

(19) 日本国特許庁(JP)

**再公表特許(A1)**

(11) 国際公開番号

**W02007/043698**

発行日 平成21年4月23日(2009.4.23)

(43) 国際公開日 **平成19年4月19日(2007.4.19)**

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
<b>AO1N 1/02 (2006.01)</b>	AO1N 1/02	4H011

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 17 頁)

出願番号	特願2007-540229 (P2007-540229)	(71) 出願人	000149435 株式会社大塚製薬工場
(21) 国際出願番号	PCT/JP2006/320796		徳島県鳴門市撫養町立岩字芥原115
(22) 国際出願日	平成18年10月12日(2006.10.12)	(74) 代理人	100080791 弁理士 高島 一
(31) 優先権主張番号	特願2005-299314 (P2005-299314)	(72) 発明者	小柴 貴明 京都府京都市左京区吉田近衛町 国立大学 法人京都大学大学院医学研究科内
(32) 優先日	平成17年10月13日(2005.10.13)	(72) 発明者	趙 向東 京都府京都市左京区吉田近衛町 国立大学 法人京都大学大学院医学研究科内
(33) 優先権主張国	日本国(JP)	(72) 発明者	和田 洋巳 京都府京都市左京区吉田近衛町 国立大学 法人京都大学大学院医学研究科内

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 肝臓保存液

## (57) 【要約】

本発明は、トレハロース及びジブチリルcAMPを含有する肝臓保存液を提供する。該保存液中のニトログリセリンの含有量は、好ましくは0.44mMを下回る。本発明の肝臓保存液においては、肝臓を保存する場合に生じるニトログリセリンによる毒性が改善されているので、高い生着率で肝臓移植を行うことが可能となる。

## 【特許請求の範囲】

## 【請求項 1】

トレハロース及びジブチリル c A M P を含有する、肝臓保存液。

## 【請求項 2】

ニトログリセリンの含有量が 0 . 4 4 m M を下回る、請求項 1 記載の保存液。

## 【請求項 3】

ニトログリセリンの含有量が 0 . 0 0 4 4 m M 以下である、請求項 1 記載の保存液。

## 【請求項 4】

ニトログリセリンを実質的に含有しない、請求項 1 記載の保存液。

## 【請求項 5】

ジブチリル c A M P の濃度が 0 . 0 0 5 ~ 1 0 m M の範囲にある、請求項 1 記載の保存液。

10

## 【請求項 6】

トレハロースの濃度が 5 0 ~ 2 4 0 m M の範囲にある、請求項 1 記載の保存液。

## 【請求項 7】

ヒドロキシエチル澱粉を更に含有する、請求項 1 記載の保存液。

## 【請求項 8】

少なくとも下記の成分を下記の範囲内で更に含有する、請求項 1 記載の保存液：

Na<sup>+</sup> 1 0 ~ 1 4 0 m M

K<sup>+</sup> 4 ~ 1 4 0 m M

H<sub>2</sub>PO<sub>4</sub><sup>-</sup> 又は HPO<sub>4</sub><sup>-</sup> 1 2 ~ 6 5 m M

Cl<sup>-</sup>、HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>、CO<sub>3</sub><sup>-</sup>、有機酸及び有機酸アニオンから  
選ばれる少なくとも 1 種 1 5 ~ 1 5 0 m M。

20

## 【請求項 9】

少なくとも下記の成分を下記の範囲内で含有する、肝臓保存液：

ジブチリル c A M P 0 . 0 0 5 ~ 1 0 m M

トレハロース 5 0 ~ 2 4 0 m M

ヒドロキシエチル澱粉 1 ~ 8 0 g / l

Na<sup>+</sup> 1 0 ~ 1 4 0 m M

K<sup>+</sup> 4 ~ 1 4 0 m M

H<sub>2</sub>PO<sub>4</sub><sup>-</sup> 又は HPO<sub>4</sub><sup>-</sup> 1 2 ~ 6 5 m M

Cl<sup>-</sup>、HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>、CO<sub>3</sub><sup>-</sup>、有機酸及び有機酸アニオンから  
選ばれる少なくとも 1 種 1 5 ~ 1 5 0 m M。

30

## 【請求項 10】

ニトログリセリンの含有量が 0 . 4 4 m M を下回る、請求項 9 記載の保存液。

## 【請求項 11】

トレハロース及びジブチリル c A M P を含有する、腎臓保存液。

## 【発明の詳細な説明】

## 【技術分野】

## 【0001】

本発明は、ニトログリセリンによる毒性が改善された肝臓保存液に関する。

40

## 【背景技術】

## 【0002】

現在、欧米の脳死肝移植では、通常、University of Wisconsin 液 (UW 液) が使用されている (Transplant proc, vol. 31, p. 2069 - 2070, 1999)。これは、UW 液が他の臓器保存液に比較して、より長期間、肝臓の冷疎血保存を可能にするからである。しかし、UW 液は極めて粘性が高いため、肝臓の冷疎血保存を開始する際にあらかじめ、粘性の低いリンゲル液等で血管内の血液を洗い流す必要があるばかりか、UW 液による灌流そのものにも、長時間を要す。また、UW 液は細胞内液型保存液 (電解質が細胞内の組成と同等) であり、カリウムの濃度

50

が高い(125 mM)。カリウムの濃度が高いことは血管の収縮を招くため、これも臓器の灌流に長時間を要す原因となる。そればかりか、肝を患者に移植し血流を再開する直前に肝内のUW液を一旦、リンゲル液等で置換し、患者体内に高濃度のカリウムが流入しないようにする必要がある。その上、化学的に不安定な活性酸素消去剤(ラジカルスカベンジャー)を成分に含むため、UW液には冷所保存でも有効期間が短く、また、単価が非常に高い。

