(19)日本国特許庁(JP)　(12)特　許　公　報(B2)　(11)特許番号
特許第4911807号
(P4911807)
(45)発行日　平成24年4月4日(2012.4.4)　(24)登録日　平成24年1月27日(2012.1.27)

(51)Int.Cl.　　F I
A61K 35/14 (2006.01)　　A61K 35/14　B
C07K 14/745 (2006.01)　　C07K 14/745

請求項の数 9　(全 27 頁)

(21)出願番号　特願平8-517621
(86)(22)出願日　平成7年12月7日(1995.12.7)
(65)公表番号　特表平9-509432
(43)公表日　平成9年9月22日(1997.9.22)
(86)国際出願番号　PCT/US1995/015171
(87)国際公開番号　WO1996/017871
(87)国際公開日　平成8年6月13日(1996.6.13)
審査請求日　平成14年9月18日(2002.9.18)
審判番号　不服2009-13960(P2009-13960/J1)
審判請求日　平成21年8月5日(2009.8.5)
(31)優先権主張番号　08/351,010
(32)優先日　平成6年12月7日(1994.12.7)
(33)優先権主張国　米国(US)

(73)特許権者　509221250
プラズマシール・エルエルシー
アメリカ合衆国カリフオルニア州９４１２４　サンフランシスコ・パラウアベニユー２１８０
(74)代理人　110000741
特許業務法人小田島特許事務所
(72)発明者　アンタナビク，リチャード　デー
アメリカ合衆国カリフオルニア州９３４４６パソロブルズ・シヤルドネイプレイス６８３０
(72)発明者　ドリアン，　ランデル
アメリカ合衆国カリフオルニア州９４５６３オリンダ・オークロード　１５

最終頁に続く

(54)【発明の名称】血漿濃縮物および組織封止材組成物

(57)【特許請求の範囲】
【請求項１】
組織封止材または接着剤として使用するための５～４００ｍｇ／ｍｌのフィブリノーゲン含有血漿濃縮物であって、該フィブリノーゲンが非－沈殿であり、変性されておらず且つ血漿を脱水することによって血漿から直接得られる、上記血漿濃縮物。
【請求項２】
血小板、０．５～３５ｍｇ／ｍｌのフィブロネクチンおよび生理学的キャリアーを含有する請求項１記載の血漿濃縮物。
【請求項３】
全血から血漿を分離するための分離機および濃縮材からなり、この濃縮材は、非－沈殿フィブリノーゲンの変性を伴うことなく該血漿から水を除去するように該分離機と流路を連絡して濃縮された血漿を提供するものである、組織封止材または接着剤として使用するための請求項１記載の血漿濃縮物を調整するための使い捨てカートリッジを備える装置であって、該分離機が疎水性セル気泡体を含んでなり、該濃縮材がデキストラノマー、デキストラミン、ポリアクリルアミド、シリカゲル、ゼオライト、架橋アガロース、澱粉およびアルギン酸ゲルから選択される材料を含んでなる、上記装置。
【請求項４】
全血から血漿を分離するための分離機を含む第一チャンバーと該第一チャンバーと流路の連絡した第二チャンバーからなり、該第二チャンバーが、非－沈殿フィブリノーゲンの変性を伴うことなく該血漿から水を除去することにより該血漿を濃縮するための濃縮材およ

び該濃縮材と、濃縮された血漿を分離するための濃縮材に対する区分とを含む、請求項３記載の装置。
【請求項５】
該濃縮材が遊離ビーズ形態にあるかまたは該濃縮材中の表面に結合されている請求項３記載の装置。
【請求項６】
該濃縮材が水を吸収する膜を更に含んで成る請求項３記載の装置。
【請求項７】
（ａ）全血から血漿を分離すること、そして
（ｂ）該血漿から非－沈殿フィブリノーゲンに変性をもたらさない濃縮材を用いて水を除去して濃縮血漿を作る工程を含む、組織封止材または接着剤として使用するための請求項１記載の血漿濃縮物の製造方法であって、該濃縮材がデキストラノマー、デキストラミン、ポリアクリルアミド、シリカゲル、ゼオライト、架橋アガロース、澱粉およびアルギン酸ゲルから選択される材料を含んでなる、上記方法。
【請求項８】
組織封止材または接着剤として使用するための請求項１記載のフィブリノーゲンを含む血漿濃縮物を作る方法であって、
（ａ） 第１の領域において遠心分離で全血から血漿を分離すること、；
（ｂ） 分離された血漿を第２の領域に移動すること；
（ｃ） 該第２の領域に置かれた遠心分離機で該分離された血漿から水を取り出すこと、の工程を含んで成る上記方法であって、ここで該遠心分離機が、該分離された血漿中におけるフィブリノーゲンを変性させず且つ沈殿させず、該水を取り出すことが該濃縮された血漿を作り出す、上記方法。
【請求項９】
該遠心分離機が、デキストラノマー、デキストラミン、ポリアクリルアミド、シリカゲル、ゼオライト、架橋アガロース、澱粉およびアルギン酸ゲルから選択される材料を含んで成る、請求項８記載の方法。
【発明の詳細な説明】
発明の背景
発明の分野：
本発明は、濃縮された血漿および組織封止材を作成するための方法、ならびに組織を封止するための、混合物中の高分子量成分を迅速に分離するための、血漿を迅速に分離するための、そして混合物中の粒子成分を迅速に分離するための装置に関する。本発明は特に、自系の組織封止材の調製および使用に応用できる。
背景の検討：
フィブリン接着剤および封止材
外科的医術の使用に適する組織接着剤としての要求に見合う、様々な物質が試されてきた。シアノアクリレートのような完全に合成された物質が試され、そして要求に満たないことが分かった。血液成分から作られた天然のフィブリン接着剤および封止材は、この技術開発の初期に認識された。ウシのトロンビンで活性化されたヒトのフィブリノーゲンから作成された外科的な“フィブリン封止材”は（“フィブリン接着剤：fibrin glues”と呼ばれることもある）、ヨーロッパでは広く使用されている。そのようなフィブリン封止材は、多くの状況で合成接着剤または従来の外科医術に優ることが示された。さらにこれらは輸血の必要性を減らす。フィブリン封止材に関する学問的および外科的見解は、大変好ましい。最近の総説では：
フィブリン封止材は、今日最も成功した組織接着剤である。それらは、生物適合性、生分解性および止血という点で、シアノアクリレートおよび海産物接着剤のような接着技術に優る多くの利点を有する。ヨーロッパには市販されているものが幾つかあるが、米国においては、プール血漿血液製品に対する現在の規制的立場により存在しない
（Sierra.1993:を参照にされたい）、

と述べている。
実際として現在では、フィブリン封止材はヒト フィブリノーゲン、フィブロネクチンおよび第ＸIII因子の濃縮物を、通常はクリオ沈降により単離し、そしてそれを使用直前にウシ（または時々はヒト）トロンビンと混合することにより作成されている。トロンビンはフィブリノーゲンをフィブリンに転換し、フィブリンは急速にゲル化して一過性の止血プラグを形成し、これが次に第ＸIII因子により安定化される。フィブロネクチンは、細胞に接着を提供し、凝固および組織を再集合する。フィブリン封止材の最も通常の適用法は、プールしたヒト血液からの濃縮フィブリノーゲンを、使用直前にウシトロンビンおよびカルシウムと混合することである。
フィブリン封止材は米国では市販されていないが、ヨーロッパでは市販されている（TISSEEL（商標）、TISSUCOL（商標）/イムノ（Immuno）;BERIPLAST（商標）/ベーリング（Behring）。この使用に関して多くの文献が報告された。米国におけるフィブリン封止材の使用は、ＦＤＡの規制以外は病院内での調製に制限されている。ＦＤＡがこの製品を承認しない理由は：
・プールしたヒト血液からのウイルスの伝播（例えば、ＨＩＶ、肝炎）[1]および
・ウシ トロンビンに対する免疫反応[2]、例えばトロンビンおよび第Ｖ因子インヒビターまたは外来生体反応[3]、である。
これらに対するＦＤＡの関心は相当深刻であので、ＦＤＡは外科医からの強い要望ならびに文献で紹介された大変好ましい比較研究にも拘わらず、いかなるフィブリン封止材製品も承認してこなかった。
このような状況から、実際的な様式でTISSUCOLシステムの成分を含むフィブリノーゲンの自系対を単離する方法に多くの関心が向けられるようになった。これらの試みは以下に引用する総説で検討されている。以下のThompson[4]の総説では、早急な自系フィブリノーゲンの価値が大変期待されていることを示している。
フィブリン接着剤は、フィブリノーゲンおよびトロンビンの２つの別個の溶液から成る。これらを一緒に混合すると、これらの薬剤は凝固カスケードの最終段階を模してフィブリン凝固を形成する。フィブリン接着剤はヨーロッパでは市販されているが、米国では市販されていない：それゆえに、研究者はその場しのぎに彼ら自身のフィブリン接着剤を配合した。フィブリノーゲンは、プールした１人の提供者から、および自系血液提供者から得ることができ、そして通常はクリオ沈降法により単離されている。最も安全な調製は、患者自身の血液を使用してフィブリン接着剤を調製することである。自系血液の使用は、疾患伝播の危険性が最も少ないが、選択した方法の時に前もって使用する必要がある。自系血液の使用は通常、外傷または緊急時の手術には使用できない。
Siedentop[5]は、フィブリン接着剤のフィブリノーゲン供給成分として血漿の使用を提案することに関連して、血漿からフィブリノーゲンの多くの沈殿法を記載している。４つの方法が提案された：エタノールを用いた沈殿、未分画血漿の使用、クリオ沈降法および硫酸アンモニウムを用いた沈殿である。Epstein[6]は、ポリエチレングリコール沈殿を使用して得た自系血漿からのフィブリノーゲン調製物の使用を提案している。エタノール沈殿に基づいた比較的複雑な系を使用する、自系組織接着剤を調製するための系がWeis-Fogh[7]により記載された。これらのいずれの方法も未だに明らかに優れた自系封止材を生成していないので、過去５年間の研究は血漿封止材[8]、エタノール沈殿法[9]および急速クリオ沈降法[10]を含む幾つかの方法について続行された。これまでの特許は後の章、自系沈殿封止材および自系血漿封止材で検討している。
これらのいずれの方法も、外科手術中に迅速に調製できる接着剤として、自系血漿画分の便利な使用に直ちに適応するものではない。この目的のために、フィブリノーゲンを含む画分の調製に提案されたすべての研究が、大変時間がかかり、かつ複雑で、手術中に完了するための短時間に終了できない。またクリオ沈降法のような幾つかの方法は、冷蔵遠心機のような特別な装置が必要である。従来技術の方法は、まず組成物を調製することであるが、これは直ぐにさらなる同定法および患者に合ったサンプルの訂正の必要性を強要し、そして同時に間違えの可能性を生じ、さらに患者にとって不都合なことには、さらに来

院時期を調整しなければならない。そしてもちろん、このような状況は手術が緊急的に行われる場合には可能ではない。

一般的な手術用接着剤および特定のフィブリン接着剤に関する幾つかの有用な総説が報告された（Sierra,D.H.“フィブリン封止接着系：その化学的、物質的性質および臨床的応用の総説（Fibrin sealant adhesive systems:a review of their chemistry,material properties and clinical application）”J.Biomater Appl 7（4 1993）:309-52;Wiseman,David M. David T. RoveeおよびOscar M.Alverez、“創傷外科用医薬材料：設計および使用（Wound Dressings:Design and Use）”、創傷治癒：生化学的および臨床的観点（Wound Healing：Biochemical & Clinical Aspects）、I.Kelman Cohen、Robert F. DiegelmannおよびWilliam J.Lindblad編集、562-580、第１版、巻、フィラデルフィア：W.B.サンダース社（Saunders Company）:1992）。外科医により使用されるデバイスの総説は、止血剤および接着剤の両方との関連で、フィブリン接着剤を検討している（Edlich,Richard F., George T.RodeheaverおよびJohn G.Thacker“創傷治療管理における外科用デバイス（Surgical Devices in Wound Heraling Management）”、創傷治癒：生化学的および臨床的観点（Wound Healing：Biochemical & Clinical Aspects）、I.Kelman Cohen、Robert F. DiegelmannおよびWilliam J.Lindblad.編集、581-600、第１版、巻、フィラデルフィア：W.B.サンダース社:1992）。血液凝固におけるフィブリンおよびフィブリノーゲンの役割も報告された（Jackson,C.M.およびY.Nemerson、“血液凝固（Blood coagulation）”Annu.Rev. Biochem. 49（811 1980）:765-811）。他の総説は、年代をさかのぼる順序で以下のものを含む：

（1）Lerner,R.およびN.S.Binur、“外科用接着剤の現状（Current status of surgical adhesives）”J Surg Res 48（2 1990）:165-81。

（2）Gibble,J.W.およびP.M.Ness、“フィブリン接着剤:完全な手術用封止材か？（Fibrin glue:the perfect operative sealant?）”Transfusion 30（8 1990）:741-7。

（3）Thomson,D.F.,N.A.LetassyおよびG.D.Thomson、“フィブリン接着剤:その調製、効力および局所的止血材としての副作用（Fibrin glue:a review of its preparation,efficacy,and adverse effects as a topical hemostat）”Drug Intell Clin Pharm 22（12 1988）:946-52。

