(19)日本国特許庁(JP)　(12)特　許　公　報(B2)　(11)特許番号
特許第4624564号
(P4624564)

(45)発行日　平成23年2月2日(2011.2.2)　(24)登録日　平成22年11月12日(2010.11.12)

(51)Int.Cl.		F I
A61K 31/355	(2006.01)	A61K 31/355
A61K 9/107	(2006.01)	A61K 9/107
A61K 47/10	(2006.01)	A61K 47/10
A61K 47/24	(2006.01)	A61K 47/24
A61K 47/08	(2006.01)	A61K 47/08

請求項の数 10　(全 12 頁)　最終頁に続く

(21)出願番号　特願2000-589218(P2000-589218)
(86)(22)出願日　平成11年12月18日(1999.12.18)
(65)公表番号　特表2002-532564(P2002-532564A)
(43)公表日　平成14年10月2日(2002.10.2)
(86)国際出願番号　PCT/EP1999/010106
(87)国際公開番号　WO2000/037108
(87)国際公開日　平成12年6月29日(2000.6.29)
審査請求日　平成18年12月11日(2006.12.11)
(31)優先権主張番号　198 59 045.8
(32)優先日　平成10年12月21日(1998.12.21)
(33)優先権主張国　ドイツ(DE)

(73)特許権者　501245045
フレセニウス・カビ・オーストリア・ゲゼルシャフト・ミット・ベシュレンクテル・ハフツング
オーストリア国、アー　８０５５　グラーツ、ハフナーシュトラーセ　３６
(74)代理人　100099623
弁理士　奥山　尚一
(74)代理人　100096769
弁理士　有原　幸一
(74)代理人　100107319
弁理士　松島　鉄男

最終頁に続く

(54)【発明の名称】過酸化によるヒト臓器への損傷に対して保護作用を有する水中油型エマルジョン、その製造及び使用

(57)【特許請求の範囲】
【請求項１】
過酸化によるヒト臓器への損傷に対して保護作用を有する、静脈内投与のための水中油型エマルジョンであって、これが、全エマルジョンに対して、α－トコフェロールを油相として、オール－rac－α－トコフェロール、その立体異性体及び／又は各立体異性体の混合物の形で、その作用に関して、ＲＲＲ－α－トコフェロール１．４８ｇ／ｌ～３０ｇ／ｌに相当する量で含有し、また静脈内認容性油状物０～２５ｇ／ｌ、乳化剤としてのリン脂質０．２５～３ｇ／ｌ並びに容量オスモル濃度を生理学的値に調整する生理的非イオン性物質、及びｐＨ値を７～９に調整する生理学的薬剤を含有する、エマルジョン。
【請求項２】
α－トコフェロールを、その作用に関し、ＲＲＲ－α－トコフェロール３．７ｇ／ｌ～２２ｇ／ｌに相当する量で、油状物を１ｇ／ｌ～２５ｇ／ｌの量で、かつリン脂質を１～３ｇ／ｌの量で含有する、請求項１記載のエマルジョン。
【請求項３】
α－トコフェロールを、その作用に関し、ＲＲＲ－α－トコフェロール３．７ｇ／ｌ～２２ｇ／ｌに相当する量で、かつリン脂質を０．２５～１．２５ｇ／ｌの量で含有する、α－トコフェロールが前記油相の唯一の成分である、請求項１記載のエマルジョン。
【請求項４】
α－トコフェロールは、オール－rac－α－トコフェロールであり、油状物は、大豆油であり、リン脂質は、卵レシチンであり、かつ容量オスモル濃度の調整剤は、グリセリン

であることを特徴とする、請求項１乃至３のいずれか１項記載のエマルジョン。

【請求項５】

全エマルジョンに対して、０．６重量％／容積までの長鎖脂肪酸を含有することを特徴とする、請求項１乃至４のいずれか１項記載のエマルジョン。

【請求項６】

群：

ジミリストイルホスファチジルグリセリン　０．０２５ｇ／ｌ～０．２４ｇ／ｌ、

ユビデカレノン　０．２ｇ／ｌ～０．６ｇ／ｌ及び

コレステリン　０．１ｇ／ｌ～０．５ｇ／ｌ

からの乳化安定度を高める薬剤を付加的に含有することを特徴とする、請求項１乃至５のいずれか１項記載のエマルジョン。

【請求項７】

付加的にアスコルビン酸パルミテート１２～２５ｇ／ｌを含有することを特徴とする、請求項１乃至６のいずれか１項記載のエマルジョン。

【請求項８】

請求項１乃至７のいずれか１項記載のエマルジョンを製造する際に、リン脂質を、ｐＨ値７～９に調整されている水、オスモル濃度を調整する生理的非イオン性物質及びエマルジョンの安定性を高める場合には長鎖脂肪酸と共に、またビタミンＣもしくはグルタチオンが不足している場合はアスコルビン酸パルミテートと共に水性懸濁液に加工し、この水性懸濁液に、α－トコフェロールを、それ自体で又は静脈内認容性油状物及び場合により乳化安定度を高める所定の薬剤との予混合物の形で、添加混合し、その後、生じた混合物に高圧均一化を施すことを特徴とする、エマルジョンの製法。

【請求項９】

臓器移植の間の虚血及び再潅流が原因の過酸化損傷を減じるために、提供者と被移植者への投与が意図される輸液を、前記エマルジョンを使用して製造する、請求項１乃至７のいずれか１項記載のエマルジョンの使用。