これらの、不利益を解決するため、UW液とはまったく組成の異なる細胞外液であって、カリウム濃度が低く、細胞膜を安定化し細胞傷害を抑制する糖類トレハロースを含有するET-Kyoto液及びNew ET-Kyoto液が本発明者らにより開発された(特許第3253131号、Yonsei Medical Journal, vol. 45, No. 6, p. 1107-1114, 2004)。New ET-Kyoto液はET-Kyoto液と類似する組成を有するが、ジブチリルcAMP(db-cAMP)、ニトログリセリン及びNアセチルシステインを含有する点で、ET-Kyoto液とは異なる。db-cAMP及びニトログリセリンの保存液への添加は、ET-Kyoto液と比して移植後における臓器機能をさらに高めることが記載されている(Yonsei Medical Journal, vol. 45, No. 6, p. 1107-1114, 2004)。

ET-Kyoto液はすでに、腎臓、肺、筋肉、皮膚の冷疎血保存において、UW液と同等の効果を発揮することが動物実験のレベルで示されている。しかし、肝臓の保存に対する効果に関しては詳細な報告は未だ成されていなかった。

また、New ET-Kyoto液に関しては、肺の保存においてUW液に優る効果が示されており、京都大学における臨床、肺移植に導入されている。

そこで、より臓器機能の維持作用に優れ、しかも安全性、操作性及び化学的安定性に優れた肝臓保存液の開発が望まれている。

上記事情に鑑み、臓器機能の維持作用に優れ、しかも安全性、使用の容易さ、化学的安定性に優れた肝臓保存液を提供することを目的とする。

#### 【発明の開示】

#### 【0003】

本発明者らは、上記目的を達成すべく鋭意研究を進めた。

その結果、肺移植片等の保存において優れた効果を有することが確認済みのNew ET-Kyoto液中で肝臓を保存し、肺移植時と同様に、これをリンゲル液等で灌流せずにレシピエント動物に移植したところ、意外なことに、レシピエント動物に対して肺移植時には認められない毒性を示し、当該動物の移植後生存率が低下してしまうという問題点を見出した。そこで、この毒性の原因を更に追究した結果、New ET-Kyoto液中に含まれるニトログリセリンがこの毒性の原因であり、この含有量を一定値より低くすることで、該毒性を低減することが可能であることを見出した。更に、ニトログリセリンの毒性が発現しない条件下では、ET-Kyoto液へのジブチリルcAMPの添加により、肝臓移植後の生存率(生着率)が飛躍的に向上すること、そしてこのジブチリルcAMP添加の効果がET-Kyoto液に特異的であることを見出し、本発明を完成するに至った。

即ち、本発明は以下に関する。

- [1] トレハロース及びジブチリルcAMPを含有する、肝臓保存液。
- [2] ニトログリセリンの含有量が0.44 mMを下回る、[1]記載の保存液。
- [3] ニトログリセリンの含有量が0.0044 mM以下である、[1]記載の保存液。
- [4] ニトログリセリンを実質的に含有しない、[1]記載の保存液。
- [5] ジブチリルcAMPの濃度が0.005~10 mMの範囲にある、[1]記載の保存液。
- [6] トレハロースの濃度が50~240 mMの範囲にある、[1]記載の保存液。
- [7] ヒドロキシエチル澱粉を更に含有する、[1]記載の保存液。
- [8] 少なくとも下記の成分を下記の範囲内で更に含有する、[1]記載の保存液：

Na <sup>+</sup>	10 ~ 140 mM
K <sup>+</sup>	4 ~ 140 mM
H <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> <sup>-</sup> 又は HPO <sub>4</sub> <sup>-</sup>	12 ~ 65 mM
Cl <sup>-</sup> 、HCO <sub>3</sub> <sup>-</sup> 、CO <sub>3</sub> <sup>-</sup> 、有機酸及び有機酸アニオンから 選ばれる少なくとも1種	15 ~ 150 mM。

[9] 少なくとも下記の成分を下記の範囲内で含有する、肝臓保存液：

ジブチリルcAMP	0.005 ~ 10 mM
トレハロース	50 ~ 240 mM
ヒドロキシエチル澱粉	1 ~ 80 g/l

Na <sup>+</sup>	10 ~ 140 mM
K <sup>+</sup>	4 ~ 140 mM
H <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> <sup>-</sup> 又は HPO <sub>4</sub> <sup>-</sup>	12 ~ 65 mM
Cl <sup>-</sup> 、HCO <sub>3</sub> <sup>-</sup> 、CO <sub>3</sub> <sup>-</sup> 、有機酸及び有機酸アニオンから 選ばれる少なくとも1種	15 ~ 150 mM。

[10] ニトログリセリンの含有量が0.44 mMを下回る、[9]記載の保存液。

[11] トレハロース及びジブチリルcAMPを含有する、腎臓保存液。

本発明の肝臓保存液は以下のような利点を有する。

(1) 本発明の肝臓保存液においては、New ET-Kyoto液中で肝臓を保存する場合に生じるニトログリセリンによる毒性が改善されている。更に、本発明の肝臓保存液のカリウム濃度はUW液等と比較して低い。従って、保存後に肝臓内の保存液をリンゲル液等により置換せずに、血液を再灌流することが可能である。