生物的沈降物封止材

血液に由来する接着剤または封止材を調製するためのほとんどすべての従来法が、プール血漿から沈殿させたフィブリノーゲン（通常、クリオ沈降した）、1972に初めて報告された方法[11]を使用している。ほとんどの生物封止材の特許は、クリオ沈降法の改良である。ほとんどが適用前に凍結乾燥工程を行う。血漿についてわずかに触れているが、濃縮血漿に由来する組成物ついて述べているものはない。

クリオ沈降法からの組成物は、イムノAG（Immuno AG）[12]が特許を取得した。基本的な方法はすでに報告されているので、特許請求された組成物は正確に説明できる：

実施態様的クレーム：１．フィブリノーゲンが少なくとも３３重量％存在し、フィブリノーゲン１グラム当たりの第ＸIII因子の単位で表したフィブリノーゲンに対する第ＸIII因子の比が少なくとも８０であり；そしてフィブリノーゲンおよびアルブミンが33－90対5－40の比で存在する、フィブリノーゲン、アルブミン、第ＸIII因子、冷－不溶性グロブリンおよびプラスミノーゲン－活性化インヒビターまたはプラスミンインヒビターを含んで成る、哺乳動物タンパク質起源の凍結乾燥組織接着剤。

幾つかの発明は、初期のクリオ沈降法を改良した。様々なクリオ沈降法が特許請求されて、血液凝固疾患を持つ患者のために優れた材料を生成する[13]。Stroetmannは粉末として適用するために、フィブリノーゲン、トロンビンおよびプロテアーゼインヒビターを凍結乾燥状態で混合して、問題を克服した[14]。ベーリング（Behring）は、（溶解性が悪い）クリオ沈降物の溶解性を改良する方法を見いだした[15]。仏国の科学者達は、二回の冷エタノール沈殿法を使用することにより、従来のクリオ沈降物を改良した[16]。Epsteinは、ポリエチレングリコールを用いた沈殿に関する特許出願を有する（姉妹特許（デバイス）のみ発効された）[17]。クリオライフ（Cryolife）は、広範な実施例クレームで特許を作った[18]

（注意に述べた）が、すべての請求の範囲が沈殿法の使用に制限されている。
Sierraのグループは、フィブリノーゲンにコラーゲンを加えた組成物で特許を得た。注目すべき点はコラーゲンが封止材の機械的特性を向上させることである[19]。関連する方法は、ヒアルロン酸を加えて、ゲル化する前により粘稠な溶液を作成し（特許出願）[20]、そして機械的強度のために絹のフィブロインを加える[21]。
開示された世界の特許出願では、Baxterがフィブリノーゲンアフィニティークロマトグラフィーを使用して沈殿法の問題を克服していることを示している[22]。開示された欧州特許出願では、スクイブ（Squibb）の科学者達がトロンビンの必要性を排除する方法を開発した[23]。彼らはフィブリノーゲンを固定化ヘビー毒を用いたカラムに通すことにより作成したフィブリン；ゲル化を防ぐカオトロピック剤を使用する。この研究によれば、“フィブリノーゲンとは対照的にトロンビンまたは第ＸIII因子を使用せずに、フィブリンＩモノマーがフィブリンポリマーに転換できるので好ましい”。この方法は血液から60-90％のフィブリンモノマーを生成する。これはカルシウムおよびｐＨ変化により活性化される。
生物特許のほとんどが、沈殿工程を組織封止材の製造に当然のこととしている。
自系沈殿物封止材
上記に検討したように、自系血液生成物は安全性および生物適合性という理由だけで、優れていると認識されている。コロンビア大学は、自系フィブリン接着剤の使用[24]で特許を取得したが、請求の範囲はクリオ沈降物に制限されている。欧州特許出願公開は同様に特許請求しているが、ここでも請求の範囲はクリオ沈降物に制限されている。
自系血漿封止材
Alterbraumは、組織接着剤[26]を作成するために少量の患者血漿を使用することで特許を取得したが、血漿は濃縮されておらず、そして請求の範囲は血漿単離用のフラットパック遠心機の使用に制限されている。
１．血漿を得るために患者血液がローターに中枢的に載せられた円筒のカップを有する遠心機中で分離され、そして血漿が遠心機中で分離されて濃縮されたフィブリノーゲンを生成する、フィブリン接着剤の自系調製における使用法であって：
（ａ）血液または血漿を実質的に平らなパケット中に移し；（ｂ）血液または血漿を含むパケットを、実質的に円筒型挿入取り付けアッセンブリーのくぼみに固定し；（ｃ）該円筒型挿入取り付けアッセンブリーを、円筒型挿入取り付けアッセンブリーが遠心カップの中にぴったりと保持されるように、相補的な円筒形を有する遠心機のカップ中に挿入し；（ｄ）該遠心カップ中に保持された該挿入取り付けアッセンブリー中に固定された該パケットに含まれる血液または血漿を遠心して、血液または血漿を成分に分け；そして（ｅ）該分離した成分の１つからフィブリン接着剤を形成する、
工程を含んで成る上記方法。
血漿を濃縮することに言及する、または提案する特許請求は無いが、本発明に最も似ていると思われる特許は（Dennis Galanakis,SUNY Story Brook）、非濃縮血漿接着剤[27]を網羅する。
１．止血を行うために自系哺乳動物血漿フィブリンを用いる処置法であって、（ａ）該動物から血液試料を得；（ｂ）工程（ａ）で得た該血液から全血漿を実質的に即座に分離し；そして（ｃ）工程（ｂ）で得た該全血漿を、治療部位の割合および容量の、生理的に許容できる溶液中でトロンビンと接触させて、該部位にフィブリン凝固を提供する、
工程を含んで成る、上記処置法。
適用
ゲル化が大変早いので、フィブリン接着剤の適用には２つの成分を制御された条件下で混合する必要がある。最も早いアプリケーターの特許は、イムノ ＡＧに譲渡された。主要な特許請求は、より少容量かつより高度に濃縮されたトロンビン[28]を使用することにより、ならびにゲルのシリンジアプリケーター／ミキサーを清潔に維持するための医療用ガスの使用[29]により、フィブリノーゲン成分の希釈を制限するために様々なシリンジの直径が検討されている。Galanakisは、２つの液体が内部で混合しないが、適用の点すべてに平行に走る管から並んで適用される適用法を記載した[27]。同様な特許請求がミクロメディッ

クス（Micromedics）によってもなされた[30]。コーラス　メディカル（Corus Medical）は、加圧ガスにより駆動されるエアゾールデバイスを有する[31]。クリオライフの方法は、トロンビンのｐＨインヒビターにより、単一成分フィブリン接着剤中のゲル化を防ぐことである[32]。Gordeon Epsteinは、適用前に表面を乾燥させるため第三の吸引チップの使用で特許を取得した[17]。

血漿分離材

Haemoneticsの“ボウル（bowl）”法は、以下に記載する本発明の方法とは異なる方法により、連続的に血漿の分離を可能にする[33]。幾つかの特許が、遠心沈降法[34]または赤血球細胞バリアー[35]を使用して、血液から血小板の単離を研究しているが、焼結（多孔性）プラスチック、または細胞がバリアーを通過し、血小板－リッチな血漿を後に残すことを含む、本明細書に記載されものに類似する方法を特許請求してはいない。

デキストラン

ファルマシア（Pharmacia）は、デキストラノマー[36]およびその創傷治癒における使用について基本的特許を持っている。興味深いことには、水および電解質の分別吸収により、創傷付近にタンパク質（フィブリノーゲンを含む）の濃縮が技術的な利点として確認されるが、特許請求はデキストラノマービーズの創傷適用法に限定されている。

他の興味深い特許

フィブリン封止材は、軟骨を修復するために[38]、眼内手術を補助するために[39]、そして“組織融合”用の加熱－融解コラーゲンとともに[40]、組成物中の成分として特許請求された。別の方法は、穿刺出血を止めるための生分解性繊維を被覆するためのフィブリノーゲン／トロンビン粉末を使用すること[41]、または粉末化フィブリン封止材を用いたコラーゲンスポンジまたはマットにおける使用[42]であった。神経治癒を向上させるために、コラゲナーゼをフィブリン封止材に加えることがWehlingにより特許となった[43]。ファルマシアは接着を防止するためのヒアルロン酸の使用で特許を取得した[44]。

米国における現在のフィブリン封止材使用の要約

創傷は自然に治癒するが、医学は創傷治癒過程を向上させ、そして早くすることを探求している。生体の血液凝固および組織修復機構は、血液タンパク質（例えばフィブリノーゲン）から特殊化された修復細胞（繊維芽細胞）へと進行する複雑なカスケードである。縫合糸、外科用ステープルおよび外科用接着剤は、損傷した組織を一緒にまとめて治癒が進行できるようにする。ウシのトロンビンで活性化されたヒトのフィブリノーゲンから作られた外科用“フィブリン封止材”は、時々“フィブリン接着剤”とも呼ばれるが、ヨーロッパでは広く使用されている。そのようなフィブリノーゲン封止材は、多くの状況で合成接着剤または従来の外科術に優ることが示された。さらにそれらは輸血が不要である。フィブリン封止材に対する学問的見解は、大変好ましい（上記の総説を参照にされたい）。実際、現在では、フィブリン封止材は通常クリオ沈降法によりヒトのフィブリノーゲン、フィブロネクチンおよび第ＸIII因子の濃縮物を単離し、そしてそれを使用直前にウシ トロンビンと混合することにより作成される。トロンビンはフィブリノーゲンをフィブリンに転換し、これは急速にゲル化して一過性の止血プラグを形成する。最も一般的なフィブリン封止材の適用法は、プールしたヒト血液から濃縮したフィブリノーゲンを、使用直前にウシトロンビンおよびカルシウムと混合することによる。

フィブリン封止材は米国では市販されていないが、ヨーロッパでは市販されている。ＦＤＡは、プールしたヒトの血液からウイルス伝播（例えば、ＨＩＶ、肝炎）の可能性、および潜在的な免疫反応の可能性から、米国においてはこれらの製品を承認していない。これらに対するＦＤＡの関心は相当深刻であので、ＦＤＡは外科医からの強い要望ならびに文献で紹介された大変好ましい比較研究にも拘わらず、いかなるフィブリン封止材も承認していない。

１．Hennis,H.L.、W.C. StewartおよびE.K.Jeter、“フィブリン接着剤の感染症の危険性（Infectious disease risks of fibrin glue）[私信]”Ophthalmic Surg 23（9 1992）：640。

２．Berguer,R.,R.L.Staerkel,E.E.Moore,F.A.Moore,W.B.GallowayおよびM.B.Mockus、“

警告：深部肝臓創傷でのフィブリン接着剤の使用に対する致命的反応。症例報告（Warning:fatal reaction to the use of fibrin glue in deep hepatic wounds.Case reports.）”J Trauma 31（3 1991）:408-11。
Berruyer,M.J.Amiral,P.Ffrench,J.Belleville,O.Bastien,J.Clerc,A.Kassir,S.EstanoveおよびM.Dechavanne、“心臓血管手術中にフィブリン接着剤と使用したウシトロンビンによる免疫感作。トロンビンおよび第Ｖ因子インヒビターの開発（Immunization by bovine thrombin used with fibrin glue during cardiovascular operations.Development of thrombin and factorV inhibitors.）”J Thorac Cardiovasc Surg 105（5 1993）892-7。
３．Sanal,M.“フィブリン接着剤は外来生体反応を引き起こすか?（Does fibrin glue cause foreign body reactions?）[私信]”Eur J Pediatr Surg 3（3 1993）:190。
Sanal,M., H.Dogruyol,A.GurpinaerおよびO.Yerci、“フィブリン接着剤は外来生体反応を引き起こすか?（Does fibrin glue cause foreign body reactions?）”Eur J Pediatr Surg 2（5 1992）:285-6。
４．Thompson,D.F.,Letassy,N.A.,およびThompson,G.D.、フィブリン接着剤：その調製、効力および局所的止血材としての副作用の総説（Fibrin glue:a review of its preparation,efficacy,and adverse effects as a topical hemostat.）”Drug Intell Clin Pharm 1988.22（12）:第946-52頁。
５．Siedentop,K.H.,D.M.HarrisおよびB.Sanchez。“自系フィブリン組織接着剤（Autologous fibrin tissue adhesive）”Laryngoscope 95（9pt 1 1985）:1074-6。
６．Epstein,G.H.,R.A.Weisman,S.Zwillenbergおよび A.D.Schreiber、“耳外科術用の自系フィブリノーゲンを基本とする新規接着剤（A new autologous fibrinogen-based adhesive for otologic surgery.）”Ann Otol Rhinol Laryngol 95（1Pt 1 1986）:40-5。
７．Weis-Fogh,U.S.、“（組織接着系に自系使用するための少量血液試料から調製したフィブリノーゲン（Fibrinogen prepared from small blood samples for autologous use in tissue adhesive system.”Eur Surg Res 20（5-6 1988）:381-9。
８．Hartman,A.R.,D.K.Galanakis,M.P.Honig,F.C.SeifertおよびC.E.Anagnostopoulos、“自系全血漿フィブリンゲル。手術用の調達。（Autologous whole plasma fibrin gel.Intraoperative procurement”Arch Surg 127（3 1992）:357-9。
９．Kjaergard,H.K.,Fogh Us WeisおよびJ.J.Thiis、“心膜血液由来の自系フィブリン接着剤の調製（Preparation of autologous fibrin glue from pericardial blood.”Ann Thorac Surg 55（2 1993）:543-4。
Kjaergard,H.K.,U.S. Weis-Fogh,H.Sorensen,J.ThiisおよびI.Rygg、“エタノールによる自系フィブリン接着剤の簡単な調製法（A Simple method of preparation of autologous fibrin glue by means of ethanol.”Surg Gynecol Obstet 175（1 1992）:72-3。
１０．Casali,B.,F.Rodeghiero,A.Tosetto,B.Palmieri,R.Immovilli,C.GhediniおよびP.Rivasi、“単一提供者の自系プラスマフェレーゼに由来するフィブリン接着剤（Fibrin glue from single-donation autololegous plasmapheresis.）”Transfusion 32（7 1992）:641-3。
Moretz,W.Jr.,J Shea Jr.,J.R.EmmettおよびJ Shea、“耳科外科術用の簡単な自系フィブリノーゲン接着剤（A simple autologous fibrinogen glue for otologic surgery”Otolaryngol Head Neck Surg 95（1 1986）:122-4。
１１．Matras,Helene,H.P.Dinges,H.Lassmann, and B.Mamoli.「動物実験における縫い目のない繊維束間神経移植のために」Wein Med Woschtr 122（37 1972）:517-523.
First clinical results:Kuderma,H. and Helene Matras.「傷ついた末梢神経の再構成における凝固物質による神経吻合による接着の臨床的使用」Wein Klin Woschenschr 87（15 1975）:495-501.
１２．Schwarz,O.,Linnau,Y.Loblich,F.およびSeelich,T.、組織接着剤；フィブリノーゲン、アルブミン、第ＸIII因子、グロブリンおよびプラスミノーゲン遮断剤を含む凍結乾燥創傷治癒剤（Tissue adhesive;freez dried wound healing agent containing Fibrino

