



(19) 中華民國智慧財產局

(12) 發明說明書公告本

(11) 證書號數：TW I596208 B

(45) 公告日：中華民國 106 (2017) 年 08 月 21 日

(21) 申請案號：102131958 (22) 申請日：中華民國 102 (2013) 年 09 月 05 日  
 (51) Int. Cl. : C12M3/00 (2006.01) A61M1/00 (2006.01)  
 (30) 優先權：2012/09/08 日本 2012-197986  
 (71) 申請人：器官再生工學股份有限公司 (日本) ORGAN TECHNOLOGIES INC. (JP)  
 日本  
 (72) 發明人：辻孝 TSUJI, TAKASHI (JP)；大島正充 OSHIMA, MASAMITSU (JP)  
 (74) 代理人：洪武雄；陳昭誠  
 (56) 參考文獻：  
 US 2008/0017194A1 WO 2011/140241A2  
 審查人員：林佳慧  
 申請專利範圍項數：7 項 圖式數：22 共 65 頁

## (54) 名稱

用於移植的臟器或組織的長期維持方法

METHOD FOR LONG-TERM MAINTENANCE OF ORGANS OR TISSUES FOR TRANSPLANTATION

## (57) 摘要

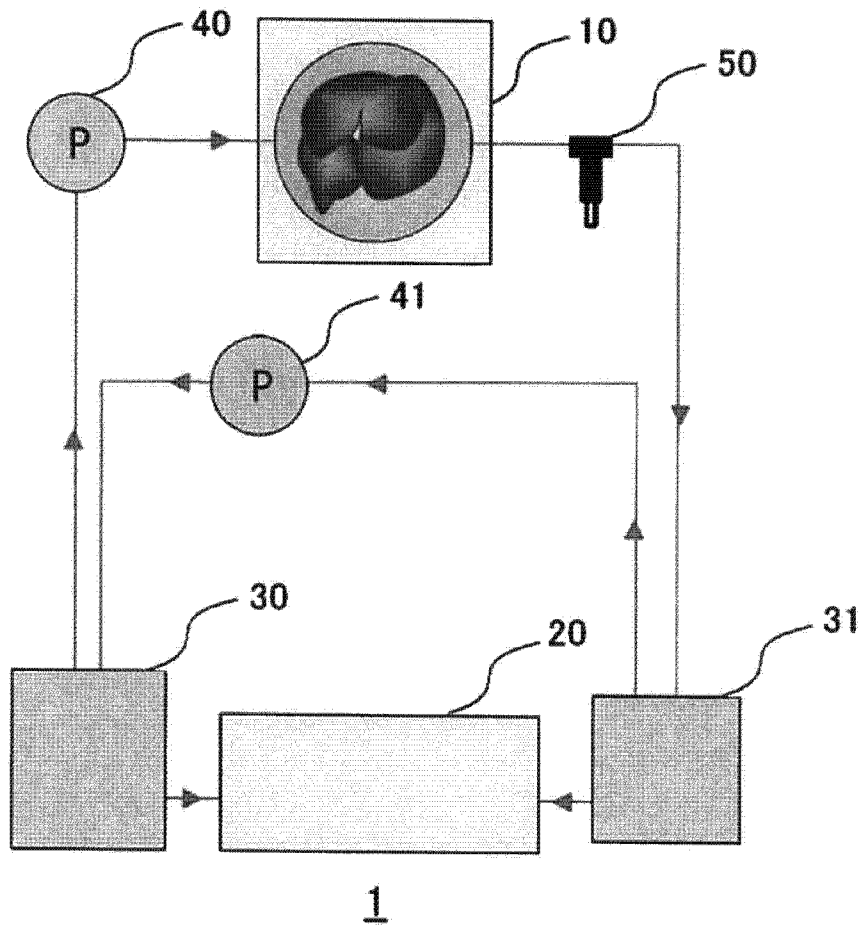
本發明之課題為提供可原樣維持用於移植之臟器或組織之功能並長期保存的技術。

又，本發明之課題為提供利用該技術，抑制伴隨溫缺血及再灌流而來之組織損害，並使來自心跳停止之捐贈者之臟器回復至適於移植之水準的技術。

本發明提供一種維持方法，其係使用灌流液進行灌流，而長期維持用於移植之哺乳類之臟器或組織的方法，該方法包含以下各步驟：(a) 將用於使前述灌流液流入之灌流液流入用插管連接於前述「臟器或組織」的步驟；(b) 從前述「臟器或組織」連接用於使前述灌流液流出之灌流液流出用插管的步驟；(c) 將包含氧運輸體及血液凝固阻礙劑之灌流液灌流於前述臟器或組織內的步驟。