(2) 本発明の肝臓保存液は粘性が低いので、肝臓の冷疎血を開始する段階で最初にリンゲル液などで灌流を始める必要がない。

(3) 本発明の肝臓保存液は粘性が低く、且つカリウム濃度が低いので、肝臓の冷疎血を開始する段階における灌流に要する時間が短い。

(4) 本発明の肝臓保存液は組成が化学的に安定であり、室温で長期期間保存可能である。

(5) 本発明の肝臓保存液は単価が安い。

(6) 本保存液は、既存の臓器保存液UW液等と比して明らかに優れた肝臓保存能を有する。

#### 【図面の簡単な説明】

##### 【0004】

図1は、肝臓移植後の7日間生存率を示すグラフである。

図2は、肝細胞傷害又は類洞内皮細胞傷害を反映する各血清生化学マーカーに対する保存液の効果を示すグラフである。

図3は、肝機能に対する保存液の効果を示すグラフである。

図4は、肝臓移植片の組織学的変化に対する保存液の効果を示す写真である。A及びC：ET-Kyoto+db-cAMP、B及びD：UW。A vs B：類洞の鬱血はBの方がAよりも著明である。C vs D：空胞変性は、Dの方が、C及びAよりも著明である。

図5は、肝細胞及び類洞内皮細胞の超構造に対する保存液の効果を示す写真である。A及びB：肝細胞、C及びD：類洞内皮細胞、A及びC：UW群、B及びD：改変New ET-K群。

図6は、ET-K液又はdb-cAMPが添加されたET-K液中で保存された肝臓を移植されたラットの累積生存率を示すグラフである(Kaplan-Meier法)。実線はET-K群を、点線はET-K+db-cAMP群をそれぞれ示す。また、白丸はET-K群の発生例を、黒丸はET-K+db-cAMP群の発生例をそれぞれ示す。

図7は、UW液又はdb-cAMPが添加されたUW液中で保存された肝臓を移植されたラットの累積生存率を示すグラフである(Kaplan-Meier法)。実線はUW群を、点線はUW+db-cAMP群をそれぞれ示す。また、白丸はUW群の発生例を、

10

20

30

40

50

黒丸はUW + d b - c A M P群の発生例をそれぞれ示す。

【発明を実施するための最良の形態】

【0005】

本発明は、トレハロース及びジブチリルcAMPを含有する、肝臓保存液を提供するものである。

本発明の保存液に用いられるトレハロースには、 $\alpha$ -トレハロース、 $\beta$ -トレハロース及び $\gamma$ -トレハロースの3種が存在するが、好ましくは天然に存在する $\alpha$ -トレハロースが用いられる。本発明の保存液中のトレハロースの含有量の範囲は、本発明の保存液の有する肝機能維持作用を損なわない限り特に限定されないが、例えば50~240mM、好ましくは100~210mM、より好ましくは100~140mM、更に好ましくは110~130mM(例えば120mM)である。

本発明の保存液に含まれるジブチリルcAMPの含有量の範囲は、本発明の保存液が有する肝機能維持作用を損なわない限り特に限定されないが、例えば0.005~10mM、好ましくは0.05~5mM、より好ましくは0.5~4mM、更に好ましくは1.5~3mM(例えば2mM)である。本発明の保存液にジブチリルcAMPが含まれることにより、肝臓移植後の生存率(生着率)が飛躍的に向上する。

本発明の保存液のニトログリセリン含有量は、好ましくは、0.44mMを下回る。ニトログリセリンによる毒性を考慮すると、ニトログリセリン含有量は低いほど好ましく、例えば0.4mM以下、好ましくは0.3mM以下、より好ましくは0.2mM以下、更に好ましくは0.1mM以下(例えば、実質的に0mM(ニトログリセリンを実質的に含有しない))である。とりわけ、ニトログリセリンの含有量が0.0044mM以下では、ニトログリセリンによる毒性がほとんど発現せず、肝臓移植後のレシピエントの生存率が向上するため、好ましい。

本発明の保存液は、該保存液の浸透圧を調節するために、ヒドロキシエチル澱粉(以下、「HES」ともいう)を含有していてもよい。ヒドロキシエチル澱粉は、置換度が0.4~0.8の範囲のもので、平均分子量200000~900000のものが好ましく、更に好ましくは平均分子量350000~800000のものである。ヒドロキシエチル澱粉の含有量は、本発明の保存液の肝機能維持作用を損なわない限り特に限定されないが、例えば1~80g/l、好ましくは20~40g/l、より好ましくは25~35g/l(例えば30g/l)である。

本発明の保存液は、該保存液の浸透圧やpHを調節するために、種々の電解質を含有してもよい。該電解質としては、有機酸のナトリウム塩若しくはカリウム塩、塩化ナトリウム、塩化カリウム、塩化マグネシウム、塩化カルシウム、リン酸二水素ナトリウム、リン酸二水素カリウム、リン酸水素二ナトリウム、リン酸水素二カリウム、炭酸水素ナトリウム、炭酸水素カリウム、炭酸ナトリウム及び炭酸カリウムを例示することが出来る。また有機酸としては、グルコン酸、乳酸、酢酸、プロピオン酸、 $\alpha$ -ヒドロキシ酪酸及びクエン酸等を例示することが出来る。

本発明の保存液は、電解質として、少なくとも下記の成分を、好適には下記の範囲内で更に含有することが好ましい。

$\text{Na}^+$ は、通常10~140mM、好ましくは20~120mM、より好ましくは90~110mM(例えば100mM)含有される。

$\text{K}^+$ は、通常4~140mM、好ましくは20~130mM、より好ましくは40~50mM(例えば44mM)含有される。

$\text{H}_2\text{PO}_4^-$ 又は $\text{HPO}_4^{2-}$ は、通常12~65mM、好ましくは20~60mM、より好ましくは20~30mM(例えば25mM)含有される。

$\text{Cl}^-$ 、 $\text{HCO}_3^-$ 、 $\text{CO}_3^{2-}$ 、有機酸及び有機酸アニオンから選ばれる少なくとも1種は各々、通常15~150mM、好ましくは20~120mM、より好ましくは90~110mM(例えば100mM)含有される。