gen,albumin,factor ＸIII,globulin,and plasminogen blocking Agent.）。米国特許第4,414,976号明細書（1983）;Schwarz,O.,Linnau,Y.Loblich,F.およびSeelich,T.、組織接着剤；第VIII因子、タンパク質、フィブリノーゲン、グロブリン、アルブミンおよびプラスミンインヒビター（Tissue adhesive;factorviii,proteins,fibrinogen,globulin,albumin,and plasmin inhibitor.）。米国特許第4,377,572号明細書（1982）；Schwarz,O.,Linnau,Y.Loblich,F.およびSeelich,T.、組織接着剤；フィブリノーゲン、第ＸIII因子、アルブミン、プラスミンインヒビター（Tissue adhesive;fibrinogen,factor ＸIII,albumin,plasmin inhibitor.）。米国特許第4,362,567号明細書（1982）；Schwarz,O.,Linnau,Y.Loblich,F.およびSeelich,T.、組織接着剤；血液タンパク質；外科医術（Tissue adhesive;blood proteins;surgery.）。米国特許第4,298,598号明細書（1981）；イムノ AGに譲渡された。

１３．Martinowitz,U.およびBal,F.、クリオ沈降法を使用することにより調製された改良組織接着剤（Improved tissue glue prepared by using cryoprecipitate.）。オクタファーマAG（Octapharma AG）に譲渡された欧州特許出願公開第534,178号明細書（1993）。

１４．Stroetmann,M.、進歩した創傷閉鎖および治癒のための濃縮血漿誘導物（Enriched plasma derivative for advancement of wound closure and healing）。米国特許第4,427,650号明細書（1984）;Stroetmann,M.、フィブリノーゲン-含有乾燥調製物、その製造および使用（Fibrinogen-containing dry preparation,manufacture and use thereof）。米国特許第4,442,655（1984）号明細書；Stroetmann,M.、創傷閉鎖および被覆増強用の濃縮血漿誘導物（Enriched plasma derivative for enhancement of wound closure and coverage.）。米国特許第4,427,651号明細書（1984）;セラファーム ミハエル ストロエトマン DE（Serapharm Michael Stroetmann DE）に譲渡された。

１５．Fuhge,P.,Heimberger,N.,Stohr,H.-A.およびBurk,W.,容易に溶解する凍結乾燥フィブリノーゲン組成物（Readily Dissolvable Lyophilized Fibrinogen Formulation）；米国特許第4,650,678号明細書（1987）。ベーリングベルケ アクチェンゲゼルシャフト（Behringwerke Aktiengesellschaft）に譲渡された。

１６．Burnouf-Radosevich,M.およびBurnouf,T.、トロンビン凝固性タンパク質の濃縮、それを得る方法およびその治療的使用（Concentrate of thrombin coagulable proteins,the method of obtaining same and therapeutical use thereof.）。米国特許第5,260,420号明細書。（1993）セントラ リージョナル デ トランスフュージョン サングイン リーレ（Centre Regional de Transfusion Sanguine de Lille）に譲渡された。

１７．Epstein,G.H.、“全血液からフィブリノーゲン接着剤の調製法および装置（Method and apparatus for preparing fibrinogen adhesive from whole blood.）。米国特許第5,226,877号明細書C（1993）。

１８．Morse,B.S.,Carpenter,J.F.,Turner,A.D.およびCryolife,I.、フィブリノーゲン／第ＸIII因子沈殿物の調製法（Preparation of fibrinogen/factorＸIII precipitate.）。米国特許第5,030,215（1991）号明細書。クリオライフ（Cryolife）に譲渡された。請求の範囲１：血液凝固因子を回収するシステムであって、全血液を受容するための第一容器手段、該第一容器手段は上部末端、下部末端、少なくとも１つの入口および少なくとも１つの出口を含んで成る；該容器手段に全血液を運ぶための第一導管手段、該第一導管手段はその末端が該第一容器手段の入口に連結されている末端を有する；該第一容器手段中の赤血球細胞から分離された血漿を受けるための第二容器手段、該第二容器手段は上部末端を有し、この容器手段は、その上部末端に隣接している比較的広い第一直径部分、該第二容器手段内の血漿から沈殿した血液凝固因子を受けるために該第一部分の下に定めた比較的狭い第二部分、および該第二部分の比較的狭い部分の下に定めた比較的広い第三部分を有し、該第二の比較的狭い部分が、該第一部分から該第三部分へと沈殿物血液凝固因子の比較的狭い流路を定めるようになっており；ならびに血漿を該第一容器手段から該第二容器手段に運ぶための、該第一容器手段の該出口に連結している第一末端、および該第二容器手段の該入口部に連結している第二末端を有する第二導管手段、を含んで成る上記システム。

１９．Sierra,D.H.,Brown,D.M.およびLuck,E.E.、外科用接着材料（Surgical adhesive material.）。米国特許第5,290,552号明細書（1994）。マトリックス　ファーマ社／プロジェクトヘアー（Matrix Pharma Inc./Project Hear）に譲渡された。

２０．Wadstroem,J.、フィブリンまたはフィブリノーゲンを含んで成る組織治療組成物および生分解性および生物適合性ポリマー（Tissue treatment composition comprising fibrin or fibrinogen and biodegradable and biocompatible polymer.）。国際公開第92/22,312（1992）号明細書。

２１．Iwatsuki,M.およびHayashi,T.、絹－フィブロインおよびヒト－フィブリノーゲン接着組成物（Silk-fibroin and human-fibrinogen adhesive composition.）。米国特許第4,818,291号明細書（1989）。味の素社（Ajinomoto Co.Inc.）に譲渡された。

２２．Tse D.C.,Alpern,M., Enomoto,S.T.,Garanchon,C.M.,Liu,S.L.,Mankarious,S.S.およびThomas,W.R.、局所用フィブリノーゲン複合体（Topical fibrinogen complex.）。国際公開第05067（1993）。バクスター社（Baxter Int Inc.）に譲渡された。

２３．Edwardson,P.A.D.,Fairbrother,J.E.,Gardner,R.S.,Hollingsbee,D.A.およびCederholm-Williams.S.A.、フィブリン封止材組成物およびその使用法（Fibrin sealant compositions and method for utilizing same.）。欧州特許出願公開第592,242号明細書（1993）。スクイブ（Squibb）に譲渡された。

２４．Rose,E.およびDresdale,A.、クリオ沈降した懸濁液の調製法およびその使用（Method of preparing a cryoprecipitated suspension and use thereof.）米国特許第号4,928,603明細書（1990）。コロンビア大学に譲渡された。請求の範囲１：本質的に（a）すでに血液伝播性疾患についてスクリーニングを受けた１人の提供者に由来する新しい凍結血漿を約-80★℃で少なくとも6時間凍結乾燥し、（b）凍結血漿の温度を、上清ならびにフィブリノーゲンおよび第ＸIII因子を含むクリオ沈降した懸濁液が生じるように上昇させ、そして（c）クリオ沈降した懸濁液を回収することから成る、フィブリン接着剤の調製において前駆体として有用なフィブリノーゲンおよび第ＸIII因子を含むクリオ沈降した懸濁液の調製法。

Rose,E.およびDresdale,A.、1人の提供者の新しい凍結血漿に由来する濃縮物として調製されたフィブリン接着剤（Fibrin adhesive prepared as a concentrate from single donor fresh frozen plasma.）米国特許第号4,627,879明細書（1986）。コロンビア大学に譲渡された。要約：フィブリノーゲンおよび第ＸIII因子を含むクリオ沈降した懸濁液を、血液伝播性疾患についてスクリーニングを受けた１人の提供者に由来する新しい凍結血漿を－80℃で少なくとも6時間凍結乾燥し、凍結血漿の温度を、上清ならびにフィブリノーゲンおよび第ＸIII因子を含むクリオ沈降した懸濁液が生じるように上昇させ、懸濁液を回収することを含んで成る、フィブリン接着剤の製造。定めた容量の懸濁液を所望の部位に適用し、そしてトロンビンを含む組成物を、懸濁液中のフィブリノーゲンがフィブリノーゲン接着剤に転換されるように適用し、これが次にゲルとして固体化する。

２５．Weis-Fogh,U.、組織修復促進物質を調製するための方法および装置（A Method and an Appratus for preparing tissue repair promoting substances.）。国際公開第88/02259号明細書（1988）（出願）。

２６．Alterbaum,R.、患者血液からのフィブリノーゲン調製に使用する方法および装置（Method and apparatus for use in preparation of fibrinogen from a Patient’s blood.）。米国特許第4,714,457号明細書（1987）。請求の範囲１：血漿を得るために、患者血液がローターに中枢軸に載せられた円筒カップを有する遠心機中で分離され、そして血漿が遠心機中で分離されて濃縮されたフィブリノーゲンを生成する、フィブリン接着剤の自系調製における使用法であって：（ａ）血液または血漿を実質的に平らなパケット中に移し；（ｂ）血液または血漿を含むパケットを、実質的に円筒型挿入取り付けアッセンブリーのくぼみに固定し；（ｃ）該円筒型挿入取り付けアッセンブリーを、円筒型挿入取り付けアッセンブリーが遠心カップの中にぴったりと保持されるように、相補的な円筒形を有する遠心機のカップ中に挿入し；（ｄ）該遠心カップ中に保持された該挿入取り付けアッセンブリー中に固定された該パケットに含まれる血液または血漿を遠心して、血液また

