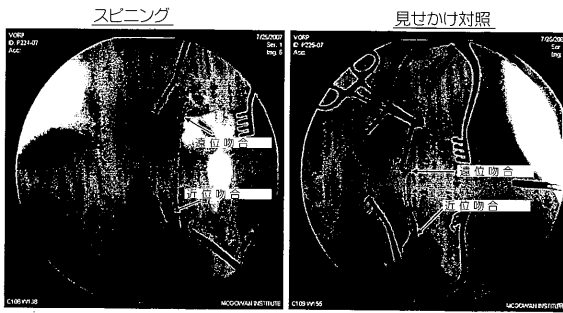


【図 2 7】

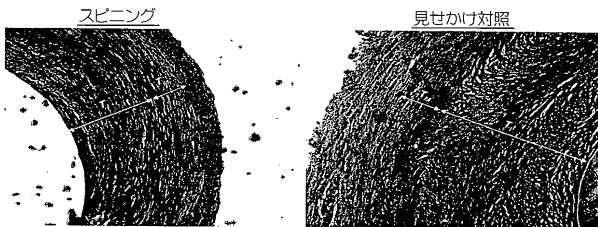


Fig. 27

【図 28】

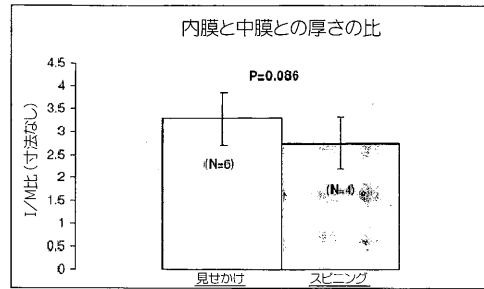


【図 29】



$$T_{I:M} = \frac{T_I}{T_M}$$

【図 30】



【図 32】

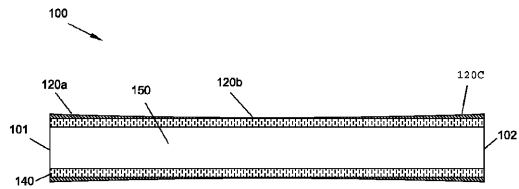


Fig. 32

【図 33 a】

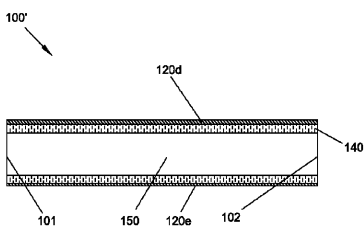


Fig. 33a

【図 33 b】

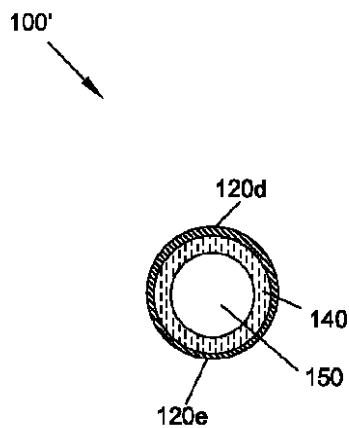


Fig. 33b

【図 34】

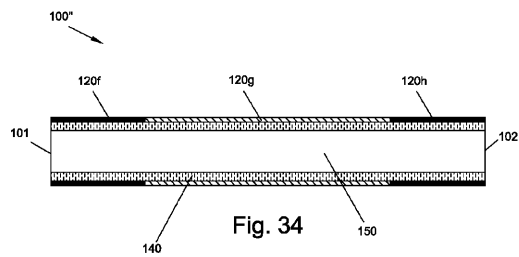


Fig. 34

【図 35】

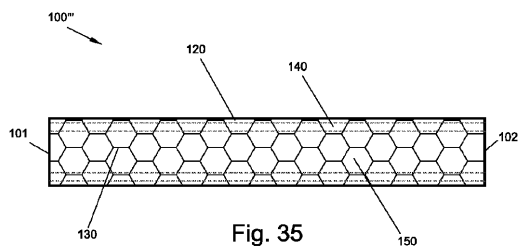
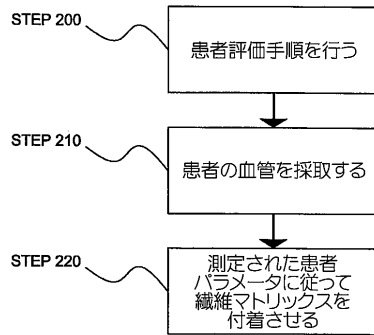
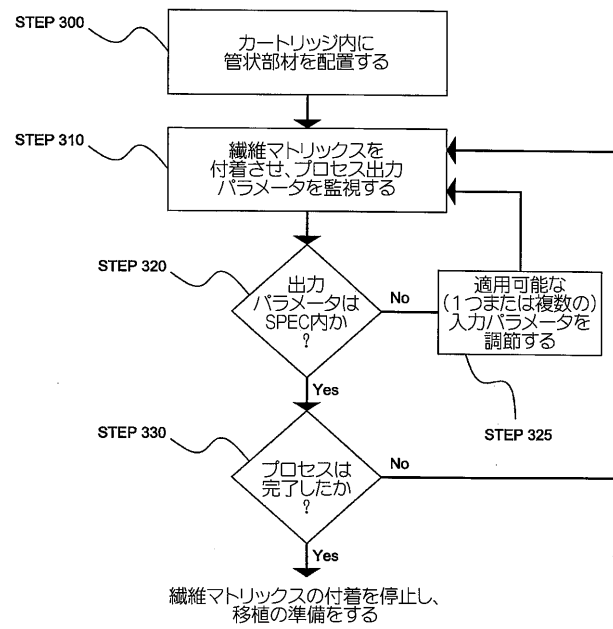