本発明の保存液が含有し得る電解質の好ましい濃度範囲の組み合わせは次の通りである。

。

10

20

30

40

50

Na <sup>+</sup>	10 ~ 140 mM
K <sup>+</sup>	4 ~ 140 mM
H <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> <sup>-</sup> 又は HPO <sub>4</sub> <sup>2-</sup>	12 ~ 65 mM
Cl <sup>-</sup> 、HCO <sub>3</sub> <sup>-</sup> 、CO <sub>3</sub> <sup>2-</sup> 、有機酸及び有機酸アニオンから 選ばれる少なくとも1種	15 ~ 150 mM

本発明の保存液が含有し得る電解質のより好ましい濃度範囲の組み合わせは次の通りである。

Na <sup>+</sup>	20 ~ 120 mM
K <sup>+</sup>	20 ~ 130 mM
H <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> <sup>-</sup> 又は HPO <sub>4</sub> <sup>2-</sup>	20 ~ 60 mM
Cl <sup>-</sup> 、HCO <sub>3</sub> <sup>-</sup> 、CO <sub>3</sub> <sup>2-</sup> 、有機酸及び有機酸アニオンから 選ばれる少なくとも1種	20 ~ 120 mM

10

本発明の保存液が含有し得る電解質の更に好ましい濃度範囲の組み合わせは次の通りである。

Na <sup>+</sup>	90 ~ 110 mM (例えば100 mM)
K <sup>+</sup>	40 ~ 50 mM (例えば44 mM)
H <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> <sup>-</sup> 又は HPO <sub>4</sub> <sup>2-</sup>	20 ~ 30 mM (例えば25 mM)
Cl <sup>-</sup> 、HCO <sub>3</sub> <sup>-</sup> 、CO <sub>3</sub> <sup>2-</sup> 、有機酸及び有機酸アニオンから 選ばれる少なくとも1種	90 ~ 110 mM (例えば100 mM)

本発明の保存液は、細胞又は組織が保存中に膨張又は収縮するのを防ぐために、浸透圧が270 ~ 450 mOsm/lの範囲にあることが好ましく、270 ~ 380 mOsm/lの範囲にあることがより好ましい。また、細胞の酸性分解を防止するために、pHが7 ~ 8の範囲にあることが好ましい。

20

本発明の保存液の好ましい組成は次の通りである。

ジブチリルcAMP	0.005 ~ 10 mM
トレハロース	50 ~ 240 mM
ヒドロキシエチル澱粉	1 ~ 80 g/l
Na <sup>+</sup>	10 ~ 140 mM
K <sup>+</sup>	4 ~ 140 mM
H <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> <sup>-</sup> 又は HPO <sub>4</sub> <sup>2-</sup>	12 ~ 65 mM
Cl <sup>-</sup> 、HCO <sub>3</sub> <sup>-</sup> 、CO <sub>3</sub> <sup>2-</sup> 、有機酸又は有機酸アニオンから 選ばれる少なくとも1種	15 ~ 150 mM

30

本発明の保存液のより好ましい組成は次の通りである。

ジブチリルcAMP	0.05 ~ 5 mM
トレハロース	100 ~ 210 mM
ヒドロキシエチル澱粉	20 ~ 40 g/l
Na <sup>+</sup>	20 ~ 120 mM
K <sup>+</sup>	20 ~ 130 mM
H <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> <sup>-</sup> 又は HPO <sub>4</sub> <sup>2-</sup>	20 ~ 60 mM
Cl <sup>-</sup> 、HCO <sub>3</sub> <sup>-</sup> 、CO <sub>3</sub> <sup>2-</sup> 、有機酸及び有機酸アニオンから 選ばれる少なくとも1種	20 ~ 120 mM

40

本発明の保存液の更に好ましい組成は次の通りである。

ジブチリルcAMP	1.5 ~ 3 mM (例えば2 mM)
トレハロース	110 ~ 130 mM (例えば120 mM)
ヒドロキシエチル澱粉	25 ~ 35 g/l (例えば30 g/l)
Na <sup>+</sup>	90 ~ 110 mM (例えば100 mM)
K <sup>+</sup>	40 ~ 50 mM (例えば44 mM)
H <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> <sup>-</sup> 又は HPO <sub>4</sub> <sup>2-</sup>	20 ~ 30 mM (例えば25 mM)
Cl <sup>-</sup> 、HCO <sub>3</sub> <sup>-</sup> 、CO <sub>3</sub> <sup>2-</sup> 、有機酸及び有機酸アニオンから 選ばれる少なくとも1種	90 ~ 110 mM (例えば100 mM)

50

本発明の保存液は、上記以外にも、例えば  $Mg^{++}$  及び / 又は  $Ca^{++}$  を  $1 \sim 10 \text{ mM}$  の範囲で含むことができる。更に、本発明の保存液は他の添加物、例えば N アセチルシステイン等の活性酸素消去剤、ATP 等の細胞賦活剤、抗生物質等を含むことができる。

本発明の保存液は、自体公知の輸液剤の製造方法に準拠して容易に製造することができる。

本発明の保存液の使用方法については、特に限定はされないが、例えば生体から抽出された肝臓組織中の血液を本発明の保存液で置換し、これを本発明の保存液中に浸漬して、そのまま低温（例えば  $0 \sim 10^\circ\text{C}$ 、好ましくは  $1 \sim 6^\circ\text{C}$ ）にて保存する。

以下、実施例を示して本発明をより具体的に説明するが、本発明は以下に示す実施例によって何ら限定されるものではない。

10

#### 【実施例】

#### 【0006】

#### [実施例1]

#### (1) 材料及び方法

#### (動物)

8 週齢の近交系雄 Lewis ラット (SLC) が、チップを敷いたケージ中で室温にて、12 時間明暗サイクル下で飼育され、手術前に、標準的な食餌及び水が自由に摂取された。