【請求項１０】

前記エマルジョンを使用して、移植が意図される臓器用の保存溶液への添加物を製造する、請求項１乃至７のいずれか１項記載のエマルジョンの使用。

【発明の詳細な説明】

【０００１】

本発明は、過酸化によるヒト臓器への損傷に対して保護作用を有する水中油エマルジョンに関するものであり、これは、ビタミンＥの主成分、α－トコフェロールを作用物質として含有し、ビタミンＥの含分は、通常、マルチビタミン溶液中に含有されるよりも実質的に上回る。このエマルジョンは、臓器が、血液の供給が足らない或いは完全に血液の供給停止に曝された場合に、新たに完全な血液供給が行われる前に生じる過酸化に対して、特に向けられている。この状態は、臓器への供給に使用される血管の各種の閉塞の際に現れ、その際、新たな血液供給は、大抵、外科的処置により復元される。しかしながら、臓器に外科的処置を行い得るために、供給血管をはさみ止めることにより、臓器、例えば腎臓、肝臓、腸又は心臓、の手術の途中で、計画的に引き起こすこともある。手術が終了すると、血液が再び供給される。臓器移植の過程で、この溶液は、同様に使用でき、良好な結果が得られる。このエマルジョンの適用は、一般に、静脈内にのみ、特に輸液として行われる。しかしながら、臓器移植の過程で、臓器保存液への補足的添加物としても好適である。

【０００２】

ビタミンＥは、既に比較的低濃度で、脂質のペルオキシラジカルと有効に戦い得る本質的な脂溶性ビタミンである。それは、更に、過酸化に対し、細胞膜の保護に、高い効果を示し、その際、これらの効能が、同じく脂質酸化からの保護に基づき、即ち、過酸化による破壊に対して、細胞膜中に存在する脂質の二重結合が保護されることが、ここでも、仮定される。その際、その構造及び強度において、細胞膜は、無傷のままである。

【０００３】
α－トコフェロールは、ビタミンＥの主成分である。概念「ビタミンＥ」には、他のトコフェロール、例えばβ、γ及びδ－トコフェロール、並びにトコール及びトコトリエノール誘導体も含まれる。α－トコフェロールは、式、２，５，７，８テトラメチル－２－（４’８’１２’－トリメチルトリデシル）クロマン－６－オールを有し、位置２、４’及び８’にキラル中心３個を有し、従って立体異性体形８個（ＲＲＲ、ＳＳＳ、ＲＲＳ、ＳＳＲ、ＲＳＲ、ＳＲＳ、ＲＳＳ及びＳＲＲ）がある。しかしながら天然には、ＲＲＲ－形が存在するだけであり、これは、最強の効力も有する。更に、ラセミ化合物形、即ち８個の立体異性体すべてを同割合で混合したオール－rac－α－トコフェロール、と同様、合成過程で得られる他の立体異性体がある。通常、全ての立体異性体形の効能は、オール-rac－形の効力と同様に、ＲＲＲ－形の効力に関連している。従って、例えばオール－rac－α－トコフェロール１ｇの効力は、ＲＲＲ－立体異性体０．７４ｇの効力に、ＳＲＲ－立体異性体１ｇのそれは、ＲＲＲ－α－トコフェロール０．３１ｇの効力に相当する。抗酸化作用は、クロマン環のフェノール性ＯＨ－基によるものである。
【０００４】
通常、ビタミンＥは、マルチビタミン調合物の枠で経口投与される。ビタミンＥは、しばしば、腸管外又は静脈内投与可能なマルチビタミン溶液中にα－トコフェロールのエステルの形で含有されるので、これを用いて、不時のビタミンＥ不足をなおすかもしくはそれを予防することができる。
【０００５】
ＷＯ９７／０３６５１にも、既に、ビタミンＥを油相に含有する水中油エマルジョン（Oel in Wasser Emulsion）が記載されており、そこでは、ビタミンＥは、単独のビタミンとして提示されている。しかしながら、水中油エマルジョンの作用物質は、示されていない。作用物質はむしろ難溶性物質、例えば有利にイトラコナゾール（Itraconazol）、抗カビ剤又は抗癌剤、タキソールもしくはその誘導体であり、ビタミンＥ、特にα－トコフェロールの添加により、これらの脂質への溶解度を改良できると理解されている。その際、脂質相中にビタミンＥをできるだけ高く含有させるという目的を達成することができ、この場合、脂質相の唯一の成分としてビタミンＥを有するエマルジョンも含まれる。この要件は、共重合体種の合成乳化剤（ポロキサマー（Poloxamere）又はプルロニック（Pluronic）タイプ）の選択により先ず第一に充たされる。ここで、エマルジョン中の脂質の含有率が１０及び２０％で、この脂質が、大豆油及びビタミンＥの重量比１：１の混合物からなる場合に、ポロキサマー４０７もしくはプルロニック１２７の含有率が２もしくは４％の量で、安定なエマルジョンを得ることができ、これは、タキソールの溶解度に関しては、特に乳化剤含有率４％で十分である。これらの合成乳化剤は、油不含ビタミンＥエマルジョンの製造にも使用することができた。それに対して、乳化剤として、リン脂質、特に卵レシチンを使用する場合、十分に安定であるエマルジョン中の油－ビタミンＥ比は、１：１に達成されず、かつこの文献によれば、唯一の脂質物質としてビタミンＥを含有するエマルジョンの製造は不可能である（例７参照）。例７によれば、乳化剤として卵レシチンを使用すると、ビタミンＥの含有率１０又は５０％で、かつ卵レシチンの含有率０．４～４％では、安定なエマルジョンを得ることはできなかった。リン脂質を用いて、安定なエマルジョンが得られた例は、大豆ホスファチドエピクロンの使用の際に、全ての場合に、油含有率３０％及びビタミンＥ含有率５％を呈示し、その際、大豆ホスファチド含有率は、４％であった。
【０００６】
乳化剤として卵レシチンを使用する唯一の例は、例４であり、ここで、１０００ｍｌに換算して、エマルジョン中の大豆油含分は３３０ｍｌであり、ビタミンＥ含分は８０ｇであり、かつ卵レシチン含分は６６ｇであった。過敏な患者へのそのようなエマルジョンを静脈内投与することは、不可能である。
【０００７】
特別な問題は、虚血及び後続の再潅流の際に起こる過酸化から生じる損傷である。それと