Fig. 35

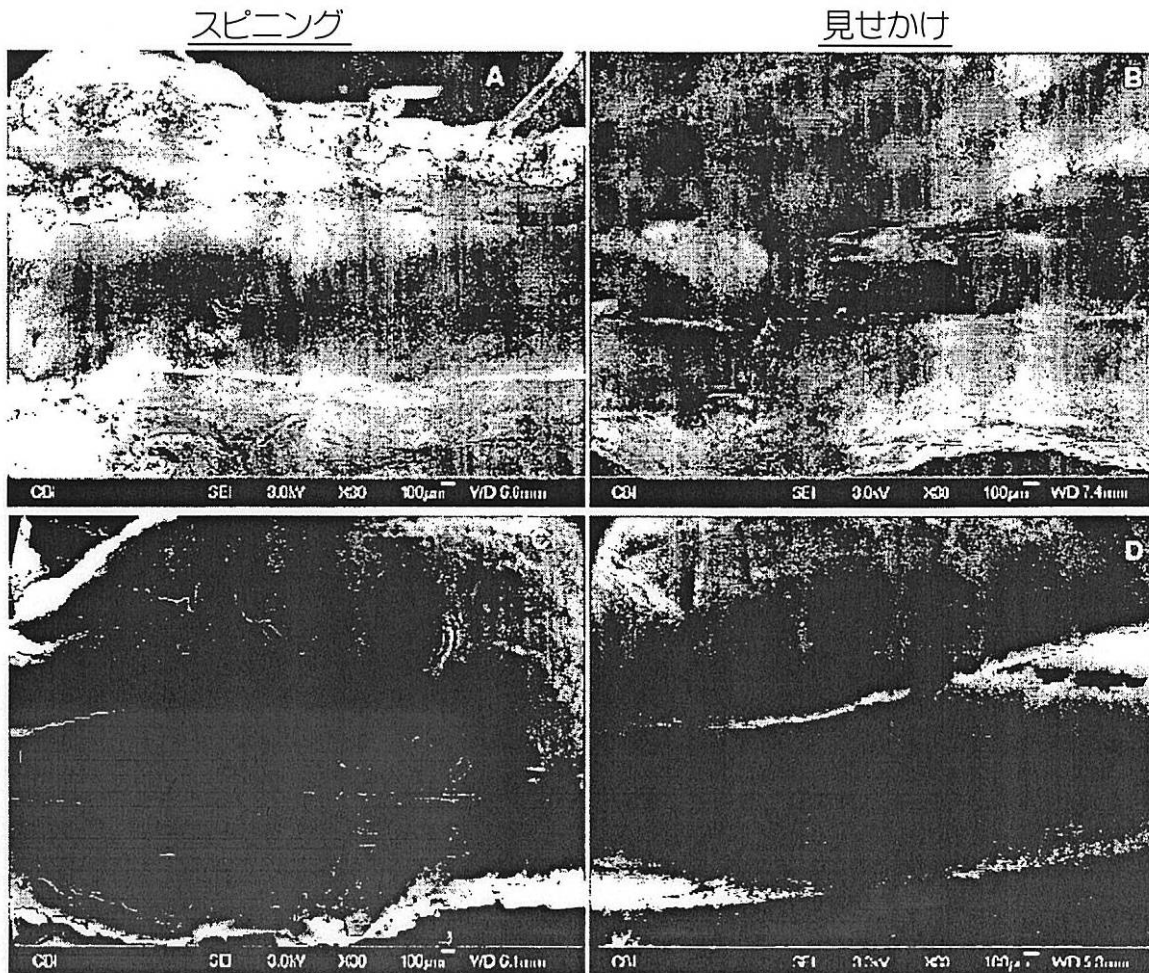
【図 36】



【図 37】



【図 3 1】



## 【手続補正書】

【提出日】平成24年7月13日(2012.7.13)

## 【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】

管腔を画定する壁を有する管状組織であって、前記管腔が前記管状組織の第 1 の端部から前記管状組織の第 2 の端部まで延び、前記壁は外面を有する、管状組織と；

ポリマーを含む繊維マトリックス堆積物であって、前記管状組織の前記外面を取り囲む、繊維マトリックス堆積物と；

前記繊維マトリックス堆積物に対してかつ前記管状組織の前記外面を取り囲んで配置された足場とを含む、管状組織グラフトデバイス。

## 【請求項 2】

前記繊維マトリックスは、前記管状組織の第 1 の端部から第 2 の端部まで、前記管状組織の前記外面を取り囲む、請求項 1 に記載のデバイス。

## 【請求項 3】

前記足場は、前記管状組織の第 1 の端部から第 2 の端部まで、前記管状組織の前記外面を取り囲む、請求項 1 に記載のデバイス。

## 【請求項 4】

前記管状組織の前記外面が円周を画定し、前記足場は前記管状組織の円周を取り囲む、

請求項 1 に記載のデバイス。

【請求項 5】

前記足場は、メッシュ構造、コイル構造、編組み構造、または編上げ構造の少なくとも 1 つを有する、請求項 1 に記載のデバイス。

【請求項 6】

前記足場はステント状構造を有する、請求項 1 に記載のデバイス。

【請求項 7】

前記足場は柔軟性である、請求項 1 に記載のデバイス。