#### (保存液)

約  $50^\circ\text{C}$  の蒸留水  $800 \text{ ml}$  に、 $NaCl$  - トレハロース  $41 \text{ g}$  ( $120 \text{ mmol}$ )、ヒドロキシエチル澱粉 (平均分子量  $429000$ 、置換度  $0.55$ )  $30 \text{ g}$ 、グルコン酸ナトリウム  $21.81 \text{ g}$  ( $100 \text{ mmol}$ )、リン酸二水素カリウム  $0.885 \text{ g}$  ( $6.5 \text{ mmol}$ )、及びリン酸水素二カリウム  $3.222 \text{ g}$  ( $18.5 \text{ mmol}$ ) を溶解した後、蒸留水を加えて全量を  $1000 \text{ ml}$  とした。これを直ちに濾過し、ガラス瓶に充填、密栓後、蒸気滅菌して、浸透圧  $366 \text{ mOsm/l}$ 、 $\text{pH} 7.35$  の ET - Kyoto 液 (以下、ET - K 液) を得た。

20

上記 ET - K 液に、db - cAMP (第一製薬社製)、ニトログリセリン (三菱ウエルファーマ社製)、及び N アセチルシステインを添加し、New ET - Kyoto 液 (以下、New ET - K 液) を得た。

更に、上記 ET - K 液に、db - cAMP (第一製薬社製) を添加し、改変 New ET - Kyoto 液 (以下、改変 New ET - K 液) を得た。

30

UW 液は藤沢薬品工業株式会社より購入した。

ET - K 液、New ET - K 液及び改変 New ET - K 液の組成は以下の通りである。

【表 1】

表 1

成分	ET-K	New ET-K	改変New ET-K
$\alpha$ 、 $\alpha$ -トレハロース (mM)	120	120	120
ヒドロキシエチル澱粉 (g/l)	30	29	30
$\text{Na}^+$ (mM)	100	107	100
$\text{K}^+$ (mM)	44	42	44
$\text{H}_2\text{PO}_4^-$ 又は $\text{HPO}_4^{--}$ (mM)	25	24	25
グルコン酸 (mM)	100	97	100
db - cAMP (mM)	0	2	2
ニトログリセリン (mM)	0	0.44	0
Nアセチルシステイン (mM)	0	10	0

10

20

## (実験群)

グループ I : UW液群 (n = 8)、グループ II : New ET-K液群 (n = 6)、グループ III : 改変New ET-K液群 (n = 8)。各保存液中で肝臓を24時間冷却保存した後、同種同系肝臓移植が行われた。ラットは、無作為に各群に割り当てられた。

## (移植手順)

UW群においては、最初に10mlのリンゲル液でドナー肝臓門脈血管内の血液が置換され、引き続き10mlのUW液により血管内が灌流された。New ET-K群及び改変New ET-K群においては、ドナー肝臓門脈血管内の血液が直接20mlの各保存液により置換された。全ての群において保存液の灌流は、15cmH<sub>2</sub>Oの圧力で行われた。次に肝臓移植片がそれぞれの保存液中で4にて24時間保存された。UW群においては、移植前に、移植片の門脈血管内が最後に10mlのリンゲル液でリンスされ、UW液が置換された。New ET-K群及び改変New ET-K群においては、肝臓は最終リンス無しで移植された。保存後に、肝移植片が、同所的に(orthotopically)レシピエントラット中へ移植された。肝上大静脈及び肝下大静脈の両方が、手術用縫合糸により縫合された。門脈はポリエチレン・カフ(微小チューブ)を用いた半自動吻合により連結された。全ての移植において、麻酔時間は14分を下回り、大静脈を遮断する時間は25分を下回った。

30

40

## (術後評価)

移植後4時間で、移植を施されたレシピエントラットが、ケタミンの腹腔内注入により再麻酔された。胆汁が15分間に亘り採集され、胆汁排泄速度及び胆汁量が測定された。血液試料が、血清アンモニア、AST、ALT、LDH(いずれも最も一般的な肝機能評価指標)及びヒアルロン酸(HA)(肝血管内皮細胞の機能の指標)の測定のために、下大静脈から採取された。最後に、移植片が20mlのリンゲル液により、10ml/分の速度で、門脈経由で灌流された。電子顕微鏡検査(TEM)のための標本は、20mlの1.44%グルタルアルデヒド(GLA)液により灌流された。残りは、10%ホルムアルデヒド中に浸漬され、パラフィンワックス中に包埋された。切片を、通常のヘマトキシリン・エオジン染色に処した。TEMが超構造の変化の解析のために行われた。

50



## 〔 2 〕 結果

## ( 生存率 )

24時間保存された肝臓移植片の移植後、7日間生存率は、改変New ET-K群において86% (7/8)であり、UW群において25% (2/8)であった。改変New ET-K群において、生存率は有意によかった (フィッシャー正確検定:  $P < 0.05$ ; 図1)。New ET-K群において7日間生存率は0% (0/6)であり、New ET-K液は7日間生存率を向上させなかった。

以上の結果より、改変New ET-K液を用いれば、UW液又はNew ET-K液を用いた場合と比較して肝臓移植後の生存率が大きく上昇することが示された。また、ニトログリセリンを含有するNew ET-K液を用いると、極めて生存率が低いことから、保存液中のニトログリセリンの含有量を減じることにより、肝臓移植後の生存率が大きく上昇することが示された。

10

## ( 血清生化学 )

血清AST (GOT)、ALT (GPT)、LDH及びHAが移植後4時間において測定された。ALT、AST及びLDHレベルにより評価された肝細胞障害は、改変New ET-K群において、UW群のそれよりも有意に低かった (改変New ET-K/UW: ALT,  $527 \pm 88 / 1728 \pm 380$  IU/l,  $p < 0.01$ ; AST,  $681 \pm 90 / 1652 \pm 292$  IU/l,  $p < 0.01$ ; LDH,  $1105 \pm 352 / 4796 \pm 1059$  IU/l,  $p < 0.01$ ; 図2A、B及びC)。HAレベルは類洞内皮細胞 (SEC) の傷害を反映した。HAレベルは、改変New ET-K群において、UW群と比較して有意に低かった ( $1988 \pm 791 / 2809 \pm 673$  ng/ml,  $p < 0.05$ ; 図2D)。