は血漿を成分に分け；そして（ｅ）該分離した成分の１つからフィブリン接着剤を形成する、工程を含んで成る上記方法。
２７．Galanakis,D.K.、自系血漿フィブンの調製法およびそれを適用する装置（Method of preparing autologous plasma fibrin and application apparatus therefore.）。米国特許第5,185,001号明細書（1993）。ニューヨーク州立大学　レス　ホンドに譲渡された。
２８．Eibl,J.,Habison,G.,Redl,H.およびSeelich,T.、組織接着剤の適用法（Arrangement for applying a tissue adhesive.）。米国特許第4,735,616号明細書（1988）。イムノＡＧに譲渡された。
２９．Redl,H.およびHabison,G.、組織接着剤を適用するための装置（Apparatus for Applying a tissue adhesive.）。米国特許第4,631,055号明細書（1986）。イムノＡＧに譲渡された。
３０．Miller,C.H.Altshuler,J.H.およびArenberg,I.K.、フィブリン接着剤送達システム（Fibrin glue delivery system.）。米国特許第4,874,368号明細書（1989）。マイクロメデックスに譲渡された。
３１．Avoy,D.R.、フィブリノーゲン分包キット（Fibrinogen dispensing kit.）。米国特許第4,902,281号明細書（1990）。コーラス　メド社に付与された。
３２．Morse,B.S.,McNally,R.T.およびTurner,A.D.、フィブリン密封材送達法（Fibrin sealant delivery method.）。米国特許第5,219,328号明細書（1993）。クリオライフに付与された。
３３．Headley,T.D.、プラスマフェレーシス 遠心ボウル；使い捨て（Plasmapheresis centrifuge bowl:disposable.）。米国特許第4,983,158号明細書（1991）。ヘモネチックス社（Haemonetics Corp）に譲渡された。第Ｅページ、血液処理用の使い捨ての遠心ボウル（Disposable centrifuge bowl for blood processing.）。米国特許第4,943,273号明細書（1909）;Latham,A.,Jr.、血液をその成分に分離する装置（Apparatus for separating blood into component thereof.）。米国特許第4,303,193号明細書（1981）;Latham,A.,Jr.、フェレーシス法および使い捨て血漿（Process for pheresis procedure and disposable plasma.）。米国特許第4,204,537号明細書（1980）;Latham,A.,Jr.、フェレーシス法およびその使い捨てフェレーシスボウル（Process for pheresis procedure and disposable pheresis bowl therefor.）。米国特許第4,059,108号明細書（1977）;ヘモネチックスに譲渡された。
３４．Pall,D.B.およびGsell,T.C.、血小板を得る方法（Method for obtaining platelets.）。米国特許第5,258,126号明細書（1993）。ポール社（Pall Corp）に譲渡された；Pall,D.B.およびGsell,T.C.、血液回収および処理システム（Blood collection and processing system.）。米国特許第5,100,564号明細書（1992）。ポール社に譲渡された。
３５．Pall,D.B.,Gsell,T.C.,Matkovich,V.I.およびBormann,T.、生物流体の処理システムおよび方法（System and method for processing biological fluid.）。米国特許第5,217,627号明細書（1993）。ポール社に譲渡された。；Pall,D.B.,Gsell,T.C.およびMuellers,B.T.、ヒト輸血用の血液処理法（Method for processing blood for human transfusion.）米国特許第5,152,905号明細書（1992）。ポール社に譲渡された。；Eldegheidy,M.M.、自動的液体成分分離機（Automatic liquid component separator.）。米国特許第4,639,316号明細書（1987）。ベクトンデッキンソン社（Becton Dickinson & Co）に譲渡された。
３６．デキストラン材料から親水性高分子量物質を製造する方法（Process for the Manufacture of Hydrophilic High Molecular Weight Substances from Dextran Substances.）。独国特許出願公開第854,715明細書（1965）;Gelotte,E.B.およびSoderquist,B.G.F.,［ヒドロキシ化合物コポリマーデキストラン-エピクロロヒドリン（Hydroxy compound copolymers dextran-epichlorhydrin）］混合重合による代替製品の製造方法DD Patent 56,103（1965）; Beil. W.,Hoeppner, A., Wolff.H. J., and Beil, H.,「ゲル粒子の形態にある多糖類もしくはその誘導体またはポリビニルアルコールの高分子の親水性架橋生成物

の製造方法」ヒドロキシ基-含有、非-イオン性ポリマーの高分子量親水性コポリマーが、存在するポリマーを反応させることにより、ゲル排水の状態で得られる（High mol.wt.hydrophilic copolymer of hydroxy group-containg.,non-ionic polumer is obtd.in the form of gel drains by reacting the polymer,in the presence）。独国特許出願公開第1,443,359号明細書（1962）；ファルマシアに譲渡された。

３７．Rothman,U.S.およびJacobsson,S.A.、皮膚表面から流出している流体、創傷および粘膜を清浄する方法およびその方法を行う手段;水-不溶性膨潤性ポリマーの乾燥粒子（Method for cleansing fluid discharging skin surfaces,wounds and mucous membranes and means for carrying out the method;dry particles of water-insoluble swellable polymer.）。米国特許第4,537,767号明細書（1985）。ファルマシア社に譲渡された。;Rothman,U.S.およびJacobsson,S.A.、皮膚表面から流出している流体、創傷および粘膜を清浄する方法およびそれを行う手段。米国特許第4,225,580号明細書（1980）。ファルマシア社に譲渡された。

３８．Hunziker,E.B.、軟骨の欠損または傷を治療するための方法および組成物（Method and compositins for the treatment and repair of defects or lesions in cartilage.）。米国特許第5,206,023号明細書（1993）。

３９．Sarfarazi,F.、角膜切開のサルファラジー封鎖法（Sarfarazi method of closing a corneal incision.）。米国特許第5,190,057号明細書（1993）;O'Donnell、F.,E.Jr.,Mammern,E.およびNalbandian,R.M.、眼内レンズ移植ならびに後眼房内の配置および接着法（Intraocular lens implant and method of locating and adhering within the posterior chamber.）。米国特許第5,002,571号明細書（1991）。

４０．Sawyer,P.N.、組織接続に使用するコラーゲン接続棒材料（Collagen welding rod material for use in tissue welding.）。米国特許第5,156,613号明細書。インターフェイス バイオメディカル ラボラトリーズ（Interface Biomedical Laboratories）に譲渡された。

４１．Sakamoto,I.Unigame,T.およびTakagi,K.、止血剤（Hemostatic agent.）。米国特許第4,655,211号明細書（1987）。ユニチカKK（Unitika KK）に譲渡された。

４２．Zimmermann,E.およびSchieile,U.、創傷を封止および治癒するための薬剤（Agent for sealing and healing wounds.）。米国特許第4,453,939号明細書（1984）。Hormon-Chemie Munch: Stemberger, A., 織物接着性コラーゲン創傷覆い。EP Patent 102,773（1983）Assigned to Dr. Ruhland Nachf. GmbH.

４３．Wehling,P.,障害を受けた神経の再生を強化する方法およびそのための接着性医薬組成物（Method of enhancing the regeneration of injured nerves and adhesive pharmaceutical formulation therefor.）。米国特許第5,279,825号明細書（1994）。アドバンスト バイオファクチャーズ（Advanced Biofactures）に譲渡された;Wehling,P.,障害を受けた神経の再生を強化する方法およびそのための接着性医薬組成物;再生中に神経障害のゾーンにコラゲナーゼを供給すること（Method of enhancing the regeneration of injured nerves and adhesive pharmaceutical formulation therefor;supplying collagenase to the zone of nerve injury during regeneration.）。米国特許第5,173,295号明細書（1992）。アドバンスト バイオファクチャーズに譲渡された。

４４．Lindblad,G.およびBuckley,P.、体組織間の接着を防止する組成物および方法（Composition and method for prevention of adhesions between body tissues.）。米国特許第5,190,759号明細書（1993）。カビ ファルマシア（Kabi Pharmacia AB）に譲渡された。

発明の要約

したがって本発明の1つの目的は、フィブリノーゲン、プロトロンビン（トロンビンの不活性型前駆体）および他の血液タンパク質ならびに血小板（栓球）を含む血液から血漿濃縮物を迅速に調製する新規方法および装置を提供することである（クエン酸塩、ヘパリンまたは他の抗凝固物質が凝固の開始を妨害するために十分な量で存在してよい）。

本発明のさらなる目的は、患者自身の血液から血漿濃縮物を迅速に調製する新規方法およ

び装置を提供することである（自系組織封止材）。
さらに本発明の目的は、手術室にいる間に患者自身の血液から血漿濃縮物を迅速に調製する新規方法および装置を提供することである（緊急自系組織封止材）。
さらに本発明の目的は、血漿タンパク質沈降物に由来する組織封止材よりも優れた物理的、化学的および生物的特性を有する組成物を提供することである。

【図面の簡単な説明】

本発明およびそれに付随する多くの利点をより完全に評価することは、添付の図面に関連して考察した時に、以下の詳細な説明を参照にすると、より簡単によりよい理解を得ることができるようになるだろう、ここで：
図１は、本発明の使い捨てカートリッジの態様を示し、開放型セル疎水性気泡体による血漿分離、およびビーズが静電的力により保持されている開放型セル疎水性気泡体による血漿濃縮に使用する；
図２は、本発明の使い捨てカートリッジの態様を示し、焼結プラスチックバリアーによる血漿分離、および溝中に分散したビーズによる血漿濃縮に使用する；
図３は、本発明の使い捨てカートリッジの態様を示し、環状チャンバーによる血漿分離、およびビーズが静電的力により保持されている開放型セルによる血漿濃縮に使用する；
図４は、本発明の使い捨てカートリッジの態様を示し、フェルトマットによる血漿分離、およびプラスチックディスク中に含浸されたビーズによる血漿濃縮に使用する；
図５は、低分子量および巨大分子成分（例えば血漿）溶液中の本発明の１つの拡大された濃縮材ビーズを示し；そして
図６は、遠心後、および血漿濃縮物をシリンジで引き抜いている本発明の使い捨てカートリッジの態様を示す；
図７は、本発明のアプリケーターの態様を示し、同軸針を使用して２成分の混合を可能にする；
図８は、本発明のアプリケーターの態様を示し、アクチベーターカートリッジを使用して１成分フィブリン封止材の適用を可能とし；そして
図９は、本発明の10kDaの分子量排除限界を有するビーズで３×に濃縮されたタンパク質溶液または懸濁液について、タンパク質濃度とその分子量との間の関係をグラフで示す。

好適な態様の説明

組織封止材調製用の使い捨てカートリッジを有する廉価なデバイスを開示する。このデバイスは特に、自系組織封止材を緊急に調製するために応用できる。この使い捨てカートリッジは手のひらに収まり、そして患者の血液に暴露される可能性を排除し、そして無菌性を確実にするために、密閉して塞がれることができる。組織封止材が、血小板－リッチ血漿濃縮物（デバイスから）をカルシウムおよびトロンビンの溶液と混合した後直ぐに、あるいは組織封止材が物理的または固定化酵素活性化後直ぐに適用される、組織を封止する組織の封止法が開示されている。
手術室で５ｃｃの封止剤を５０ｃｃの患者血液から調製するには、１５分以内で、かつ１つの簡単な工程である必要である。処理を手術室で行うことができるのでトラッキングエラーの危険性は無い。血漿封止材およびその調製法に使用するさらなる化学品は、抗凝固剤（例えば、クエン酸塩）およびカルシウム塩（例えばクロライド）に限られている。
粘着性および引張強さは、ヨーロッパで市販されているプール血液フィブリン封止材に匹敵する。組織封止材は患者血液からフィブリン溶解の高濃度の天然インヒビターを含んでいるので、抗フィブリン溶解剤（例えばアプロチニン）は必要でない。組織封止材は、患者血小板、および創傷治癒を促進する市販のフィブリン封止材中には含まれていないさらなる因子も含む。
本発明の（自系）組織封止材は創傷に適用されている間、カルシウム（および場合によってはウシまたはヒトトロンビン）と混合されると、急速にゲル化する。この封止材は、ＦＤＡ－承認または承認されうる成分のみを含む。本発明で“組織封止材”は、凝固形成、組織接着および創傷治癒に貢献する血液中に見いだされる成分（好ましくは血液中のそのようなすべての成分）を含み、したがって典型的にはクリオ沈降タンパク質だけを含み、

そして血小板を含まないこれまでの“フィブリン封止材”とは明らかに異なる。
本発明は、血小板－リッチ血漿（ＰＲＰ）濃縮物の作成法に関し、これは次にカルシウム／トロンビンと混合されて組織封止材を作成できる。生成したゲルは、これまでの科学的文献または特許明細書には記載されたことがない組成物である。
ここで図面に関連して述べると、ここで参照番号は幾つかの図面を通して同一の、または対応する部分を示しているが、より詳細には本発明の好適態様において図１に関して述べると、クエン酸塩加の血漿は２段階で使い捨て遠心カートリッジ中で処理される。第一段階は、遠心力が赤および白血球を不可逆的に第一分離材中に入るようにした時（例えば、疎水性開放型セル気泡体）、血小板－リッチ血漿が細胞から分離される。第二段階では、血小板－リッチ血漿が、水、電解質および小タンパク質を吸収する濃縮材（例えばデキストラノマービーズ）と接触することにより濃縮され、血小板－リッチ血漿濃縮物となる。
したがって、血小板－リッチ血漿を作成する本方法は；
（ａ）全血液から血漿および血小板を分離し；
（ｂ）血漿および血小板を濃縮材と接触させて、濃縮された血小板－リッチ血漿を提供し；そして
（ｃ）濃縮された血小板－リッチ血漿を濃縮材から分離する、
工程を含んで成る。
好ましくは、カートリッジは使い捨てであり、そして密閉されており（例えば、各図１から４の組み立て図１を参照にされたい）、混入を不可能にする。この方法が密閉カートリッジ内で行われる場合、上記分離工程（ａ）は、例えばカートリッジの血液充填口（入口）と流路連絡しているカートリッジの第一チャンバー内で行うことができる。血漿および血小板は次に、濃縮材（例えば第一チャンバーと流路連絡しているカートリッジ中の第二チャンバー）と、血漿を濃縮させるために十分に接触させることができる。この密閉した、使い捨てカートリッジの利点は、これを手術室で使用でき、これによりトラッキングエラーおよび混入の可能性を排除することに注目されたい。
さらなる態様では、本方法は自系濃縮血小板－リッチ血漿を作成するものであり、ここで上記の濃縮血小板－リッチ血漿を作成する本方法はさらに分離工程（ａ）の前に、患者から血液を回収し、そして凝固を阻害するために有効量のクエン酸塩を加え（従来法に従い）、そして標準量の血液（例えば５０ｃｃ）をカートリッジ１の血液注入口（入口）５に注入することを含んで成る。
血漿から詰め込んだ細胞を容易に分離するために、従来の遠心法および発明を組み合わせることにより、血漿を血液から分離する。最高3,000－10,000rpmの可変の速度で、両方向に遠心でき、そしてマイクロプロセッサー（すなわち、予め定めた時間、予め定めた回転速度で遠心する）で制御できる遠心機は、周知であり、そして必要であれば血漿を分離および濃縮するための本方法の使用に容易で適合される。全血液を注入した後、操作者はマイクロプロセッサー－制御遠心をプッシュ－ボタンにより開始する。濃縮物を取り出すまでの残りのすべての工程は、自動的である。
遠心中にセル塊中に詰め込まれる性質により、細胞は従来通り血漿から分離されるが（次に典型的には吸引される）、カートリッジは血漿を迅速に次の濃縮材チャンバー中で分離するように設計されている。１つの態様では（図１）、赤および白血球が、疎水性開放型セル気泡体１４中にトラップされて残る。別の態様（図４）では、赤および白血球がフェルト環７中ににトラップされて残る。第３の態様（図２）では、細胞が焼結環８中の入り組んだ通路を通って外側にトラップされて残る。第４の態様（図３）では、赤および白血球が小さい間隔１６を通って移動し、そして遠心を止めた時に重力により外環中にトラップされて残る。
場合によっては、血漿が静電的力により開放疎水性セル状気泡体１５（図１および３の装置の）に結合したデキストラノマービーズと接触できる。湿らせた時、ビーズはその静電的吸引力を失い、そして膨潤し始める。あるいは例えば図２の装置に従い、血漿は遊離のデキストラノマービーズ２と接触することができる。遠心は、遊離のデキストラノマービーズが濃縮材カップの縁３の外側に均一に分布するのに十分な速度で、簡単に時計回りに