【請求項 8】

前記足場は異方性である、請求項 1 に記載のデバイス。

【請求項 9】

前記足場は前記繊維マトリックスを取り囲む、請求項 1 に記載のデバイス。

【請求項 10】

前記足場は、前記管状組織と前記繊維マトリックスとの間にある、請求項 1 に記載のデバイス。

【請求項 11】

前記足場および前記繊維マトリックスは撚り合わされている、請求項 1 に記載のデバイス。

【請求項 12】

前記足場および前記繊維マトリックスは結合されている、請求項 1 に記載のデバイス。

【請求項 13】

前記足場および前記繊維マトリックスは、単層または複合体構造を含む、請求項 1 に記載のデバイス。

【請求項 14】

前記足場および前記繊維マトリックスは、2 層またはラミネート構造を含む、請求項 1 に記載のデバイス。

【請求項 15】

前記足場は第 1 の材料を含み、前記繊維マトリックスは第 2 の材料を含む、請求項 1 に記載のデバイス。

【請求項 16】

前記第 1 の材料は、ニチノール、ステンレス鋼、プラスチック、ポリマー、およびこれらの組合せからなる群から選択される、請求項 15 に記載のデバイス。

【請求項 17】

前記足場は生分解性材料を含む、請求項 1 に記載のデバイス。

【請求項 18】

前記足場は非生分解性材料を含む、請求項 1 に記載のデバイス。

【請求項 19】

前記繊維マトリックスは生分解性材料を含む、請求項 1 に記載のデバイス。

【請求項 20】

前記足場は、前記管状組織に半径方向の支持力を提供するように構成され、前記半径方向の支持力は、経時的に変化することが可能な大きさを有している、請求項 1 に記載のデバイス。