20

以上の結果から、改変New ET-K液はUW液と比較して、肝細胞及び類洞内皮細胞の保存効果が優れていることが示された。

## ( 血液アンモニア及び胆汁産生 )

アンモニア及び胆汁排泄が肝機能の指標として評価された。この時点においてアンモニアについては、2群間で有意差はなかったが ( $255 \pm 20 / 252 \pm 22$   $\mu$ g/dl,  $p > 0.05$ ; 図3A)、胆汁排泄は改変New ET-K群において有意に高かった (改変New ET-K/UW:  $702 \pm 125 / 489 \pm 108$   $\mu$ l/kg/min,  $p < 0.05$ ; 図3B)。

30

以上の結果から、改変New ET-K液はUW液と比較して、肝機能の維持効果が高いことが示された。

## ( HE染色 )

組織学的には、UW液中で保存された肝臓移植片は、ET-K液中でのそれよりも、より再灌流障害を受けやすかった。UW群と比較して、改変New ET-K群において、空胞変性 (vacuolar degeneration)、類洞鬱血 (sinusoidal congestion) 及び出血が少なかった (図4)。

以上の結果から、改変New ET-K液はUW液と比較して、より強力に肝臓を再灌流障害から保護することが示された。

## ( 電子顕微鏡所見 )

40

SEC及び肝細胞の形態学的変化の更なる評価のために、移植4時間後における、24時間保存された肝臓移植片の超構造を解析するためTEMが行われた。UW群においては、肝細胞の細胞死、すなわちアポトーシス性変化 (核濃縮 (pyknosis)、エネルギー代謝に関係するミトコンドリア浮腫及び空胞変性) が、改変New ET-K群におけるそれよりも、頻りに認められた (図5A、B)。更に、UW群においては、幾つかのSECは、脱離、不連続性、水疱形成、核凝集及びアポトーシス小体などのアポトーシスの特徴を示した (図5C)。一方、改変New ET-K群においては、そのような変化は穏やかであり、SECはしばしばよく保存されていた (図5D)。

以上の結果から、改変New ET-K液は、肝細胞及びSECの超構造を維持する作用に優れていることが示された。

50

## [ 実施例 2 ]

## 〔 1 〕材料及び方法

実施例 1 と同様に、8 週齢の近交系雄 Lewis ラット ( S L C ) を用いた同種同系肝臓移植を行い、種々の濃度のニトログリセリン ( N T G ) を含む保存液を用いて保存された肝臓を移植した後の生存率が評価された。

試験に使用された保存液は以下の通りである：

- ・ E T - K + d b - c A M P ( 2 m M ) + 1 / 4 N T G ( 0 . 1 1 m M )
- ・ E T - K + d b - c A M P ( 2 m M ) + 1 / 8 N T G ( 0 . 0 5 5 m M )
- ・ E T - K + d b - c A M P ( 2 m M ) + 1 / 1 0 0 N T G ( 0 . 0 0 4 4 m M )
- ・ E T - K + d b - c A M P ( 2 m M ) ( コントロール：改変 New E T - K 液 )

10

肝臓移植の条件は保存液の種類が異なることを除き、実施例 1 と同一である。

## 〔 2 〕結果

結果を表 2 に示す。

## 【表 2】

表 2

グループ	ドナー重量(g)	保存時間(分)	レシピエント重量(g)	無肝時間(分)	IVC再流(分)	生存日数
コントロール	368	1474	410	13	23	7
コントロール	364	1434	376	16	28	1
コントロール	340	1440	364	16	27	7
1/4	398	1500	410	15	26	1
1/4	356	1375	360	15	29	2
1/4	358	1398	366	16	30	1
1/8	396	1479	396	14	26	2
1/8	342	1378	352	16	27	2
1/8	328	1407	330	16	29	1
1/8	342	1438	370	16	27	1
1/100	338	1449	350	15	26	2
1/100	350	1443	380	15	26	7

20

30

40

肝臓移植後の 7 日間生存率は、コントロール ( 改変 New E T - K ) 群において 6 6 % ( 2 / 3 ) であった。ニトログリセリン含有量を New E T - K 液の 1 / 8 ~ 1 / 4 倍量 ( 0 . 0 5 5 ~ 0 . 1 1 m M ) にまで減じて、7 日間生存率は 0 % であり、この濃度範囲においては、ニトログリセリンによる毒性が十分には改善されていないことが示唆された。一方、ニトログリセリン含有量を New E T - K 液の 1 / 1 0 0 倍量 ( 0 . 0 0 4 4 m M ) にまで減じると、7 日間生存率は 5 0 % ( 1 / 2 ) となり、コントロール群とほぼ同等であった。従って、ニトログリセリンの含有量が 0 . 0 0 4 4 m M 以下であれば、ニトログリセリンによる毒性がほとんど発現せず、肝臓移植後のレシピエントの生存率が向上することが示された。

## [ 実施例 3 ]

## 〔 1 〕材料及び方法

実施例 1 と同様に、8 週齢の近交系雄 Lewis ラット ( S L C ) を用いた同種同系肝臓移植を行い、E T - K 液への d b - c A M P 添加による肝臓移植後生存率の上昇が、他の保存液でも観察されるか否か調べた。

試験に使用された保存液は以下の通りである：

50

- E T - K
- U W
- E T - K + d b - c A M P ( 2 m M ) ( 改 変 N e w E T - K 液 )
- U W + d b - c A M P ( 2 m M )