回転し、次に数回、反時計回りに回転させることができる。
次に遠心を、1,000－10,000rpm、好ましくは3,000rpmで10分間回転して、細胞から血小板－リッチ血漿を分離する。はじめに全血が血液入口６中の孔４を通って分離チャンバー中に移動する。細胞はマトリックス１４（図１に見られるような）内にトラップされるか、マトリックス７の網に組み込まれるか（図４に示すように）、あるいは焼結疎水性プラスチックまたは他の多孔性材料８（図２に示すような）を通過することができ、チャンバー中に血小板－リッチ血漿を残す。
次に遠心を１５－９０秒間止めることができる。重力下では、血小板－リッチ血漿は環を通して（または疎水性フィルター９を通して）、第二チャンバー１０（図１から４の下部チャンバー）に入る。このチャンバーは、第一濃縮材チャンバーと同一としてもよい。
第一濃縮材チャンバーでは、開放型疎水性セル気泡体１５に静電的力で結合している（図１および３）、または遊離ビーズ２（図２）またはディスク（１つまたは複数）上に施されたビーズ１１（図４）のいずれかの濃縮材（例えば、デキストラノマーまたはポリアクリルアミド）と血小板－リッチ血漿とが接触するようになる。デキストラノマーおよびポリアクリルアミド濃縮材は、市販されている（それぞれファルマシアからSEPHADEXとして、およびバイオ-ラッドラボラトリーズ：Bio-Rad LaboratoriesからBIO-GEL Pとして）。あるいは、デキストラノマーまたはポリアクリルアミド吸収ビーズの代わりに、ビーズ状態またはディスクのSEPHADEXの湿度または水吸収体のような他の濃縮材（ファルマシアから市販されている）、他のポリアクリルアミド吸収体、シリカゲル、ゼオライト、デキストラミン、アルギン酸ゲル、澱粉、架橋アガロース等もビーズまたはディスク状で濃縮体として許容できる。
本質的に、水を吸収する（すなわち、水を吸収できるように十分に乾燥している）、および血液凝固に必須なタンパク質（例えば、フィブリノーゲンおよび第ＸIII因子）を変性させない任意の材料を濃縮材として使用でき、適当に選択した膜は、浸透圧勾配も利用できる。さらに、遠心機がオートクレーブ－様の能力（すなわち内容物を高温および／または1atm以外の大気圧で回転する能力）をもつ場合は、機械的な濃縮、例えば加温（例えば30-80℃、好ましくは35－60℃）または減圧／真空（例えば0.1-500トル、好ましくは1－200トル）は濃縮材を補助する。しかし、上記および以下に記載するビーズが好適な材である。
結果を最大にするために、遠心機を最初に遅く回転すると、濃縮材と血漿とを混合（すなわち接触）するのに役立つ。“遅い回転”とは、20rpmから500rpm、好ましくは100rpmから300rpmの遠心機の速度を言う。
多孔性壁７、８または１４の多孔性および疎水性は、生成する低遠心力が血漿を壁の上に持ち上げるに十分であるが、表面張力を克服するほど十分なものではなく、そして血漿は内面の区分に留まるようになっている。
ビーズ２は水、イオンおよび低分子量タンパク質５１で膨潤する（図５）。濃縮材ビーズ２の孔５２の大きさは、高分子量タンパク質５３がビーズの回りの空間で濃縮されるように選択される。特定の予め選択した分子量より大きい排除限界値を有するタンパク質濃縮用の市販されているビーズ濃縮材を使用できる。
タンパク質クロマトグラフィーにおける当該技術としては、“分子量排除限界”とは平均サイズで流通しているマトリックス（例えばSEPHADEX）中の孔を言う。例えば平均サイズよりも25-50％小さい部分（例えばタンパク質）は、ビーズ中に急速に拡散し、そして例えば平均サイズよりも25-50％大きい部分はビーズ中に拡散しない。例えば平均サイズの25-50％以内の大きさを有するタンパク質は、ビーズ中にゆっくりと拡散する（選択した特定のビーズに依存して）。したがって、10kDaの分子量排除限界を有するビーズは、図９のグラフに示すようにタンパク質を分子量に従って濃縮する。
その結果、本発明では“高分子量化合物”とは濃縮材の予め選択した分子量排除限界値よりも大きい分子量を有する化合物を言う。血漿中の高分子量タンパク質の例には、選択した分子量排除限界に応じて、フィブリノーゲンおよび第ＸIII因子を含む。好適な濃縮材材料は、100kDa、好ましくは30kDa、そしてより好ましくは5kDaの分子量排除限界値を有

するビーズまたは材料を含む。
血小板－リッチ血漿濃縮物は、元の血漿のすべての成分を元の濃度で（イオンおよび濃縮材の排除限界よりも低い分子量を持つ化合物）含むか、あるいは天然に存在する血漿よりも高濃度で（例えば、血小板および濃縮材の排除限界よりも大きい分子量を持つ化合物）むことに注目することは重要である。タンパク質濃縮物は、非濃縮血漿と同じイオン濃度を含む。
ビーズの量は、血小板－リッチ血漿が所望する量まで濃縮されるように、例えば３×（同じ容量中の緊密に密閉された小球の回りにある、予め定めた容量に達した濃縮レベル）に選択される。DEBRISAN（商標、ジョンソン　アンド　ジョンソン：Johnson and Johson）を使用した時、３倍に濃縮するために10ccの血漿あたり約2.6gmが必要である。
水および低分子量溶液を濃縮材中に吸収した後、回転速度を上昇させ（例えば1,000－10,000rpm、好ましくは約3,000rpm）、濃縮された血小板－リッチ血漿をフィルター１２から外部の区分に通させる。遠心を次に止め、そして重力で濃縮された血小板－リッチ血漿が底部ウェル１３に回収される。濃縮された血小板－リッチ血漿は、自然にゲル化または他の悪い影響を受けることなく、さらなる期間（例えば、時間）、静置しておくことができる。
直ぐに使用できる濃縮された血小板－リッチ血漿は、次に図６のようにシリンジ１６中に取り出すことができる。
したがって、本発明は組織を封止する方法にも関し、この方法は本発明の濃縮された血漿をアクチベーター（トロンビン／カルシウム溶液または以下に記載する破壊血小板のいずれか）と接触させて、活性化された血漿濃縮物を提供し、そして活性化された血漿濃縮物を封止が必要な組織に適用する工程を含んで成る。
組織封止法の１つの態様では、濃縮血漿を凝固させるために有効なトロンビンおよびカルシウム量を含む別に準備された溶液を、濃縮血漿と混合することができる（クリオ沈降したフィブリノーゲンに関する文献に記載された方法に従う）。いったん混合すれば、溶液および濃縮血漿は直ちにゲル化して組織封止材を形成する。これまでに説明されたいかなるものより優れている特徴を有する態様を、図７に示す。シリンジのバレル内で、トロンビンおよびカルシウム溶液を含む円筒状チャンバー３１が、濃縮された血小板－リッチ血漿を含む環状チャンバー３２に囲まれている。プランジャー３０は同軸針を通って溶液を装置から出し、３３（トロンビン）および３５（濃縮血漿）、そしてチップ３６で混合される。場合によってスリーブ３４は適切な混合を確実とし、そして未形成ゲルを容易に出すために収縮することができる。
さらなる別の態様では、フィブリノーゲンを活性化するように設計された針チップを使用して単一成分濃縮物（すなわち、濃縮血漿）をトロンビンを加えることなく適用するために使用できる。この態様では、カルシウムが、濃縮物の適用直前または適用中に、封止が必要な組織に加えられる。図８は、アクチベーターカートリッジ２２により分かれているシリンジ２１およびアプリケーター針２３を示し、血小板－リッチ血漿が固定化されているタンパク質溶解酵素、例えばウシトロンビンにより活性化されるためにアクチベーターカートリッジ２２を通る。
さらに別の態様では、血小板を破壊するように設計された針チップは、トロンビンを使用することなく１成分濃縮物（すなわち、濃縮血漿）を適用するために使用することができる。この態様では、カルシウムが濃縮物の適用直前、または適用中に封止が必要な組織に加えられる。図８は、アクチベーターカートリッジ２２により分断されているシリンジ２１およびアプリケーター針２３を示し、血小板－リッチ血漿が例えばナイロンウールにより活性化されるためにアクチベーターカートリッジ２２を通る。
本発明は、血小板－リッチ血漿を濃縮するための装置に関し、この装置は、
入口、
入口と流路連絡している第一チャンバー、これは全血液から血漿および血小板を分離するための第一分離材を含み、これにより血小板－リッチ血漿を生成し、
第一チャンバーと流路連絡している第二チャンバー、これは血小板－リッチ血漿を濃縮す

るための濃縮材および濃縮材から濃縮された血小板－リッチ血漿を分離するための分離材を含む、および
濃縮された血小板－リッチ血液を引き出すための出口、
を含んで成る。
さらなる態様では、第一分離材は表面張力下で中に赤および白血球細胞をトラップする開放型セル疎水性気泡体を含んで成る。
さらなる態様では、第一分離材は遠心力で赤および白血球細胞を通すことができるが、遠心力が無ければ赤および白血球細胞を通せない多孔性プラスチック壁を含んで成る。
さらなる態様では、第一分離材は第一チャンバーの頂部に赤および白血球細胞を外側環中に通し、そして血漿から分離し、遠心が停止した時に重力により維持さすることができる環を含んで成る。
さらなる装置の態様では、濃縮材はペーパーディスクまたは複数のディスク（任意の市販されている材料）上に埋め込まれるか、静電力により、または他の力により開放型セルマトリックスに付いていてもよい。
多くの本カートリッジの好適態様の設計が構成されている（例えば図１から４）。第一および第二チャンバーの設計は大きく独立しており、そして所望により単一のカートリッジに組み合わせてもよい。示したすべての４つの設計は、少なくとも１つの濃縮チャンバーと流路連絡している少なくとも１つの分離チャンバーを有する。
最適な態様、図１は血漿を細胞から分離するために開放型セル疎水性気泡体１４を使用し、そして開放型セル気泡体１５中に静電的力により保持されているビーズにより血漿を濃縮する。図２に示す別の好適態様では、焼結プラスチックバリアー８による血漿分離、そして溝２に分布するビーズによる血漿濃縮を使用する。図３に示す別の好適態様では、環状チャンバー１６による血漿分離、そして開放型セル気泡体１５内に静電的力により保持されているビーズによる血漿濃縮を使用する。図４に示す別の好適態様では、フェルトマット７による血漿分離、そしてプラスチックディスク１２中に含浸されているビーズによる血漿濃縮を使用する。
各々の分離材を各々の濃縮材と使用できる。４種の分離材を３種の濃縮材と組み合わせて、１２種類の使い捨てカートリッジを構成することが可能であることに注目されたい。
Ａ．開放型セル疎水性気泡体血漿分離材および開放型セル疎水性気泡体濃縮材中のデキストラノマービーズ
図１において、準備ができたカートリッジを右半分に表し、そして左半分に流路を点線矢印で示す。全血の入口５を除いて、チャンバー全体は対称的である。受容カップ６は、遠心力が血液をフィルター４に通すまで血液を保持する。分離チャンバー内で、遠心力により細胞が開放型セル疎水性気泡体１４を通過し、そしてそこに蓄積する；連続した遠心力により、細胞を開放型セル気泡体の環中に移動させ、そして血小板－リッチ血漿を分離チャンバー内に残すようにする。開放型セル疎水性気泡体１４は、流体および小粒子が自由に流れることを可能にするハチの巣－様の疎水性材料である（例えば、開放型ポリウレタン気泡体）。濡れたスポンジのように、表面張力による特定の圧力ヘッドに対して、気泡体は液体を保持する。したがって、血液細胞および他の懸濁粒子は、遠心が止まった時に気泡体内にトラップされて留まり、そして分離された血小板－リッチ血漿が重力下で表面から流れ出る。気泡体は硬質または柔軟のいずれかであることができ、そして成型または打ち抜きによりデバイスの適当な環状形に形成することができる。この部分は詰め込まれた細胞（例えば赤血球および白血球）層が、遠心を止めた時に外側の開放型セル気泡体チャンバー内に完全に含まれ、細胞を保持するような大きさになっている。
濃縮は、血小板－リッチ血漿が濃縮チャンバー１０内の濃縮材ビーズ２（例えば、デキストラノマー）に接する時起こる。これらのビーズは、クロマトグラフィーに使用されるモレキュラーシーブ（ファルマシアから販売されているSEPHADEX；バイオ－ラッドラボラトリーズから販売されているBIO-GEL P）およびデブリッジング（debriding）（J&Jから市販されているDEBRISAN）でよく、あるいはシリカゲル、ゼオライト、デキストラミン、アルギン酸ゲル、澱粉、架橋アガロース等を含んで成ってもよい。DEBRISANはSEPHADEX G-2