いうのも、これらは、一般に、最も重病の患者、例えば肝臓、心臓又は腎臓の大手術又は臓器移植を受ける患者にかかわるからである。脂質過酸化が原因の場合には、この損傷がビタミンＥの投与により、緩和することができるとの意見が生じた。従って、この損傷が事実ビタミンＥにより撲滅できるかどうか見るために、動物実験が、例えばマウス又はラットで実施された。常にでは無いが、多くの場合にこれらの実験で、虚血及び／又は再潅流の結果としての過酸化損傷が、ビタミンＥもしくはα－トコフェロールの投与により減じ得ることが判明した。

【０００８】

実験動物への複数の適用可能性、例えば経口又は腹腔内投与、のうち、静脈内適用も実験動物で検査された。従って、例えばIkezawa T.,Nishikimi N.,Oba Y.により、かれらの研究、「Lipidperoxides in the mechanism of ischemia/reperfusion injury in skeletal muscle;experimental studies」（VASC SURG 1993,27,191～201）で、再潅流の直前に数分に渡り、ビタミンＥ（オール－rac－トコフェロールアセテート：ポリエチレングリコール４００を用いて調製）５００ｍｇを、虚血－再潅流モデルである犬の骨格筋へ静脈内投与した際に、予期しうる虚血－再潅流損傷が減じられたことが確認された。このことは、特に、横紋筋融解が生じる徴候とみなされる、血清－クレアチン－ホスホキナーゼの著しい増加が、α－トコフェロール投与により、再潅流過程の間抑制される事実、及び生じたマロンジアルデヒド（ＭＤＡ）とチオバルビツール酸との反応からの有色反応生成物（ＴＢＡＲＳ：Thiobarbitursaere-Reaktive-Substanzen（チオバルビツール酸－反応性物質））として測定される、血清中の脂質過酸化物の増加がこれらの投与により阻害される事実により示される。更に、ビタミンＥが、経口で食道ゾンデを経て１．０ｍｇ／日の用量で、或いは中心静脈カテーテルを経て静脈内に０．５ｍｇ／日の用量で、それぞれ３日にわたり投与され、次いで、酸化ストレスに曝されたラットで、ビタミンＥを投与されていない対照動物に比べ、静脈内供給により、血漿及び大動脈内皮中にビタミンＥの著しい豊富化が達成できることが示され、その際、血漿中に達成されたビタミンＥ濃度は、ビタミンＥを２倍の用量で経口投与された動物に比べても著しく上昇した。ビタミンＥの投与は、脂質過酸化の程度に関して明らかな効果を示した。ビタミンＥを静脈内に得た動物のＴＢＡＲＳの血漿中濃度は、対照動物の血漿中よりも著しく低く、かつ酸化ストレス下で更に増加は認められなかった（Engelhart K.,Fuerst P.,Biesalski HK,Untersuchungen zur parenteralen Gabe von Vitamin E bei Ratten(Abstract)16 DGEM-AKE Jahrestagung, Stuttgart-Hohenheim,1997.Aktuelle Ernaehrungsmedizin 1997,22(1),49,50）。

【０００９】

そのような研究に使用されたα－トコフェロール調合物の詳細は、同じ作者の文献、K. Engelhart et al. Free Rad. Res.,Vol.29,pp.421～426,1998に記載されており、それによれば、実験動物として使用のラットにα－トコフェロール調合物を腸管外投与するために、市販の脂肪エマルジョンが使用され、それには、エマルジョン中のトコフェロール濃度が１２．５ｍｍｏｌ／ｌ（＝５．４ｇ／ｌ）に達するように、オール－rac－α－トコフェロールが添加されていた。市販の脂肪エマルジョンは、１００ｍｌ当たり、大豆油１０ｇ、卵レシチン１．２ｇ、グリセリン２．５ｇ、オレイン酸３０ｍｇ、ＮａＯＨ３ｍｌ及びビタミンＥ４μmol／lを含有した。即ち、リットル当たり大豆油１００ｇ、卵レシチン１２ｇ、グリセリン２５ｇ、オレイン酸３００ｍｇ及び水酸化ナトリウム溶液３０ｍｌを有する。実験動物として使用したラットに静脈内投与する前に、このエマルジョンを生理的食塩水で稀釈して、オール－rac－α－トコフェロール濃度を０．５８mmol／ｌ、即ち０．０２５ｇ／ｌにした。既に前記の K.Engelhart, P.Fuerst und H.K.Biesalskiの文献に記載のように、これを、ラットに、中心静脈カテーテルを介して、オール－rac－α－トコフェロール０．５ｍｇ／日の用量で３日に渡り静脈投与した。Engelhart et al.の文献：Free Rad. Research,Vol.29には、結果として、トコフェロール適用の効果に関して、細胞連合大動脈内皮中のα－トコフェロールレベルの著しい増加のみが記載されていた。

【００１０】

最後に、臓器保存溶液へのビタミンＥの添加についても動物実験で検査した（A.Demirbas et al.,Transplantation Proceedings 25(3),(1993)2274及びSilka Selliak et al.,Ceylon Medical Journal1995,40,97～100）。両方の研究で、ビタミンＥで処理された腎臓は、実施された臓器移植後、より僅かの過酸化及びより良好な腎機能を示した。