The purpose of this invention is to provide a method for maintaining the normal functions of an organ or a tissue for transplantation, as well as for long-term storage. Another purpose of the present invention is to provide a method for inhibiting the tissue damage along with warm ischemia and re-perfusion with the above method, in order to recover an organ from a heart-stopped donor to the state suitable for transplantation. Further, provided is a method for long-term maintenance of a mammal organ or tissue for transplantation by perfusing a perfusate, comprising the following steps: (a) a step of linking the “organ or tissue” to a perfusate influent cannula for flowing the perfusate therein, (b) a step of linking a perfusate effluent cannula to the “organ or tissue” for flowing the perfusate therefrom, and (c) a step of perfusing the perfusate containing an oxygen transporter and an inhibitor of blood coagulation into the “organ or tissue.”

指定代表圖：



第1圖

符號簡單說明：

1 . . . 灌流回路

10 . . . 臟器固定用  
灌流容器20 . . . 簡易型動物  
細胞培養裝置

30、31 . . . 容器

40、41 . . . 蠕動泵

50 . . . 灌流液回收  
端口

## 發明摘要

※ 申請案號：102131958

※ 申請日：102/09/05

※IPC 分類：C12M 3/00 (2006.01)

A61M 1/00 (2006.01)

**【發明名稱】(中文/英文)**

用於移植的臟器或組織的長期維持方法

METHOD FOR LONG-TERM MAINTENANCE OF ORGANS OR  
TISSUES FOR TRANSPLANTATION

**【中文】**

本發明之課題為提供可原樣維持用於移植之臟器或組織之功能並長期保存的技術。

又，本發明之課題為提供利用該技術，抑制伴隨溫缺血及再灌流而來之組織損害，並使來自心跳停止之捐贈者之臟器回復至適於移植之水準的技術。

本發明提供一種維持方法，其係使用灌流液進行灌流，而長期維持用於移植之哺乳類之臟器或組織的方法，該方法包含以下各步驟：(a)將用於使前述灌流液流入之灌流液流入用插管連接於前述「臟器或組織」的步驟；(b)從前述「臟器或組織」連接用於使前述灌流液流出之灌流液流出用插管的步驟；(c)將包含氧運輸體及血液凝固阻礙劑之灌流液灌流於前述臟器或組織內的步驟。

**【英文】**

The purpose of this invention is to provide a method for maintaining the normal functions of an organ or a tissue for transplantation, as well as for long-term storage. Another purpose of the present invention is to provide a method for inhibiting the tissue damage along with warm ischemia and re-perfusion with the above method, in order to recover an organ from a heart-stopped donor to the state suitable for transplantation. Further, provided is a method for long-term maintenance of an mammal organ or tissue for transplantation by perfusing a perfusate, comprising the following steps: (a) a step of linking the "organ or tissue" to a perfusate influent cannula for flowing the perfusate therein, (b) a step of linking a perfusate effluent cannula to the "organ or tissue" for flowing the perfusate therefrom, and (c) a step of perfusing the perfusate containing an oxygen transporter and an inhibitor of blood coagulation into the "organ or tissue."

**【代表圖】**

**【本案指定代表圖】**：第（ 1 ）圖。

**【本代表圖之符號簡單說明】**：

1	灌流回路
10	臟器固定用灌流容器
20	簡易型動物細胞培養裝置
30、31	容器
40、41	蠕動泵
50	灌流液回收端口

**【本案若有化學式時，請揭示最能顯示發明特徵的化學式】**：

本案無化學式

# 發明專利說明書

(本說明書格式、順序，請勿任意更動)