5に類似し、そして両方とも市販されている。
このビーズは静電的力により、開放型セル疎水性気泡体１５の表面に保持されている。開放型セル疎水性気泡体１５は、ハチの巣－様の疎水性材料である。血小板－リッチ血漿が濃縮チャンバー１０に入った時、カートリッジ１を緩やかに回転させて血小板－リッチ血漿を濃縮材ビーズ２と混合させる。流体が開放型気泡体１５に浸透すると、ビーズは気泡体に対する親和性を失い、そして膨潤するようになる。気泡体１５は気泡体１４と同じ材料で作成でき（例えば、開放型セルポリウレタン）るが、異なる多孔度を持っていてもよい。気泡体１４および１５の多孔性は、保持される粒子の大きさおよび／または種類に基づき経験的に選択される。市販されている開放型セルは、３次元のポリウレタン気泡体であり、多孔性は密度に相関することが知られている（これは例えば１立方フィートあたりの重量で測定される）。
数分後（例えば１－10分、好ましくは３－５分）、濃縮が完了する。約３倍の濃縮は、ぎっしりと詰まった小球の回りの流体に相当し；したがって３倍濃縮が最適であることに注目されたい。３倍以上の濃縮は可能であるが、最高の結果を得るためには、第一チャンバー内で濃縮された血漿のさらなる濃縮のために、第二の濃縮チャンバーを使用すべきである。したがって、２つの濃縮チャンバーを含む３－チャンバーカートリッジは９倍の濃縮が可能である。
濃縮が完了した時、遠心機の回転速度を上げ、そして遠心力を増加させて、濃縮血小板－リッチ血漿が疎水性環１２を通過するようにする。焼結プラスチック１２（例えば、POREX）は、融合して多孔性構造を作成しているプラスチックの小粒子から成る。流体および小粒子は、材料が湿った時、融合プラスチック粒子間の空間により定められる曲がりくねった通路を自由に流れることができる。プラスチックが特別に形成または処理されていなければ、焼結プラスチックは疎水性であり、そして乾燥状態で水の流入に対して抵抗がある時、通路の大きさはより大きく減少するだろう。この“流入圧”の特性により、疎水的な多孔性壁の表面が実質的な流体の材料中への移入無しに濡れることが可能になる。より大きな圧力、すなわち遠心速度を増大した時、この抵抗力を克服して流体がバリアーを通って入り、そして多孔性壁を通過する。
遠心を止め、そして濃縮された血小板－リッチ血漿は重力下で底に流れ、そして図６のフィルター１３を通って直ぐに取り出せる。
最後に、濃縮カップ１０は、下部チャンバーから上部チャンバーに排出するための逆さ漏斗のような形であり、下部チャンバーからの空気を血漿と交換できることに注目されたい。
Ｂ．疎水的な多孔性壁の血漿分離材および遊離のデキストラノマービーズ濃縮材
図２において、準備ができているカートリッジを右半分に表し、そして左半分に流路を点線矢印で示す。全血の入口の隔壁５除いて、チャンバー全体は対称的である。受容カップ６は、遠心力が血液をフィルター４に通すまで血液を保持する。分離チャンバー内で、遠心力は細胞をフィルター８の入り組んだ水路を通過させ、そして外側環に蓄積させる。フィルター８（例えば80μ POREX）は融合して多孔性構造作るプラスチックの小粒子から成る。流体および小粒子は、材料が湿った時、融合プラスチック粒子間の空間により作られる曲がりくねった通路を自由に流れることができる。プラスチックが特別に形成または処理されていなければ、焼結プラスチックは疎水性であり、そして乾燥状態で水の流入に対して抵抗がある時、通路の大きさはより大きく減少するだろう。この“流入圧”の特性により、疎水的な多孔性壁の表面が実質的な流体の材料中への移入無しに濡れることが可能になる。より大きな圧力、すなわち遠心速度を増大した時（例えば1000-10,000rpm以上）、この抵抗力を克服して流体がバリアーを通って入り、そして多孔性壁を通過する。これにより血漿および血小板をチャンバー内に残す。この部分は詰め込まれた細胞（例えば赤血球および白血球）層が、フィルターおよび外環内に含まれるような大きさである。遠心を止め、そして血小板－リッチ血漿が親水性の漏斗フィルター９を通る時、細胞をフィルター８を通過させるのに重力では不十分であり、そして分離チャンバー内に戻る。
親水性の漏斗フィルター９は、上部および下部区分を分け、ゆるいビーズが輸送および取

り扱い中に上部区分に紛れ込まないようになっている。この材料は、例えばフィルター８で使用したものと同様であるかもしれない。血液細胞を分離した後、血漿から遊離する排液を下部区分に排出する（重力による）ほどは高くない流入圧のオーダーであるが、この材料は好ましくはビーズを濃縮チャンバー１０にトラップするために十分小さい効果的な多孔性を有する。さらに流入圧を減少するために、この材料は最も望ましくは、より親水性となるように処理されるだろう（例えば血漿またはコロナ処理、あるいは表面活性剤との混合またはその被覆）。

濃縮は、血小板－リッチ血漿が濃縮チャンバー１０内の濃縮材ビーズ２に接する時起こる。これらのビーズは、クロマトグラフィーに使用されるモレキュラーシーブ（ファルマシアから販売されているSEPHADEX；バイオ－ラッドラボラトリーズから販売されているBIO-GEL P）およびデブリッジング（debriding）（J&Jから市販されているDEBRISAN）でよく、あるいはシリカゲル、ゼオライト、デキストラミン、アルギン酸ゲル、澱粉、架橋アガロース等を含んで成ってもよい。DEBRISANはSEPHADEX G-25に類似し、そして両方とも市販されている。

このビーズはチャンバー内に密閉されているが、輸送中に不均一に分布するようになっているかもしれない。親水性フィルター９がビーズを濃縮チャンバー１０に維持している。全血液を加えた直後に、カートリッジを緩やかに回転させ、そして反対に数分回転させてビーズを縁３の後に均一に分布させる。

血小板－リッチ血漿が濃縮チャンバー１０に入った後、カートリッジ１を緩やかに回転させて血小板－リッチ血漿を濃縮材ビーズ２と混合する。最高の結果を得るためには、タンパク質が各ビーズの回りで部分的に濃縮され、吸収を遅らせる傾向があるために、運動でスラリーを維持することが重要である。数分後（例えば、１－１０分、好ましくは３－５分）、濃縮が完了する。約３倍の濃縮は、ぎっしりと詰まった小球の回りの流体に相当し；したがって３倍濃縮が最適であることに注目されたい。３倍以上の濃縮は可能であるが、最高の結果を得るためには、第二の濃縮チャンバーを使用すべきである。したがって、２つの濃縮チャンバーを含む３－チャンバーカートリッジは９倍の濃縮が可能である。

濃縮が完了した時、遠心機の回転速度を上げ、そして遠心力を増加させて、濃縮血小板－リッチ血漿が疎水性環を通過するようにする。最後に遠心を止め、そして濃縮された血小板－リッチ血漿は重力下で底に流れ、直ぐに取り出せる。

最後に、濃縮カップ１０は、下部チャンバーから上部チャンバーに排出するための逆さ漏斗のような形であり、下部チャンバーからの空気を血漿と交換できることに注目されたい。

Ｃ．環状チャンバー血漿分離材および開放型セル疎水性気泡体濃縮材中のデキストラノマービーズ

図３において、多くの点で図１と同様に、準備のできたカートリッジを右半分に表し、そして左半分に流路を点線矢印で示す。全血の入口の隔壁５除いて、チャンバー全体は放射状に対称的である。受容カップ６は、遠心力が血液をフィルター４に通すまで血液を保持する。分離チャンバー内で、遠心力は細胞を縁１６の上を通って外側環状チャンバーに通過させ、そしてそこに蓄積させる；連続的な遠心力で、細胞が外側環に移動し、そして血小板－リッチ血漿が分離チャンバー内に残るようにする。この部分は詰め込まれた細胞（例えば赤血球および白血球）層が、外側の環状チャンバー内に完全に含まれるような大きさであり、遠心を止めた時細胞を保持する。遠心を止めた時、血小板－リッチ血漿は濃縮チャンバー１０に流れる。

濃縮は、血小板－リッチ血漿が濃縮チャンバー１０内の濃縮材ビーズ２に接する時起こる。これらのビーズは、クロマトグラフィーに使用されるモレキュラーシーブ（ファルマシアから販売されているSEPHADEX；バイオ－ラッドラボラトリーズから販売されているBIO-GEL P）およびデブリッジング（debriding）（J&Jから市販されているDEBRISAN）でよく、あるいはシリカゲル、ゼオライト、デキストラミン、アルギン酸ゲル、澱粉、架橋アガロース等を含んで成ってもよい。DEBRISANはSEPHADEX G-25に類似し、そして両方とも市販されている。

図１に示すように、このビーズは静電的力により開放型セル疎水性気泡体１５の表面に保持されている。開放型セル疎水性気泡体１５は、ハチの巣－様の疎水性材料である。血小板－リッチ血漿が濃縮チャンバー１０に入った後、カートリッジ１を緩やかに回転させて血小板－リッチ血漿を濃縮材ビーズ２（デキストラノマー）と混合させる。流体が開放型気泡体１５に浸透すると、ビーズは気泡体に対する親和性を失い、そして膨潤するようになる。最高の結果を得るためには、タンパク質は各ビーズの回りで局部的に濃縮され、吸収を遅くする傾向があるので、運動デスラリーを維持することが重要である。数分後、濃縮が完了する。約３倍の濃縮は、ぎっしりと詰まった小球の回りの流体に相当し；したがって３倍濃縮が最適であることに注目されたい。３倍以上の濃縮は可能であるが、最高の結果を得るためには、第二の濃縮チャンバーを使用すべきである。したがって、２つの濃縮チャンバーを含む３－チャンバーカートリッジは９倍の濃縮が可能である。

濃縮が完了した時、遠心機の回転速度を上げ、そして遠心力を増加させて、濃縮血小板－リッチ血漿が疎水性環１２を通過するようにする。焼結プラスチック１２はPOREXから作られ、融合して多孔性構造を作成しているプラスチックの小粒子から成る。流体および小粒子は、材料が湿った時、融合プラスチック粒子間の空間により作られる曲がりくねった通路を自由に流れることができる。プラスチックが特別に形成または処理されていなければ、焼結プラスチックは疎水性であり、そして乾燥状態で水の流入に対して抵抗がある時、通路の大きさはより大きく減少するだろう。この“流入圧”の特性により、疎水的な多孔性壁の表面が実質的な流体の材料中への移入無しに濡れることが可能になる。より大きな圧力、すなわち遠心速度を増大した時（例えば、1000-10,000rpm以上）、この抵抗力を克服して流体がバリアーを通って入り、そして多孔性壁を通過する。

遠心を止め、そして濃縮された血小板－リッチ血漿は底に流れ、そして図６のフィルター１３を通って直ぐに取り出せる。

最後に、濃縮カップ１０は、下部チャンバーから上部チャンバーに排出するための逆さ漏斗のような形であり、下部チャンバーからの空気を血漿と交換できることに注目されたい。

Ｄ．繊維状マトリックス血漿分離材およびデキストラノマー－含浸ディスク濃縮材

図４は、多くの点で図１と同様である。準備のできたカートリッジを右半分に表し、そして左半分に流路を点線矢印で示す。隔壁５（全血の入口）を除いて、チャンバー全体は放射状に対称的である。

分離は細胞をフェルトまたは気泡体マット７に通すことにより行われる。この部分は詰め込まれた細胞（例えば赤血球および白血球）層が、フェルトまたは気泡体フィルター内に完全に含まれるような大きさであり、遠心を止めた時細胞を保持する。

この設計では、デキストラノマービーズの均一な分布が、デキストラノマービーズを埋め込んだプラスチックディスクを使用することにより確実になる。これはプラスチックを加熱または溶媒で柔軟にした後、デキストラノマービーズを浸すか、または接着剤を用いてビーズをプラスチックに固定することにより行うことができる。ビーズが膨潤すると、ディスクからはずれる。濃縮された血小板－リッチ血漿の分離は、上記記載の本発明の濃縮血小板－リッチ血漿の作成法のように行われる。