【００１１】

A.Demirbas et al.では、ビタミンＥとして、α－トコフェロールを使用しているが、どのように投与したかは、その研究から明らかにされていない。それに対して、Silka Selliakは、彼の工程方法を明記した。彼は、保存溶液に「水溶性ビタミンＥ（Merck）」を添加したが、これは、トコフェロールではなく、ビタミンＥ効果のあるフラグメント（Trolox）であり、それには疎水性部分が欠けている。

【００１２】

臓器移植の範囲内で、抗酸化作用ビタミンの過酸化損傷に及ぼす影響が、腎移植が実施された患者に関する「Rabl H.Khoschsorur G.,Colombo T.,Petritsch P.,Rauchenwald M.,Koeltringer P.,Tatzber F.,Esterbauer H.,“A multivitamin infusion prevents lipid peroxidation and improves transplantation performance”,Kidney International1993,43(4):912～917」で研究されている。その際、当時、仮説とみなされた意見は、腎移植の際の虚血及び再潅流による損傷は、脂質過酸化と関連しており、従って、抗酸化剤による脂質過酸化の阻止が、移植された腎機能の改善をもたらすにちがいないということを根拠とした。調査は３０人の患者について実施された。これら患者のうち１６人が、腎移植後に、まだ虚血段階で、腎臓の再潅流３０分前に、オムニビオンタ（Omnibionta）の名前で認可されているマルチビタミン溶液２０ｍｌを５００ｍｌまで稀釈した溶液を輸注された。この溶液により、各患者は、α－トコフェロールアセテート１０ｍｇ及びα－トコフェロール０．２ｍｇを得た。更に、投与溶液は、ビタミンＣ、ビタミンＡ及び５Ｂ－ビタミンを含有し、これら全てにも、抗酸化作用がある。投与マルチビタミン製剤は、水をベースとする調合物である。これは、補助溶剤として、３００ｍｇのベンジルアルコール、１０００ｍｇのポリソルベート８０、４００ｍｇのプロピレングリコール、５０００ｍｇの８５％グリセリン、７２０ｍｇのトロメタモール（Trometamol）及び容量２０ｍｌまでの水を含有する。この溶液を生理的食塩水で５００ｍｌまで稀釈した。その際、α－トコフェロールの用量は、ビタミンＥの１日当たりの推奨必要量にのみ相当するが、他方、ビタミンＣは、１日あたりの必要量の１３倍の量で、またビタミンＡは、１日あたりの必要量の６倍の量で投与された。血漿中のマロンジアルデヒド（ＭＤＡ）測定に基づく患者の血液標本の評価が、ビタミン溶液の投与時、再潅流３０分前並びに再潅流１、２、３及び４時間後に示すように、ビタミン溶液を用いて、ＭＤＡ－値の増加が阻止でき、一方、対照患者では、特に再潅流の開始１時間後に値の明らかな増加が記録された。これにより、再潅流の間、このビタミン溶液の投与が、リン脂質過酸化を抑止したことが立証された。同時に、クレアチニン－クリアランスに基づき、移植腎臓の腎機能の改善が、マルチビタミン溶液を輸注された各患者で報告された。その際、著者は、主効果はビタミンＣにあるとし、その作用は、フリーラジカルによる破壊に対して、原発の（primaere）抗酸化剤であるビタミンＥを保護する効果により説明され、従って、ビタミンＥのリサイクルがおそらく起こったのであった。Rabl et al.は、オムニビオンタが抗酸化作用のあるビタミンを有するオーストリアで唯一許可された調剤であったので、これが選択されたことにも言及した。従って、選択の手段は示さなかった。疎水性成分の溶解媒介のために、認容性を削減し、副作用を引起す物質、例えばベンジルアルコール、プロピレングリコール及び他の添加剤を必要とする水性ビタミン注入溶液の問題であることを考えても、このことは容易に理解され得る。そのような溶液は、難しい手術の間、即ちショック状態で患者に投与するのに殆ど適さない。結局のところ、トコフェロール用量は、非常に低く、その場合、主要量がアセテートとして存在し、このことから、それが完全に利用されないことは公知である。更に、移植実施後初めて、再潅流の３０分前に、製剤の注入が開始され、その際、輸液の主部分は、再潅流の開始時に供給されることが確認された。過酸化損傷の減少の成果は、再潅流の３０分前であるが、移植実施後に、基本値として、ＭＤＡ－値を得るこ

とにより探知された。しかしながら、過酸化損傷が再潅流の間にのみ予期されるのではなく、既に虚血の間に現れ、動物実験で確認されたように、特に、虚血段階で、細胞中に、キサンチンオキシダーゼ、ヒポキサンチン及びキサンチンが非生理的に富化している。Rabl et al.は、このことをはっきりと示唆している。再潅流の間の過酸化損傷は、供給された分子状酸素と反応して、ペルオキシ結合及びラジカルを形成する化合物の富化に、大部分、起因する。従って、虚血段階の間でも、保護を行うとよい。

【００１３】

従って、本発明の課題は、注入の形での静脈内投与に好適なα－トコフェロールの投薬形を発見することであり、特に、ショック下での患者にも十分耐えれるものを発見することである。それは、再潅流時にも虚血の段階でもカバーできるレベルでトコフェロールの好ましい１回用量を投与する事を可能にすべきである。このことは、それが、高程度の認容性により、優れているべきであることを意味する。