## 【發明名稱】(中文/英文)

用於移植的臟器或組織的長期維持方法

METHOD FOR LONG-TERM MAINTENANCE OF ORGANS OR  
TISSUES FOR TRANSPLANTATION

## 【技術領域】

【0001】本發明主要係關於原樣維持用於移植之臟器或組織之功能並長期保存的維持方法以及臟器或組織的摘出方法。又，本發明係關於用於移植之臟器或組織。

## 【先前技術】

【0002】就對於因疾病或事故所造成之臟器之不可逆功能衰竭的治療而言，現今主要係進行臟器移植。雖然因免疫抑制劑及移植技術的進展，移植件數增加，其成功率飛躍性地上升，但是長期臟器不足成爲移植醫療的嚴重問題(非專利文獻 1)。爲了因應此種臟器不足，移植用動物之臟器的移植方法、或不易引起免疫學上排斥反應之基因改造動物的開發(非專利文獻 2、3)，再者，以用人工物代替臟器之功能作爲目標之人工臟器的開發(非專利文獻 4)雖已有進展，然而至今任何技術開發仍均無法代替成體臟器的功能。

【0003】供移植之捐贈者之臟器不足，不僅係因所提供之臟器的數目不足，在可移植狀態之摘出臟器所能保存的時間短亦爲重大原因之一。因此，不斷開發用於將摘出之臟器在活體外以可移植狀態長期保存的技術。現今最廣爲使用之方法，係爲了抑制

細胞之代謝而將臟器內血液以低溫之臟器保存液置換後，將臟器浸漬於低溫保存液的單純冷卻法。又，有以除去保存之臟器內之老舊廢物為目的，而使低溫之臟器保存液灌流於臟器內血管網並於低溫浸漬保存的灌流冷卻保存法，最近在歐美正進行該法之治療實驗(非專利文獻 5)。然而，以此等方法所保存之臟器的安全使用期限，一般認為腎臟為 60 小時，肝臟為 20 小時，因而尋求使保存期間更為延長的技術。

【0004】又，除了上述問題之外，就造成捐贈者之臟器數目不足之其他要因而言，有：由於過半數的志願捐贈者因心跳停止而已經死亡，因此可提供之臟器有限。來自心跳停止捐贈者之臟器移植與來自腦死捐贈者之臟器移植相異，在從心跳停止至臟器摘出保存之前，出現流向臟器之血流停止的期間，亦即「溫缺血」之期間。在溫缺血狀態之臟器或組織中，發生因 ATP 之枯竭所造成之細胞膨脹損害，或以次黃嘌呤(hypoxanthine)開始之老舊廢物之累積。在細胞內累積之次黃嘌呤，當血流再次流入臟器或組織時，將被氧化之灌流液急速地代謝。在此過程中，因大量活性氧產生而引起組織損害，且亦有由分泌自細胞之細胞激素等所引發之接受臟器移植之接受者的全身性之急性休克。

【0005】基於伴隨溫缺血及再灌流而來之臟器或組織損害，溫缺血之狀態若持續數分鐘，則臟器變得不適於移植，因此現今來自醫院外因非預期心跳停止而死亡之捐贈者的臟器，其移植適應率僅在 10%以下，再者其移植生存率停留在約 70%。(非專利文獻 6)

【0006】亦即，來自心跳停止捐贈者之臟器的移植適應率，

與來自腦死捐贈者之臟器的移植適應率相比，係停留在非常低的水準，爲了擴增捐贈者之臟器數目，期望開發可提供來自心跳停止捐贈者之臟器的技術。

[先前技術文獻]

[非專利文獻]

**【0007】**

[非專利文獻 1] Lechler RI. et al. : Nat. Med. 11(6) : 605,2005

[非專利文獻 2] Eventov-Friedman S. et al. : Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 102(8) : 2928,2005

[非專利文獻 3] Yang YG. et al. : Nat. Rev. Immunol. 7(7) : ,5192007

[非專利文獻 4] Malchesky PS. et al. : Artif. Organs. 30(9) : 655,2006

[非專利文獻 5] Moers C. et al. : N. Engl. J. Med. 360(1) : 7,2009

[非專利文獻 6] Fondevila C. et al. : Am. J. Transplant. 12 : 162-170,2012

**【發明內容】**

[發明之概要]

[發明所欲解決之課題]

**【0008】**本發明之課題爲提供可原樣維持用於移植的臟器或組織的功能並長期保存的技術。又，本發明之課題爲提供利用該技術，抑制伴隨溫缺血及再灌流而來之組織損害，使來自心跳停止之捐贈者之臟器或組織回復至適於移植之水準的技術。

[用於解決課題之手段]

【0009】本發明人等，為了解決上述課題而重複檢討之結果，發現藉由使用包含氧運輸體及血液凝固阻礙劑之灌流液進行灌流，可長期維持在顯著地抑制臟器或組織之損害的狀態下。