Ｅ．使い捨てカートリッジの製造法

カートリッジを含んで成る種々の硬質プラスチック成分が射出成型により、あるいは加圧または真空－形成により製造され、そして従来の方法により集成されて密閉されている（例えば、接着剤または溶接による）。図１から４で、プラスチック製作の当業者には、製造が比較的簡単で廉価であることが明らかであろう。最終的に集成された製品は包装、照射滅菌され、そして輸送する準備ができる。

Ｆ．血漿濃縮物、血小板－リッチ血漿濃縮物および組織封止材

本発明は、本方法により調製された血漿濃縮物にも関する。この血漿濃縮物は、血小板－リッチ、血小板－欠乏または血小板を含まなくてもよいが（すなわち、血小板濃度は制限されない）、好ましくは血小板－リッチである。血小板の濃度は、既知の方法および／または既知の血小板沈降挙動に従い、沈降速度により制御できる。好ましくは、血漿濃縮物

は自系のものである（全血液を採血した患者に適用する）。
１つの態様では、本血漿濃縮物は血小板、5-400mg/mlのフィブリノーゲン、0.5－35mg/mlのフィブロネクチンおよび生理的に許容できるキャリアー（水および生理的に許容できる無機および有機イオンを生理的に許容できる濃度で含んで成る）を含んで成る。好適な態様では、血漿濃縮物は全血液から調製され、そして血小板は同じ全血液からの未濃縮血漿中の血小板濃度と比較して、少なくとも1．5倍に濃縮される。
本血漿濃縮物は、抗生物質、コラーゲンフリース、コラゲナーゼ、ヒアルロン酸、創傷－治癒因子、亜鉛イオンを該血漿の凝固時間を短くするために有効な量で、ならびに生物的に許容できる色素から成る群から選択される化合物をさらに含むことができる。好適な生物的に許容できる色素は、ジスルフィンブルーであり、組織に適用中に血漿濃縮物を目で検出するために十分な量で含まれる。好適な態様では、血漿濃縮物はさらに医薬的に活性な化合物、特に抗生物質を外来微生物の感染の可能性を減じるために含んで成る。
また本発明は、本血漿濃縮物およびアクチベーターを含んで成る組織封止材に関する。好ましくは本組織封止材中の血漿濃縮物は、血小板－リッチ血漿濃縮物である。
本組織封止材の１つの態様では、アクチベーターは血漿濃縮物をゲル化を可能にするために十分な量のトロンビンとカルシウムの混合物である。さらなる態様では、アクチベーターは自系のトロンビンおよび血小板である。
Ｇ．２成分フィブリン封止材を混合するための装置および方法
２つの成分（例えば、濃縮血小板－リッチ血漿およびカルシウム／トロンビン溶液）を含む平行のシリンジは、適用部位で混合する同軸針に集まり、これにより未成熟のゲル化を防ぐ；図７を参照にされたい。シリンジのバレル中で、トロンビンおよびカルシウム溶液を含む円筒状チャンバー３１が、濃縮血小板－リッチ血漿を含む環状チャンバー３２に囲まれている。プランジャー３０は、同軸針を通して溶液を装置から出し、そしてチップ３６で混合する。場合によってはスリーブ３４が適切な混合を確実にし、そして未成熟ゲルを容易に出せるように収縮することができる。
Ｈ．血小板－リッチ血漿濃縮物のための分配器／アクチベーター
フィブリン封止材のほとんどの使用者が、ゲル化を誘導するためにウシトロンビンの使用を頼りにして来た。本発明の好適な態様では、最終調製物中にウシのタンパク質を過剰に使用することは避けることが望ましい。したがって、自系触媒的活性化を引き出すために、少量のウシまたは他の血栓形成酵素を使用する本方法および装置が構成される。図８はアクチベーターカートリッジ２２により分けられたシリンジ２１およびアプリケーター針チップ２３を示し、固定化されたトロンビンにより活性化されるために、アクチベーターカートリッジ２２を通って血小板－リッチ血漿がフィブリノーゲンをフィブリンに転換される。
さらなる別の態様では、血小板を破壊するように設計された針チップが、トロンビンを使用することなく１成分濃縮物（すなわち、濃縮血漿）を適用するために使用することができる。図８はアクチベーターカートリッジ２２により分けられたシリンジ２１およびアプリケーター針チップ２３を示し、、血小板－リッチ血漿が例えばナイロンウールにより活性化されるためにアクチベーターカートリッジ２２を通る。この態様では、カルシウムが濃縮物の適用直前、または適用中に封止が必要な組織に加えられる。
多孔性膜または排除体積に対して高い露出表面比を有する他の材料は、トロンビンまたは他の血栓形成性もしくはトロンビン－様酵素を用いて、周知方法により誘導できる。誘導化された膜は、シリンジとアプリケーター針との間に備えつけられる。
別の、しかし関連している態様では、ガラスウール、ナイロンウールまたはコラーゲンスポンジもしくは他の材料を同様な配置で使用して、凝固を開始すると知られている外転を引き起こすことができる。
別の、しかし関連している態様では、濃縮血漿を冷たく維持し、ゲル化を防ぐ。適用後、生組織を熱してゲル化を開始する。
従来の沈降法の大きな問題は、フィブリノーゲンが再構成されなければならないことである。これは難しく、かつ時間を要し、そして比較的低濃度のみが達成できるだけである。

したがって、本発明はより迅速な利用性を可能にするだけでなく、外科医は“これが出血している”と定め、そして１５分以内に封止することができる。これまでの技術では、外科医は手術を始める前にフィブリン接着剤を注文する必要がある。
本発明の濃縮血小板－リッチ血漿は、必要であれば、ゲル化すること無くデバイス中に必要になるまで数時間おいておくことができる。
他の自系沈降法は、処理時間のための時間を得るために数日前に採血する必要がある。不便であるうえに、この方法はトラッキングエラーおよび感染の可能性がある。
一般的に、アプロチニンのようなタンパク質溶解インヒビターが、フィブリン接着材のフィブリノーゲン成分に加えられる。（学問的な見解では、実際、これが必要なのかどうか別れている；必要性がこれまでに正確に証明されたことはない。）濃縮ＰＲＰを生成する本方法は、沈降段階で明らかに失われる自然なインヒビターを保持している。
新鮮な血漿からのフィブリノーゲンは、機械的に優れたゲルを生成する（沈殿により障害を受けた一般的なタンパク質の特性に基づく）。血小板（本血漿濃縮物に含まれる）は、創傷治癒に有用である（多数の文献がある）。したがって、本方法の利点は、血小板を含まない従来のフィブリン接着材よりもより良い創傷治癒を提供する。
特に米国の外科医は、現在の組織封止材を“活性化”するためにウシトロンビンを使用するようである。これはウシ トロンビンが市販されており、そして外科術に日常的に使用されているので、規制的問題ではない。しかし本発明は、凝固が濃縮血漿中の１つ以上の成分により始まるように、濃縮血小板－リッチ血漿中に存在するプロトロンビンを活性化し、かつ／または血小板を破壊する分配器を提供する。
本組織封止材および自系組織封止材は、創傷を密閉するのみならず、障害を受けた構造に接着する。特に、本自系組織封止材は患者自身の生きている栓球および創傷治癒因子を含み、したがって治癒過程に栄養を与える。本組織封止材の他の利点は、（ｉ）障害を受けている組織への接着を向上し、そして（ii）細胞浸潤を促進する付着因子の存在である。
患者自身の血液から作られる本発明の自系組織封止材において、重要な利点には容易さ、スピードおよび調製の簡便性がある（これは使用直前に手術室で調製することができる。）さらに、場合によっては本発明の自系組織封止材中にはウシ トロンビンが存在せず、免疫系および外来生体反応を回避し、そして疾患の伝播を排除する（すなわち、ウシ トロンビン源に由来する）。
Ｉ．懸濁液からの粒子を分離するための分離材および方法
本発明のさらなる観点では、懸濁液からの粒子を分離するための分離材および一般的な方法が構成さている。生物の流体（血液および血漿のような）から粒子を分離することは、研究室における共通の課題である。分離チャンバー（すなわち、本濃縮血漿を調製するため使用する装置中の第一チャンバー）を含む使い捨てカートリッジは、細胞の、および稠密な粒子（基本的には遠心力に反応して動く何でも）を分離することができる。
したがって、液体懸濁液から粒子を分離する本装置は；
入口、
入口と流路連絡している第一チャンバー、これは液体懸濁液から粒子を分離するための第一分離材を含み、これにより粒子を含まない液体を形成し、および
液体の引き出すための出口、
を含んで成る。
“粒子を含まない液体”は、実質的に不溶性粒子が無いものであり、好ましくは予め定めた値より大きい平均サイズ（例えば500から20μ、あるいはフィルターまたは他のデバイスがそのような不溶性粒子を除去できる任意の値；例えば250μ、100μ、80μ、50μ等）を有する粒子を含まない。
Ｊ．巨大分子溶液を濃縮するための濃縮材および方法
さらに本発明の観点では、本濃縮血漿を調製するための装置に使用する濃縮材（または第二チャンバー）の設計に基づき、巨大分子溶液を濃縮するための濃縮材および方法を構成する。例えばSEPHADEX（商標、ファルマシア）は、巨大分子を濃縮するためにはめったに使用されない。このデバイスは、乾燥するまで濃縮できないが、タンパク質（または任意

の高分子量溶液）を、装置内の濃縮材チャンバー数に応じて、好ましくは３倍に、または３倍の倍数で濃縮するために有用である。
したがって、予め定めた値（すなわち巨大分子溶液）よりも大きい分子量を有する物質溶液を濃縮するための本装置は、
入口、
入口と流路連絡しているチャンバー、これは溶液を濃縮するための濃縮材および濃縮材から溶液を分離する分離材を含み、および
濃縮された溶液を引き出すための出口、
を含んで成る。
本発明の他の特徴は、制限するものではなく説明を目的とする以下の実施例態様により明らかになるだろう。

実施例１

図１、２、３または４のいずれか、および以下の方法に示されるカートリッジを使用して、濃縮された血小板－リッチ血漿および組織封止材を調製できる：
Ｉ．標準的なクエン酸塩抗凝固剤を使用する、患者からの採血
II．標準量の血液（例えば50cc）を、使い捨てカートリッジの血液の入口から注入。このカートリッジを混入が不可能なように密閉する。トラッキングエラーが生じないように、手術室で使用される。
III．次に操作者は、プッシュ－ボタンによりマイクロプロセッサー－制御遠心を開始する。濃縮物を取り出すまでのすべての残りの工程は自動的である。
IV．（任意に遊離の濃縮材ビーズを組み込む段階を含む場合、図２）遠心ローターを簡単に時計回りに、そして次に反時計回りに数分間、遊離のデキストラノマービーズが濃縮材カップの縁の外側に均一に分布するために十分な速度で遠心する。
Ｖ．遠心を3,000rpmで1から10分間回転して、血小板－リッチ血漿を細胞から分離する。全血は血液受容チャンバーの孔を通って分離チャンバーに入る。
VI．遠心を15－90秒間停止する。重力により、血小板－リッチ血漿が下部チャンバーに、または濃縮材チャンバーに入る（場合によっては、図２のように遊離ビーズが濃縮材チャンバーに存在する場合は適当に、親水性フィルターを介して通す）。
VII．濃縮材チャンバー中で血小板－リッチ血漿が、開放型セル気泡体に静電的力で結合しているビーズと（図１および３のカートリッジ）、遊離濃縮材ビーズと（図２のカートリッジ）、またはディスク上にはめ込まれたビーズと（図４のカートリッジ）と接触する。遅い遠心により混合を補助する。多孔性壁の多孔性および疎水性は、生成する遠心力が表面張力を克服するには十分でない程度であり、そして血漿が内面の区分内に残る。ビーズが水、イオンおよび低分子量タンパク質（すなわち、排除限界値未満の分子量を有するタンパク質）で膨潤する。ビーズの孔の大きさは、タンパク質がビーズの回りの空間で濃縮するように選択されている。ビーズ量は、血小板－リッチ血漿が所望の量に濃縮されるように選択され、例えば３×である。DEBRISANを使用するとき３倍濃縮するためには、約2.6gmが10ccの血漿に必要である。タンパク質濃縮物は未濃縮血漿と同じイオン濃度を含む。
VIII．回転速度を上昇させて、濃縮血小板－リッチ血漿をフィルターを通して外側区分にむける。
IX．遠心を止め、そして重力により、濃縮血小板－リッチ血漿を底に集める。濃縮血小板－リッチ血漿を、さらにある期間（時間）、自然にゲル化することなくそのまま静置しておくことができる。
Ｘ．濃縮血小板－リッチ血漿をシリンジ中に引き出す。
XI．（場合に応じて）トロンビン／カルシウム溶液を別個に調製する。
XII．クリオ沈降したフィブリノーゲンに関する文献に記載されている様々な方法を使用して、２つの溶液を混合し、そして急速にゲル化して組織封止材を形成する。
ＸIII．（場合に応じて；XIおよびXIIに代えて）血小板を破壊するよう設計された針チップを使用して、１－成分濃縮物をウシ トロンビンを使用することなく適用できる。