【００１４】

本発明により、この課題は、α－トコフェロールはエステル形ではなく、それ自体で投与され、輸液は、水中油エマルジョンとして処方されるが、このエマルジョンは、脂肪含分最大２．５重量％／容積を有し、その場合、リン脂質、特に卵レシチンは、乳化剤として使用され、同様に制限された量で、即ち最大０．３％の量で使用され、かつ該エマルジョンは、ＲＲＲ－α－トコフェロール、オール－rac－α－トコフェロール又は他の立体異性のα－トコフェロールを、作用に関して、ＲＲＲ－α－トコフェロールの少なくとも１．４８ｇ／ｌの濃度に相当する濃度で含有することにより解決した。

【００１５】

特に、極限の場合には、脂肪分は全く省いてよく、即ち、トコフェロールが唯一の油成分である。乳化剤としてリン脂質、特に卵レシチン、を有する脂肪エマルジョンは、その良好な認容性のために公知であり、かつ合成乳化剤より優れている。それというのも、これは、キロミクロンに類似しているからである。自体既に良好なこれの認容性は、本発明の処置により、更に高められる。従って、静脈内認容性に関しては、水及び有機溶剤を基礎とする系よりも明らかに優れている。

【００１６】

ＷＯ９７／０３６５１Danbiosyst UK LTDによる教示にかんがみて、作用物質としてのα－トコフェロール及び乳化剤としてのリン脂質を有する安定なエマルジョンが、本発明による低い油量及び乳化剤量で製造できることは、予期できないことであり、その際、容量単位当たりのα－トコフェロールの量の５倍までの増加は、油量及び乳化剤量の増加を必要としないことが、特に意想外である。担体成分としての油状物を添加せずに、α－トコフェロールエマルジョンを製造することに関しては、ＷＯ９７／０３６５１により、先入観すらあったので、その成功裏の製造は極めて意想外であり、かつ絶対に予期できることではなかった。

【００１７】

従って、本発明の対象は、ヒト臓器への過酸化による損傷、特に、虚血及び／又は再潅流による損傷に対して保護作用を有する、静脈内投与のための水中油型エマルジョンであって、これは、全エマルジョンに対して、オール－rac－α－トコフェロール、その立体異性体及び／又は各立体異性体の混合物の形のα－トコフェロールを、その作用に関して、ＲＲＲ－α－トコフェロール１．４８ｇ／l～３０ｇ／lに相当する量で含有し、かつ静脈内認容性油状物（i.v.vertraeglichen Oel）０～２５ｇ／ｌ、乳化剤としてのリン脂質０．２５ｇ／l～３ｇ／ｌ並びに容量オスモル濃度を生理学的値に調整する生理的非イオン性物質、またｐＨ値を５～９に調整する生理学的薬剤を含有する。

【００１８】

本発明によるエマルジョンは、輸液として患者に投与するのが好ましく、血液供給不足は事故が原因なのかあるいは手術の過程で引起されたのにちがいないかどうかに無関係に、血液が不足することにより患者に負荷がかけられ、かつ引き続きの外科的処置により更に負荷をかけられるので、本発明によるエマルジョンの投与により、負荷をできるだけ縮小

することが望ましい。本発明によるエマルジョンでは、ＲＲＲ－α－トコフェロール３．７ｇ～２２ｇ／ｌに相当するα－トコフェロール含分が有利であり、その際、α－トコフェロールの他に静脈内認容性油状物を含有するエマルジョンに関しては、油状物が１ｇ／ｌ～２５ｇ／ｌの量であるのが好ましく、但し、乳化剤として使用されるリン脂質含分は、１ｇ／l～３ｇ／ｌである。油状物の添加を省いた場合は、同じα－トコフェロール含有量で、リン脂質含分は、０．２５ｇ／l～１．２５ｇ／ｌであるのが好ましい。

【００１９】

静脈内認容性の油状物を使用しないエマルジョンは、輸液として、悪い状態又は全く危篤の状態の患者に投与するのに特に好適である。α－トコフェロールとして、オール－rac－α－トコフェロールを使用するのが有利である。

【００２０】

油成分としては、静脈内に投与される脂肪エマルジョン中に使用するのが好ましい全ての油状物を使用することができる。そのようなものとして、特に、ヒマワリ油、オリーブ油、コーン油、ベニバナ油、綿実油及び落花生油並びに中鎖トリグリセリドを有する油が挙げられるが、種々の魚油も挙げることができる。大豆油が特に有利である。リン脂質としては、植物性のホスファチド、特に大豆ホスファチドを使用できるが、卵ホスファチドが有利である。本発明によるエマルジョンが最適の認容性を得ることを目的とするので、容量オスモル濃度を生理値まで調整することは欠くべからざることである。この目的に役立つ生理的、非イオン性物質としては、糖アルコール、特にマンニット及びグリセリンが使用されるが、低分子アミノ酸、例えばグリシンを使用することもできる。この場合、グリセリンの使用が好ましい。本発明によるエマルジョンの安定性を長鎖脂肪酸の添加により高めることも利点であり得、添加の割合は、全エマルジョンに対して最大０．６％である。オレイン酸が、この目的に特に好適である。

【００２１】

本発明によるエマルジョンの安定性を更に高めることが所望の場合には、安定性促進作用のある他の添加物により、このことを達成することができる。そのようなものとして、特に以下のもの：