【請求項 21】

前記足場は、前記管状組織に半径方向の支持力を提供するように構成され、前記半径方向の支持力は、前記管状組織の第 1 の端部から第 2 の端部まで変化することが可能な大きさを有している、請求項 1 に記載のデバイス。

【請求項 22】

前記足場は、弾性的にバイアスがかけられた部分、可塑的に変形可能な部分、またはこれらの組合せの少なくとも 1 つを含む、請求項 1 に記載のデバイス。

【請求項 23】

前記足場は、前記管状組織グラフトデバイスに固着メカニズムを提供するように構成された、請求項 1 に記載のデバイス。

## 【国際調査報告】

| <b>INTERNATIONAL SEARCH REPORT</b>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                        |                                                                                                                               | International application No.<br><b>PCT/US2010/054444</b>                                                                                                    |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <b>A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER</b>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                |                                                                                                                               |                                                                                                                                                              |
| <i>A61F 2/04(2006.01)i, A61L 27/44(2006.01)i, A61L 27/04(2006.01)i, A61L 27/28(2006.01)i, A61B 5/02(2006.01)i</i>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                         |                                                                                                                               |                                                                                                                                                              |
| According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                         |                                                                                                                               |                                                                                                                                                              |
| <b>B. FIELDS SEARCHED</b>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                 |                                                                                                                               |                                                                                                                                                              |
| Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)<br>A61F 2/04; D01D 5/00; A61F 2/06; A61F 2/82; B29C 70/32                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                       |                                                                                                                               |                                                                                                                                                              |
| Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched<br>Korean utility models and applications for utility models<br>Japanese utility models and applications for utility models                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                 |                                                                                                                               |                                                                                                                                                              |
| Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)<br>eKOMPASS(KIPO internal) & Keywords: graft, fiber, scaffold                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                |                                                                                                                               |                                                                                                                                                              |
| <b>C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT</b>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                             |                                                                                                                               |                                                                                                                                                              |
| Category*                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                 | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages                                            | Relevant to claim No.                                                                                                                                        |
| X                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                         | US 2008-0208323 A1 (EL-KURDI et al.) 28 August 2008<br>See abstract, figures 1-31, paragraph [67]-[68], [76], and claims 1-82 | 1-53, 62-114, 115-167, 168-222                                                                                                                               |
| A                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                         | See the whole document.                                                                                                       | 54-61                                                                                                                                                        |
| A                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                         | US 2009-0012607 A1 (KIM et al.) 08 January 2009<br>See the whole document.                                                    | 1-222                                                                                                                                                        |
| A                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                         | US 7452374 B2 (HAIN et al.) 18 November 2008<br>See the whole document.                                                       | 1-222                                                                                                                                                        |
| A                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                         | US 05813167 A (HOSHINO et al.) 29 September 1998<br>See the whole document.                                                   | 1-222                                                                                                                                                        |
| <input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input checked="" type="checkbox"/> See patent family annex.                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                          |                                                                                                                               |                                                                                                                                                              |
| <p>* Special categories of cited documents:</p> <p>"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance</p> <p>"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date</p> <p>"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of citation or other special reason (as specified)</p> <p>"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means</p> <p>"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed</p> <p>"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</p> <p>"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</p> <p>"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</p> <p>"&amp;" document member of the same patent family</p> |                                                                                                                               |                                                                                                                                                              |
| Date of the actual completion of the international search<br>29 JULY 2011 (29.07.2011)                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                    |                                                                                                                               | Date of mailing of the international search report<br><b>02 AUGUST 2011 (02.08.2011)</b>                                                                     |
| Name and mailing address of the ISA/KR<br> Korean Intellectual Property Office<br>Government Complex-Daejeon, 189 Cheongsa-ro,<br>Seo-gu, Daejeon 302-701, Republic of Korea<br>Facsimile No. 82-42-472-7140                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                           |                                                                                                                               | Authorized officer<br>HAN, SANG SOO<br>Telephone No. 82-42-481-8648<br> |

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**

Information on patent family members

International application No.