肝臓移植の条件は保存液の種類が異なることを除き、実施例 1 と同一である。

〔 2 〕 結果

肝臓移植後の 7 日間生存率は、E T - K + d b - c A M P 群では 8 6 % ( 7 / 8 )、E T - K 群では 0 % ( 0 / 1 0 ) であり、d b - c A M P の添加により生存率が顕著に上昇した ( 図 6 ) 。

一方、U W + d b - c A M P 群では 3 8 % ( 3 / 8 )、U W 群では 2 5 % ( 2 / 8 ) であり、d b - c A M P の添加によりわずかに生存率は上昇したものの、E T - K 液で観察されたような顕著な効果は認められなかった ( 図 7 ) 。

従って、d b - c A M P の添加による移植後生存率の著しい上昇は、E T - K 液に特異的な効果であることが示唆された。

また、d b - c A M P を添加した E T - K 液の優れた臓器保存効果が、肝臓と同様に腎臓においても確認されたことから、上記本発明の保存液は、腎臓の保存にも有用であることが示唆された。

【 産 業 上 の 利 用 可 能 性 】

【 0 0 0 7 】

本発明の肝臓保存液は、優れた肝保存能を有しており、移植医療の分野において有用である。

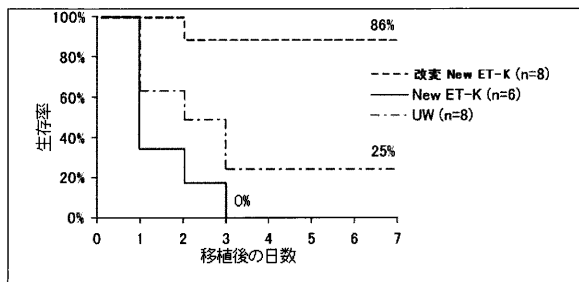
本出願は日本で出願された特願 2 0 0 5 - 2 9 9 3 1 4 ( 出 願 日 : 2 0 0 5 年 1 0 月 1 3 日 ) を 基 礎 と し て お り 、 そ の 内 容 は 本 明 細 書 に 全 て 包 含 さ れ る も の で あ る 。