ジミリストイルホスファチジル－グリセリン（有利に０．０２５ｇ／ｌ～０．２４ｇ／ｌの量で）、

ユビデカレノン（有利に０．２ｇ／ｌ～０．６ｇ／ｌ）、

コレステリン（有利に０．１ｇ／ｌ～０．５ｇ／ｌ）

が挙げられる。

【００２２】

前記文献、Rabl et al.,Kidney International 1993,(4),912～917、では、過酸化阻害作用の主部分は、投与された水性－有機溶液中の比較的高い割合のアスコルビン酸塩のせいだとされている。ビタミンＣは、親水性抗酸化薬である。その脂質過酸化を抑制する作用は、Rabl et al.によれば、フリーラジカルによる破壊からのビタミンＥの保護に基づき、このことは、ビタミンＥのリサイクルに匹敵する。Rabl et al.により使用された溶液にとり、このことは特に重要である。それというのも、この溶液中にα-トコフェロール含分は、非常に僅かであり、その上、その主要量が酢酸塩として存在しているからである。本発明によれば、所定の調剤のエマルジョン形中に、実質的により高いビタミンＥ含分を使用できるので、本質的な作用は、ビタミンＣ含分のせいではない。アスコルビン酸塩（Ascorbat）は、エマルジョンの安定性に対しマイナス作用を有し得るので、アスコルビン酸塩の含有は必ずしも意図されなかった。しかしながら、生物学的還元性水素ドナー（特にビタミンＣ及びグルタチオン）が不足している場合は、アスコルビン酸塩含分は有利な作用を有し得る。そのような場合には、エマルジョンの安定性に実質的な影響を与えないので、アスコルビン酸塩を本発明によるエマルジョンに、アスコルビン酸パルミテートとして添加することが意図される。１２～２５ｇ/ｌの量で使用するのが好ましい。

【００２３】

最初に、水、乳化剤、容量オスモル濃度の調整のための物質及び所望の場合には長鎖脂肪

酸から、水性相を懸濁液の形で、高速撹拌機を用いて製造することにより、本発明によるエマルジョンの製造が、確かな方法で行われ、この水性相はＮａＯＨの添加により、所望のｐＨ値７～９に調整される。次いで、この懸濁液に、油中のα-トコフェロールの混合物か又はα-トコフェロール単体の形で、油相が添加される。補助的にエマルジョン安定剤を使用するならば、これは、水性懸濁液又は水性相に混加する前の油相に添加する。次いで、この混合物を同じ高速撹拌機で加工して、プレエマルジョンにする。本発明のエマルジョンにアスコルビン酸パルミテートを添加する場合は、プレエマルジョンの製造後に、有利には最初の均一化段階の後で、このことを行う。

【００２４】
高速撹拌機として、ベコミックス（Becomix）又はウルトラトゥラックス（Ultraturrax）のような装置がこれに該当する。両方の混合段階は、高められた温度で、好ましくは６０～７０℃で行うのが有利である。

【００２５】
そのようにして水性相及び油相から得られたプレエマルジョンに、次いで、高圧乳化を施し、その際、高圧ホモジナイザー又はミクロ流動化装置（Microfluidizer）を使用することができる。そうして得られたエマルジョンを、壜に充填し、回転オートクレーブで熱滅菌する。

【００２６】
本発明によるエマルジョンを、その結果が１つの偶発事件から生じるのか又は故意に引起されたのかには無関係で、後続の再潅流を伴うすべての形の虚血の治療に使用することができる。本発明による適用のための基本原則は、組織中に相応して高いα-トコフェロールレベルを製造して、虚血の全段階も再潅流の段階もカバーし、かつどの手術の開始前にも患者に投与し、しかも、有利には、最適の組織レベルに調整するのに十分な時間を使用できるように、非常に早期に投与するということである。これは、過酸化に対する有効な保護のために最適必要条件を設立すると共に、患者が、手術により引起されるショック状態にまだなっていない、という利点もある。このことは、Rabl et al.により規定された、虚血段階、しかも再潅流開始の３０分前での投与には当てはまらない。

【００２７】
臓器の１つを外科的手段で治療すべき患者に、手術による処置、例えば、相当する臓器への血液供給の中止を必要とする、肝臓の部分切除又は心臓開手術、が問題となる場合には、手術開始１２～２４時間前に１回用量の投与が指示される。しかしながら手術の４～５日前に既に適用し始め、かつ１日間隔で複数の用量を投与することも可能であるが、その際、最後の用量は、有利には、手術開始前２４時間より遅く投与すべきでない。どの場合にも、患者の組織中に最適のトコフェロールレベルを実際に得るために、このことが推奨される。

【００２８】
手術的処置が臓器移植である場合には、できれば提供者及び被移植者に本発明のエマルジョンを投与すべきであり、その場合、両者とも、手術の少なくとも１２時間前に適用する努力をすべきである。本発明のエマルジョンを臓器除去の直前にのみ提供者に投与するのが可能な場合には、それにもかかわらず、提供者及び被移植者に本発明のエマルジョンを投与し、かつ有利には臓器保存液にも添加することが指示されている。このことは、また、長距離輸送が必要であり、しかも提供者が本発明のエマルジョンを適時に得ることができた場合にも推奨される。臓器保存溶液への添加は、提供者への投与が不可能であった場合に、特に重要である。

【００２９】
有利に投与される用量は、２～５０ｍｇ／ｋｇ　ＫＧ、特に１０～４０ｍｇ／ｋｇ　ＫＧα-トコフェロールであり、これは、輸液として、有利には１回投与として、又は４～５回の１日服用量に分けても投与される。これらの用量は、臓器移植での被移植者及び提供者にも当てはまり、両者とも完全な用量を得るべきである。