又，本發明人等發現藉由將灌流時之臟器或組織之溫度保持於所設定之範圍，可更顯著地抑制臟器或組織的損害。

再者，本發明人等發現對於因心跳停止而成為溫缺血狀態之臟器或組織，藉由使用包含氧運輸體及血液凝固阻礙劑之灌流液來灌流，可使一度成為溫缺血狀態之臟器或組織回復至近似心跳停止前之臟器或組織的狀態，因而完成本發明。

【0010】亦即，本發明提供一種維持方法，其係使用灌流液進行灌流，而長期維持用於移植之哺乳類之臟器或組織的方法，該方法包含以下各步驟：(a)將用於使前述灌流液流入之灌流液流入用插管連接於前述「臟器或組織」的步驟；(b)從前述「臟器或組織」連接用於使前述灌流液流出之灌流液流出用插管的步驟；(c)將包含氧運輸體及血液凝固阻礙劑之灌流液灌流於前述臟器或組織內的步驟。

其中，在根據本發明之用於移植之哺乳類之臟器或組織的長期維持方法之一實施態樣中，其特徵為在前述步驟(c)中，前述氧運輸體係紅血球。

在根據本發明之用於移植之哺乳類之臟器或組織的長期維持方法之一實施態樣中，其特徵為使前述步驟(c)中之灌流液循環。

在根據本發明之用於移植之哺乳類之臟器或組織的長期維持方法之一實施態樣中，其特徵為進一步包含以下之步驟：(d)在前述步驟(c)之前，使包含氧運輸體及血液凝固阻礙劑之灌流液灌流

至前述「臟器或組織」中，洗淨前述「臟器或組織」，並且，隨後將使用於該洗淨之灌流液除去之步驟。

在根據本發明之用於移植之哺乳類之臟器或組織的長期維持方法之一實施態樣中，其特徵為在前述步驟(c)中，前述「臟器或組織」係與活體內連接於前述「臟器或組織」之第二「臟器或組織」一起摘出，藉由固定前述第二「臟器或組織」，將前述「臟器或組織」以垂吊之狀態進行灌流。

在根據本發明之用於移植之哺乳類之臟器或組織的長期維持方法之一實施態樣中，其特徵為在前述步驟(c)中，使前述「臟器或組織」以其至少一部分承受浮力之方式浸漬於液體中。

在根據本發明之用於移植之哺乳類之臟器或組織的長期維持方法之一實施態樣中，其特徵為在前述步驟(c)中，將前述「臟器或組織」之溫度維持於 4°C 至 37°C 之狀態。

在根據本發明之用於移植之哺乳類之臟器或組織的長期維持方法之一實施態樣中，其特徵為前述血液凝固阻礙劑係肝素 (heparin)。

在根據本發明之用於移植之哺乳類之臟器或組織的長期維持方法之一實施態樣中，其特徵為前述「臟器或組織」係選自肝臟、腎臟、胰臟、心臟、肺、胃、睪丸、卵巢、眼球所構成之群組的「臟器或組織」。

【0011】又，若根據本發明之另一態樣，提供一種摘出方法，其係為了長期維持用於移植之哺乳類之臟器或組織而採行的前述「臟器或組織」的摘出方法，該方法包含以下之步驟：(f)將前述「臟器或組織」從前述哺乳類摘出的步驟，及(g)在前述步驟(f)之

前，將血液凝固阻礙劑投予至前述哺乳動物的步驟，其中前述哺乳類為非人類或人類(但是，限於腦死患者之人類)。

【0012】再者，若根據本發明之另一態樣，提供一種臟器或組織，其係用於移植之哺乳類之臟器或組織，其特徵為前述「臟器或組織」係從哺乳類摘出者，前述「臟器或組織」中之血液已用包含氧運輸體及血液凝固阻礙劑之灌流液置換。

[發明之效果]

【0013】根據本發明之臟器或組織之長期維持方法，藉由使用添加有氧運輸體及血液凝固阻礙劑之灌流液灌流用於移植之臟器或組織，可長期維持在顯著地抑制臟器摘出後之臟器等之損害的狀態下。又，藉由將灌流時之臟器或組織的溫度保持於所設定的範圍，可更進一步長期維持在顯著地抑制臟器或組織之損害的狀態下。再者，藉由使用添加有氧運輸體及血液凝固阻礙劑之灌流液灌流心跳停止後之臟器或組織，可使因溫缺血而發生損害，成為不適用於移植之臟器或組織的構造及功能回復至可移植之狀態。藉此，可原樣維持用於移植之臟器或組織之功能並長期保存，而以良好之狀態提供移植。