10

20

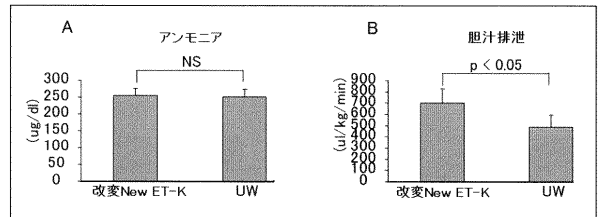
【 図 1 】

図 1



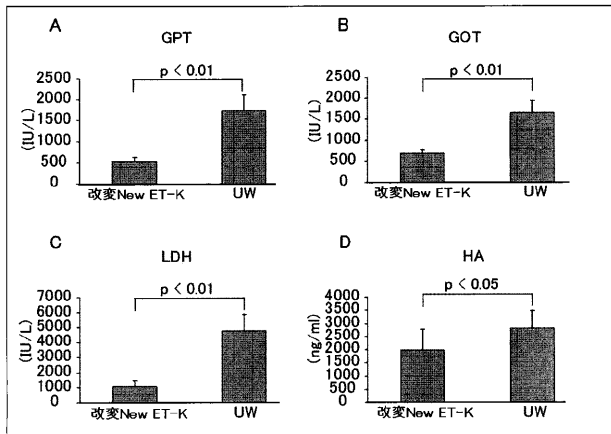
【 図 3 】

図 3



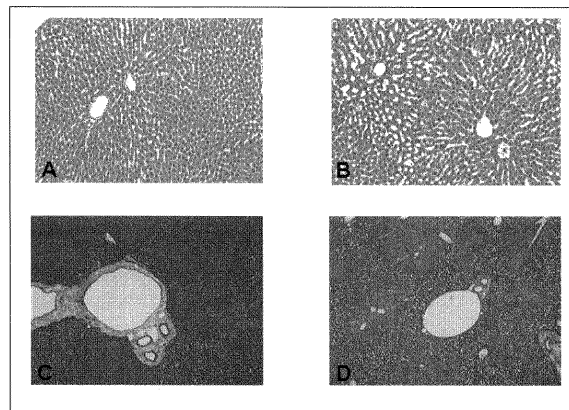
【 図 2 】

図 2



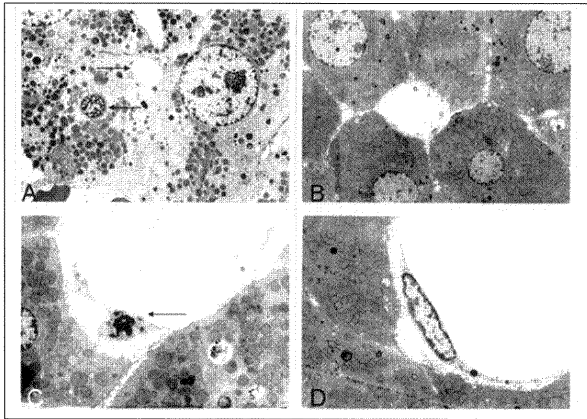
【 図 4 】

図 4



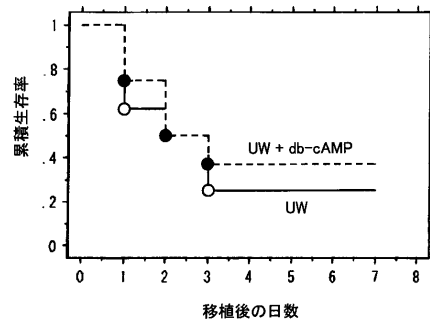
【 図 5 】

図 5



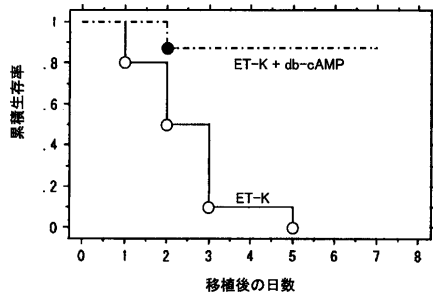
【 図 7 】

図 7



【 図 6 】

図 6



## 【 国際調査報告 】

<b>INTERNATIONAL SEARCH REPORT</b>		International application No. PCT/JP2006/320796
<b>A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER</b> A01N1/02 (2006.01) 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) A01N1/02  Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched Jitsuyo Shinan Koho 1922-1996 Jitsuyo Shinan Toroku Koho 1996-2006 Kokai Jitsuyo Shinan Koho 1971-2006 Toroku Jitsuyo Shinan Koho 1994-2006  Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) CAPlus (STN), JST7580 (JDream2), JSTPlus (JDream2)		
<b>C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT</b>		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	Chen, F.; Nakamura, T.; Wada, H., Development of new organ preservation solution (ET-Kyoto solution), Organ Biology, 12(1), 2005.04.10, p.9-20	1-11
A	WO 2000/064254 A1 (UNIVERSITY OF UTAH), 02 November, 2000 (02.11.00), Claim 12 & US 6365338 B1	1-11
<input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 04 December, 2006 (04.12.06)		Date of mailing of the international search report 12 December, 2006 (12.12.06)
Name and mailing address of the ISA/ Japanese Patent Office		Authorized officer
Facsimile No.		Telephone No.

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**

International application No.

PCT/JP2006/320796

## &lt;Subject of the search&gt;

Claims 1 to 2 and 5 to 11 include a solution for preserving liver or kidney in which the content of nitroglycerin is higher than 0.0044 mM. However, a preservation solution having a nitroglycerin content not higher than 0.0044 mM is exclusively disclosed in the meaning within PCT Article 5 (see EXAMPLE 2). Moreover, claims 1 to 2 and 5 to 11 are not fully supported by the description in the meaning within PCT Article 6.

Such being the case, the search was conducted on the part that is disclosed in the description and supported thereby, i.e., a preservation solution having a nitroglycerin content not higher than 0.0044 mM.

国際調査報告		国際出願番号 PCT/JP2006/320796									
A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC)) Int.Cl. A01N1/02(2006.01)i											
B. 調査を行った分野 調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC)) Int.Cl. A01N1/02											
最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの <table border="0"> <tr> <td>日本国実用新案公報</td> <td>1922-1996年</td> </tr> <tr> <td>日本国公開実用新案公報</td> <td>1971-2006年</td> </tr> <tr> <td>日本国実用新案登録公報</td> <td>1996-2006年</td> </tr> <tr> <td>日本国登録実用新案公報</td> <td>1994-2006年</td> </tr> </table>				日本国実用新案公報	1922-1996年	日本国公開実用新案公報	1971-2006年	日本国実用新案登録公報	1996-2006年	日本国登録実用新案公報	1994-2006年
日本国実用新案公報	1922-1996年										
日本国公開実用新案公報	1971-2006年										
日本国実用新案登録公報	1996-2006年										
日本国登録実用新案公報	1994-2006年										
国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語) CAplus (STN), JST7580 (JDream2), JSTPlus (JDream2)											
C. 関連すると認められる文献											
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号									
A	Chen, F.; Nakamura, T.; Wada, H., Development of new organ preservation solution (ET-Kyoto solution), Organ Biology, 12(1), 2005.04.10, p.9-20	1-11									
A	WO 2000/064254 A1 (UNIVERSITY OF UTAH) 2000.11.02, CLAIM 12 & US 6365338 B1	1-11									
☐ C欄の続きにも文献が列挙されている。		☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。									
* 引用文献のカテゴリー 「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの 「E」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの 「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行者若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す) 「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献 「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願		の日後に公表された文献 「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの 「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの 「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの 「&」同一パテントファミリー文献									
国際調査を完了した日 04.12.2006		国際調査報告の発送日 12.12.2006									
国際調査機関の名称及びあて先 日本国特許庁 (ISA/JP) 郵便番号100-8915 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号		特許庁審査官 (権限のある職員) 櫛引 智子 電話番号 03-3581-1101 内線 3443	4H 3235								

国際調査報告

国際出願番号 PCT/JP2006/320796

<調査の対象について>

請求の範囲1-2, 5-11は、ニトログリセリンの含有量が0.0044mMより多い、肝臓または腎臓保存液を包含している。しかしながら、PCT第5条の意味において開示されているのは、ニトログリセリンの含有量が0.0044mM以下の保存液のみであり（実施例2参照）、また、PCT第6条の意味においても、請求の範囲1-2, 5-11は十分な裏付けがなされていない。

よって、調査は、明細書に開示され、裏付けられている部分、すなわちニトログリセリンの含有量が0.0044mM以下の保存液について行った。



## フロントページの続き

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

## 特許法第30条第1項適用申請有り

(72)発明者 中村 隆之

京都府京都市左京区吉田近衛町 国立大学法人京都大学大学院医学研究科内

(72)発明者 田中 紘一

京都府京都市左京区岩倉南池田町2-6

Fターム(参考) 4H011 BB08 BB17 BB19 BC18 CA01 CB05 CD02 DH10

(注) この公表は、国際事務局(WIPO)により国際公開された公報を基に作成したものである。なおこの公表に係る日本語特許出願(日本語実用新案登録出願)の国際公開の効果は、特許法第184条の10第1項(実用新案法第48条の13第2項)により生ずるものであり、本掲載とは関係ありません。