【００３０】

本発明によるエマルジョンの保護作用は、種々の動物モデルで調査した。ラットでのモデル実験では、肝臓の部分虚血及び部分切除後の生存率を検査した。肝臓部分切除のモデルで、所謂「暖（warme）」虚血を調査することができる。その場合、問題臓器の生理活性は、虚血（酸素及び栄養素の供給不足）にもかかわらず保持される。従って、虚血により引起される損傷は、このモデルで非常にはっきりと現れる。暖虚血とは反対に、「冷(kalte)」虚血では、問題臓器の生理活性は減じられ、従って、虚血耐性は明らかに高まる。この冷虚血の例は、特に、臓器移植実験用動物モデルである。損傷は、しばしば再潅流の過程で初めて明らかになるので、虚血段階により引起された臓器損傷は、虚血のこの形では、あまりはっきりとはせず、生理的条件の変化に基づき時間的に異なる経過も示す。

【００３１】

手術後７日間に渡り、肝臓部分切除のモデルで、死亡率を調査した。経験によると、このモデルにおいて、部分的肝臓虚血６０分後の死亡率は、５０％であった。このモデルの場合には、手術の間、左及び中央肝葉（全肝臓の７０％）への門脈及び動脈分岐を一時的に挟むことにより、肝葉に部分的肝臓虚血が６０分にわたり生じる。この時間後、箝子をはずすことにより血液供給を再びはじめる（再潅流）。引き続き、その間、正常に血液が流れていた残りの肝臓を手術で除去する（切除）。動物は、暖（体温）虚血により損傷された肝葉のみを有する。

【００３２】

手術処置直前での、本発明のエマルジョンを用いるα－トコフェロール４０ｍｇ／ｋｇの適用は、死亡率低下を生じた。この効果は、明らかに時間に依存した。最大効果は、手術的処置２４時間前に本発明のエマルジョンを用いて、α－トコフェロール４０ｍｇ／ｋｇを適用した後に得られた。この実験では、生存率は、１００％であった。他の手術による同様の実験では、実験動物は、再潅流段階の開始3時間後に死亡し、かつ肝臓組織生検で及び肝臓酵素に基づき肝臓損傷を検査した。

【００３３】

臓器損傷用のマーカーとして、これらの実験では、トランスアミナーゼ（ＧＯＴ、ＧＰＴ、ＧＩＤＨ及びＬＤＨ）の血清レベルを測定した。生存率実験と同様に、保護効果が明らかに時間依存性であることが判明した。本発明のエマルジョンを手術処置２４時間前に適用した場合に、効果が最大であった。このモデルで、脂質過酸化（ＴＢＡＲＳ）について、肝臓生検の組織に同様の結果が見られた。

【００３４】

肝臓同所移植モデルでは、移植される臓器は、代替される臓器と空間的に一致したものが使用される。この「冷」虚血用モデル（提供臓器は、除去後、臓器保存のための冷却された溶液中に移植まで貯蔵される）については、ラットでの実験で、本発明によるエマルジョンの適用後、トランスアミナーゼの上昇と脂質過酸化の程度とを、さらにはっきりと減じることができた。トランスアミナーゼの減少は、平均して約７５％であり、ＭＤＡ－値で測定される脂質過酸化の程度は、５０％より多く減少された。

【００３５】

用量依存性は、肝臓の部分虚血のモデルで検査した。記述された効果は、直接に用量依存性であり、その場合、特にα－トコフェロールの１０～４０ｍｇ／ｋｇの範囲で、トランスアミラーゼの著しい減少が観察された。

【００３６】

これらの実験から以下の結論を出すことができる。即ち、本発明によるエマルジョンの投与により、冷及び暖虚血後の肝臓の虚血／再潅流損傷を制限することができるということである。冷虚血（移植）の際は、内皮細胞が保護され、他方、暖虚血の際には、肝細胞が直接保護される。術前の補足によるα－トコフェロール組織レベルの十分な飽和は、本発明によるエマルジョンの適用により保証される。臓器機能は、一方では術後の肝細胞への直接的保護効果により、他方で血管内皮の保護による改良されたミクロ循環により、改善される。本発明によるエマルジョンの投与は、更に、肝臓同所移植のモデルにおいて、脂質過酸化の減少で測定される直接の抗酸化効果及び細胞消滅防止効果（anti-apoptotisch

en Effect）により、虚血／再潅流の結果として生じた細胞損傷に対しプラスの影響を有する。

【００３７】

例１

無水グリセリン２５ｇをベコミックス（Becomix）中で、注射用蒸留水（Wasser ad injectionem）２２０ｍｌと、温度６０～７０℃で混合し、卵レシチン（Ｅ－８０、Firma:Lipoid）３ｇ、オレイン酸０．２ｇ、ｐＨ値８～９に調整するための１Ｎ苛性ソーダ溶液約０．７ｍｌ及び水８０ｍｌの懸濁液をこれに添加した。ＲＲＲ－α－トコフェロール４ｇに相当する、オール－rac－α－トコフェロール５．４ｇを大豆油２５ｇと混合し、混合物を６０～７０℃迄予熱し、水性懸濁液に装入し、かつ高圧ホモジナイザーを用い、圧力３５０バールで４段階で均一化する。生じたエマルジョンは、注射用蒸留水で１０００ｍｌまで補充し、１００ｍｌガラス壜に充填し、回転オートクレーブ中で、１２１℃で熱殺菌する。これらの１００ｍｌ壜は、例えば移植、例えば肝臓又は腎臓の移植、の際にヒトに適用されるための1日用量である。

【００３８】

例２

６０～７０℃に加温された、無水グリセリン２５ｇ、注射用蒸留水２２０ｍｌ、卵レシチン３ｇ、オレイン酸０．２ｇ及び１Ｎ苛性ソーダ溶液約０．７ｍｌを高速撹拌機（例えばUltra Turrax）中に少しずつ装入し、均一な懸濁液に加工する。ＲＲＲ－α－トコフェロール２０ｇに相当する、オール－rac－α－トコフェロール２７ｇを大豆油２５ｇと予混合し、撹拌容器中に予装入しておいた水性懸濁液に添加する。高速撹拌機を用いて、プレエマルジョンをこれから製造する。次いで、これは、ミクロ流動化装置中で、６００バールで、５段階で均一化する。注射用蒸留水で１０００ｍｌまで補充した後、５０ｍｌガラス壜に充填し、例１に記載のようにして、殺菌する。