本発明の組織封止材およびクリオ沈降したフィブリンから調製した組織封止材の特性の比較を以下の表に示す：

表：組織封止材組成物の濃縮物

血液成分	沈降フィブリン接着剤	自系濃縮ＰＲＰ（３×）
イオン	再構成溶液による	患者血漿と同一
血小板	無し	３×血漿濃度
タンパク質	クリオ沈降するタンパク質のみ；フィブリノーゲン第ＸＩＩＩ因子、フィブロネクチン、アルブミンプラスミノーゲン	正常時のすべての血漿タンパク質(5KDa未満)または３×正常濃度（5kDaより大きい）
アルブミン	10-25mg/ml	100-165mg/ml
第ＸＩＩＩ因子	75μg/ml	36-60μg/ml
フィブリノーゲン	70-110mg/ml	5-14mg/ml
フィブロネクチン	2-9mg/ml	0.5-1.2mg/ml
プラスミノーゲン	20-60μg/ml	600μg
アプロチニン	1,500KIU/ml	0 KIU/ml

本発明の組織封止材は、クリオ沈降フィブリン組織封止材と同様の引張強さを示す。フィブリノーゲンおよび他の重要なタンパク質が本方法により破壊されていないので、本発明の組織封止材により提供される接着強度はクリオ沈降組織封止材よりも優れていると考えられる。

本発明の鍵となる利点は、血小板の存在である。血小板のコラーゲンIIIフィブリルへの接着が血小板凝集を導き、これは血小板から放出される５－ヒドロキシトリプタミンおよびエピネフリンにより促進される。他の増殖および治癒因子は、血小板により放出される。血小板－由来増殖因子は、繊維芽細胞および平滑筋細胞のマイトジェンである。血小板因子は、特に領域が無酸素症である時、新血管新生を刺激する。血小板はまた、フィブリンを機械的剪断力に対して、およびフィブリン溶解に対してより耐性にする。

特定の応用では、血小板数が少ないほうが望ましいことがある。本発明はこの目的を達成するために調整できる。他の血液細胞に比べて、血小板の低質量により、条件を全血からより重い細胞塊を最小限に分離するように選択した時、最終生成物中に血小板が優勢に存在することを防げる。例えば、図２に示すような、１－インチ高、そして焼結プラスチック壁を有する４－インチ直径のカートリッジは、2,000rpmで３分間遠心した時、50ccの全血からほとんどの血液細胞を分離する。速度を5,000rpmそして時間を15分間に上げることにより、ほとんどの血小板も多孔性壁を通過して沈降し、血小板が減った血漿を得る。そのような血小板減少血漿は、例えばもし血漿またはそれに由来する濃縮物が、滅菌サブミ

クロン膜を通す濾過により処理されて、最終生成物をさらに保存（日）するために適するようにする場合に望ましい。
明らかに、本発明の多くの改良および変更が、上記の教示から可能である。したがって、添付の特許請求の範囲内で、本明細書に特別に記載した以外にも本発明を実施できると考えられる。
４５．例えばDelRossi,A.J.,A.C.Cernaianu,R.A.Vertrees,C.J.Wacker,S.J.Fuller,J.Cilley Jr.およびW.A.Baldino.“血小板-リッチ血漿は心肺機能回復バイパス後の術後の血液損失を減少させる（Platlet-rich plasma reduces postoperative blood loss after cardiopulmonary bypass）”。J Thorac Cardiovasc Surg 100（2 1990）:281-6。

【図１】

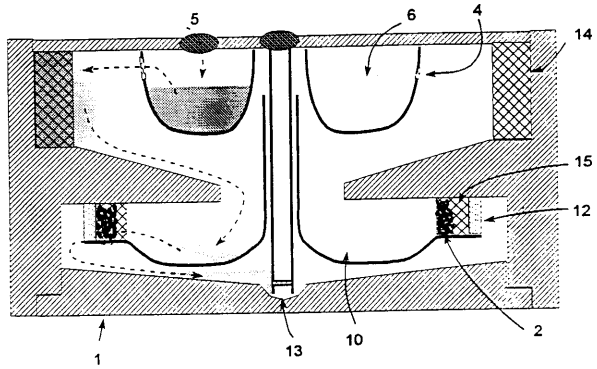


Figure 1.

【図２】

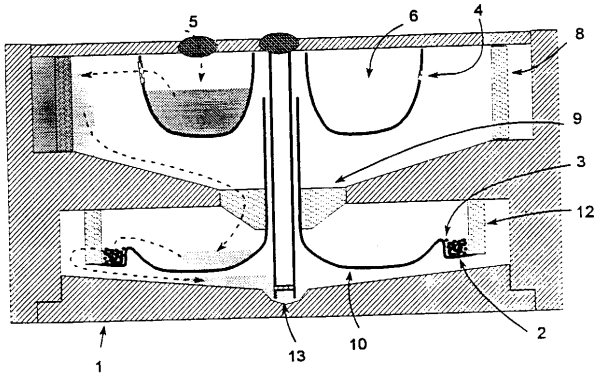


Figure 2.

【図３】

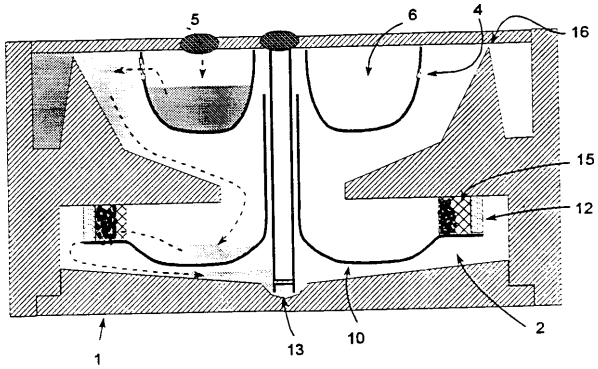


Figure 3.

【図４】

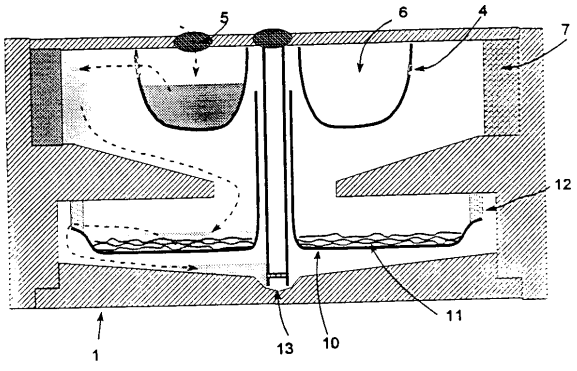


Figure 4.

【図５】

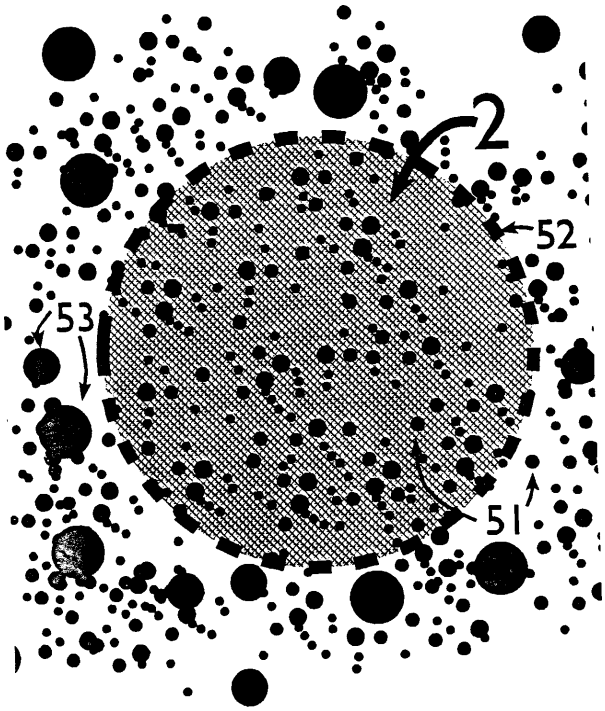


FIGURE 5

【図６】

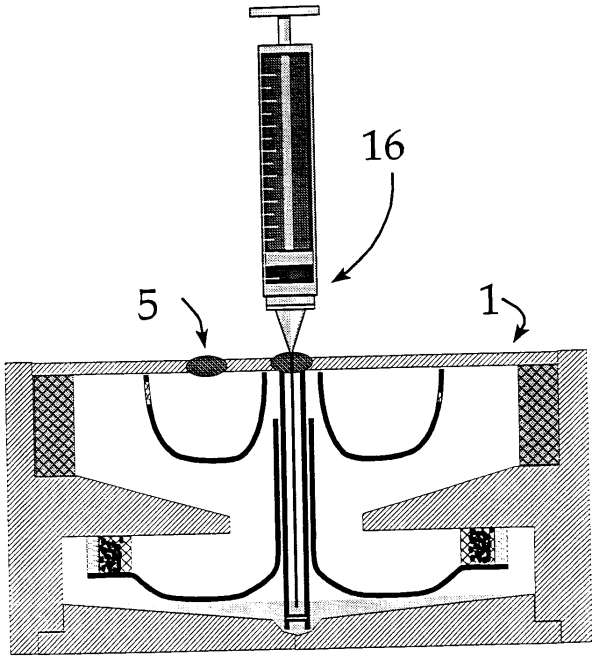


Figure 6.

【図７】

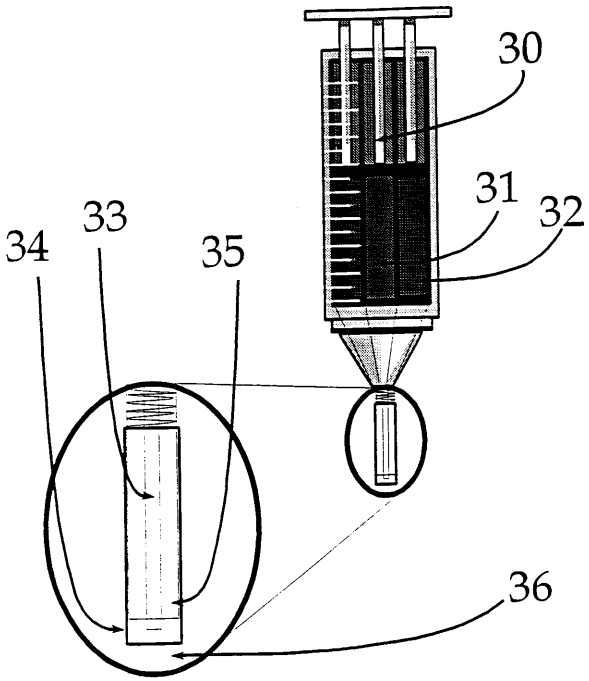


Figure 7.

【図８】

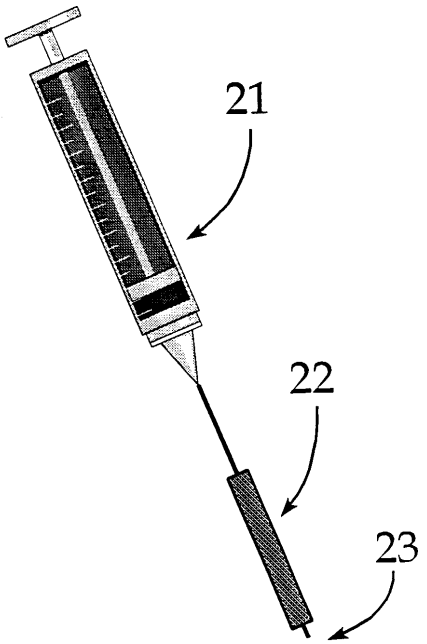


Figure 8.

【図９】

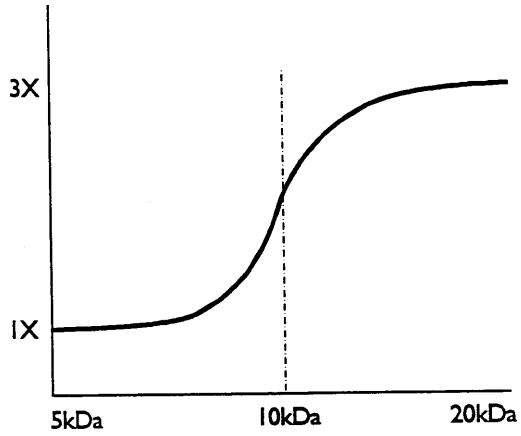


FIGURE 9

フロントページの続き

合議体
審判長　内田　淳子
審判官　上條　のぶよ
審判官　穴吹　智子

(56)参考文献　国際公開第９４／０７５４８（WO，Ａ１）
米国特許第５２２６８７７（ＵＳ，Ａ）
特開平２－３６８７２（ＪＰ，Ａ）
米国特許第４４２７６５０（ＵＳ，Ａ）
特開平２－７１７４７（ＪＰ，Ａ）
米国特許第４７１４４５７（ＵＳ，Ａ）
米国特許第５１８５００１（ＵＳ，Ａ）
米国特許第４３２２２９８（ＵＳ，Ａ）
米国特許第５１５２９０５（ＵＳ，Ａ）
特表昭５９－５０１５３８（ＪＰ，Ａ）
特開平２－１２９２２４（ＪＰ，Ａ）
特開昭６０－２５００１４（ＪＰ，Ａ）

(58)調査した分野(Int.Cl.，ＤＢ名)
A61K 35/14
A61K 38/00
CAPlus(STN)
WPIDS(STN)