**PCT/US2010/054444**

| Patent document<br>cited in search report | Publication<br>date | Patent family<br>member(s)                                                                                                          | Publication<br>date                                                                            |
|-------------------------------------------|---------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------|
| US 2008-0208323 A1                        | 28.08.2008          | AU 2008-210523 A1<br>CA 2677033 A1<br>CN 101663001 A<br>EP 2111185 A2<br>JP 2010-516437 T<br>WO 2008-094971 A2<br>WO 2008-094971 A3 | 07.08.2008<br>07.08.2008<br>03.03.2010<br>28.10.2009<br>20.05.2010<br>07.08.2008<br>16.10.2008 |
| US 2009-0012607 A1                        | 08.01.2009          | JP 2009-011804 A<br>JP 4499143 B2<br>KR 10-0932688 B1<br>KR 20090004027A                                                            | 22.01.2009<br>07.07.2010<br>21.12.2009<br>12.01.2009                                           |
| US 7452374 B2                             | 18.11.2008          | CA 2525489 A1<br>EP 1631332 A1<br>JP 2006-524117 A<br>JP 2006-524117 T<br>US 2004-0215337 A1<br>WO 2004-096307 A1                   | 11.11.2004<br>08.03.2006<br>26.10.2006<br>26.10.2006<br>28.10.2004<br>11.11.2004               |
| US 05813167 A                             | 29.09.1998          | None                                                                                                                                |                                                                                                |

## フロントページの続き

(81)指定国 AP(BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), EP(AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PE, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW

(特許庁注：以下のものは登録商標)

## 1. T E F L O N

- (74)代理人 100140109  
弁理士 小野 新次郎
- (74)代理人 100075270  
弁理士 小林 泰
- (74)代理人 100096013  
弁理士 富田 博行
- (74)代理人 100092967  
弁理士 星野 修
- (74)代理人 100114487  
弁理士 山崎 幸作
- (72)発明者 エルークルディ, モハメド  
アメリカ合衆国ペンシルバニア州15203, ピッツバーグ, ミッション・ストリート 3113
- (72)発明者 フラハティ, ジェイ・クリストファー  
アメリカ合衆国マサチューセッツ州01983, トップスフィールド, イプスウィッチ・ロード 242
- (72)発明者 ホーン, イー  
アメリカ合衆国ペンシルバニア州15213, ピッツバーグ, マリポー・ストリート 4733, アpartment ナンバー2
- (72)発明者 マクグラス, ジョナサン  
アメリカ合衆国マサチューセッツ州02332, ダックスベリー, ベイベリー・レイン 16
- (72)発明者 ソレッティ, ロレンゾ  
アメリカ合衆国ペンシルバニア州15221, ピッツバーグ, サウス・トレントン・アベニュー 823, アpartment ナンバー3
- (72)発明者 スタンカス, ジョン  
アメリカ合衆国カリフォルニア州95008, キャンベル, ウェスト・サニーオークス・アベニュー 820
- (72)発明者 ヴォープ, デーヴィッド  
アメリカ合衆国ペンシルバニア州15237, ピッツバーグ, ラドクリフ・ドライブ 122
- (72)発明者 ワグナー, ウィリアム  
アメリカ合衆国ペンシルバニア州15090, ウェックスフォード, サドベリー・ドライブ 10193

Fターム(参考) 4C081 AB13 BA13 CA161 CA211 CD021 CD041 CD081 CD151 CE02 CG05

CG08 DA03 DC03

4C097 AA15 AA16 BB01 CC01 CC02 CC03 CC04 CC06 CC13 CC14

DD02 DD05 DD09 DD12 DD15 EE02 EE06 EE08 EE09 EE10

EE11 EE18 EE19 FF03 FF04 FF06 FF10 FF14 FF16 FF17

MM02 MM03 MM04 MM05 MM07