【００３９】

例３

無水グリセリン２５ｇ、オレイン酸０．１ｇ及び卵レシチン１．０ｇを、ｐＨ値８～９に調整された水３００ｍｌと一緒に、高速撹拌機中で、６０～７０℃で、加工して懸濁液にする。この混合物に、ＲＲＲ－α－トコフェロール４ｇに相当する、オール－rac－α－トコフェロール５．４ｇを直接装入し、高速撹拌機を用いて、加工してプレエマルジョンにする。均一化を例２に記載のようにして行う。注射用蒸留水で１ｌまで補充し、１００ｍｌガラス壜に充填し、例１に記載のようにして、熱殺菌した後、エマルジョンは、酸化損傷の減少のために、特に過敏な患者の場合にも好適である。

【００４０】

例４

６０～７０℃に加温された、無水グリセリン２２．５ｇ、注射用蒸留水２２０ｍｌ、卵レシチン２ｇ、オレイン酸０．２ｇ、ユビデカレノン０．４ｇ及び１Ｎ苛性ソーダ溶液約０．７ｍｌを高速撹拌機（例えばUltra Turrax）中に少しずつ装入し、均一な懸濁液に加工する。ＲＲＲ－α－トコフェロール２．２ｇに相当する、オール－rac－α－トコフェロール３ｇを大豆油１２ｇと予混合し、撹拌容器中に予装入しておいた水性懸濁液に添加する。高速撹拌機を用いて、プレエマルジョンをこれから製造する。次いで、これは、ミクロ流動化装置中で、６００バールで、５段階で均一化する。注射用蒸留水で１０００ｍｌまで補充した後、充填し、例１に記載のようにして、殺菌する。

【００４１】

例５

６０～７０℃に加温された、無水グリセリン２２．５ｇ、注射用蒸留水２２０ｍｌ、卵レシチン２．５ｇ、オレイン酸０．６ｇ及び１Ｎ苛性ソーダ溶液約０．７ｍｌを高速撹拌機（例えばUltra Turrax）中に少しずつ装入し、均一な懸濁液に加工する。ＲＲＲ－α－トコフェロール７．４ｇに相当する、オール－rac－α－トコフェロール１０ｇを大豆油２０ｇと予混合し、撹拌容器中に予装入しておいた水性懸濁液に添加する。高速撹拌機を

用いて、これからプレエマルジョンを製造する。次いで、これは、ミクロ流動化装置中で、６００バールで、１回で均一化する。この粗エマルジョンにアスコルビン酸パルミテート２３．４ｇを溶解させ、その後、更に４回、６００バールで均一化させる。そうして得られたエマルジョンを、例４に記載のようにして、引き続き加工する。

フロントページの続き

(51)Int.Cl.			ＦＩ	
Ａ６１Ｋ	*47/28*	*(2006.01)*	Ａ６１Ｋ	47/28
Ａ６１Ｋ	*47/22*	*(2006.01)*	Ａ６１Ｋ	47/22
Ａ６１Ｋ	*47/20*	*(2006.01)*	Ａ６１Ｋ	47/20
Ａ６１Ｋ	*47/44*	*(2006.01)*	Ａ６１Ｋ	47/44
Ａ６１Ｐ	*39/06*	*(2006.01)*	Ａ６１Ｐ	39/06

(72)発明者　エッゲンライヒ，ウド
　　オーストリア国、アー　８０１０　グラーツ、グラーツバッハガッセ　５３／７／４９
(72)発明者　ファイヒティンガー，ノルベルト
　　オーストリア国、アー　８０５３　グラーツ、ケルントナーシュトラーセ　２２／Ｘ／４４
(72)発明者　ホーファー，ゲラルト
　　オーストリア国、アー　８１４１　ウンタープレムシュテッテン、ドクター・カール‐レンナーヴェーク　２
(72)発明者　シャウプ，カーリン
　　オーストリア国、アー　８０４７　グラーツ、カインバッハ　１７０
(72)発明者　ゾンマーマイヤー，クラウス
　　ドイツ連邦共和国、デー　６１１９１　ロスバッハ・フォン・デア・ヘーエ、イン・デア・ラウバッハ　２６
(72)発明者　ヴルム，アンネリーゼ
　　オーストリア国、アー　８０１０　グラーツ、レオンハルトシュトラーセ　１０３
(72)発明者　ナーゲル，エックハルト
　　ドイツ連邦共和国、デー　３０９００　ヴェーデマルク、イン・デア・ドゥーデンボステル　１４
(72)発明者　マイヤー・ツ・フィルゼンドルフ，アンドレアス
　　ドイツ連邦共和国、デー　３２２５７　ビュンデ、クレフハーゲン　５

審査官　高橋　樹理

(56)参考文献　特開昭５８－１６２５１７（ＪＰ，Ａ）
特開昭４９－０５０１２４（ＪＰ，Ａ）
特開昭５７－１６３３１３（ＪＰ，Ａ）
PUNZ, A. et al., Clinical Nutrition, １９９８年　4月, Vol.17, p.85-87
ENGELHART, K. et al., Free Rad. Res., １９９８年１１月, Vol.29, p.421-426

(58)調査した分野(Int.Cl.，ＤＢ名)
A61K　31/355
A61K　 9/107
CA/MEDLINE/(STN)