### 【圖式簡單說明】

#### 【0014】

第 1 圖為本發明之一實施態樣，係展示灌流回路的概略圖。

第 2 圖展示在改變灌流液中之紅血球濃度條件下灌流剛宰殺後之大鼠的肝臟 48 小時時，灌流液中 ALT 活性上升的比較圖。

第 3 圖展示剛宰殺後之大鼠肝臟組織的染色圖，以及在改變灌流液中之紅血球濃度條件下灌流剛宰殺後之大鼠肝臟 48 小時

後之組織的染色圖。

第 4 圖展示在改變灌流期間之肝臟之溫度條件下灌流剛宰殺後之大鼠肝臟時，灌流液中 ALT 活性上升的比較圖。

第 5 圖展示剛宰殺後之大鼠肝臟組織的染色圖，以及在改變灌流期間之肝臟之溫度條件下灌流剛宰殺後之大鼠肝臟之組織的染色圖。

第 6 圖為本發明之一實施態樣，係展示肝臟之洗淨的概略圖。

第 7 圖為本發明之一實施態樣，係展示使用添加紅血球之灌流液或未添加紅血球之灌流液灌流溫缺血模型大鼠之肝臟 48 小時之情況，灌流液中 ALT 活性上升的比較圖表。

第 8 圖展示在藉由第 7 圖中之灌流回路開始灌流以前，洗淨肝臟時灌流液中之 ALT 活性的比較圖表。

第 9 圖為本發明之一實施態樣，係展示以添加紅血球之灌流液灌流溫缺血模型大鼠之肝臟 48 小時後之組織的染色圖。

第 10 圖為本發明之一實施態樣，以係展示未添加紅血球之灌流液灌流溫缺血模型大鼠之肝臟 48 小時後之組織的染色圖。

第 11 圖為本發明之一實施態樣，係展示使用添加紅血球之灌流液或未添加紅血球之灌流液灌流溫缺血模型大鼠之肝臟 48 小時時，灌流液中之白蛋白量的比較圖。

第 12 圖為本發明之一實施態樣，係展示使用添加紅血球之灌流液或未添加紅血球之灌流液灌流溫缺血模型大鼠之肝臟 48 小時時，灌流液中之白蛋白量的比較圖。

第 13 圖為本發明之一實施態樣，係展示使用添加紅血球之灌流液或未添加紅血球之灌流液灌流 48 小時之溫缺血模型大鼠的

肝臟、以及剛宰殺後之大鼠的肝臟進行氮負荷試驗時之尿素合成能力之測量結果圖表。

第 14 圖為本發明之一實施態樣，係展示將使用添加紅血球之灌流液或未添加紅血球之灌流液灌流 48 小時之溫缺血模型大鼠、及剛宰殺後之大鼠的肝臟內血管網以含螢光色素之明膠固化時的組織影像。

第 15 圖展示使用溫缺血模型大鼠之肝臟，對接受者大鼠進行異位移植時的模式圖。

第 16 圖展示在將溫缺血模型大鼠之肝臟以各種方法灌流或保存後，進行異位移植時接受者大鼠之生存率圖表。

第 17 圖展示在將溫缺血模型大鼠之肝臟以各種方法灌流或保存後，進行異位移植時移植後之肝臟的組織影像。

第 18 圖展示將溫缺血模型大鼠之肝臟異位移植至接受者大鼠後，將宿主肝臟部分切除，並將與宿主肝臟連繫之肝門靜脈結紮時的模式圖。

第 19 圖展示將溫缺血模型大鼠之肝臟異位移植後，將宿主肝臟部分切除，並將與宿主肝臟連繫之肝門靜脈結紮時，接受者大鼠之生存率圖表。

第 20 圖展示將溫缺血模型大鼠之肝臟異位移植後，將宿主肝臟部分切除，並將與宿主肝臟連繫之肝門靜脈結紮時，測量宿主肝臟及移植肝臟之重量變化圖表。

第 21 圖展示將宿主肝臟部分切除，並將與宿主肝臟連繫之肝門靜脈結紮後，經過 1 週後之宿主肝臟及移植肝臟的組織影像。

第 22 圖展示將宿主肝臟部分切除，並與宿主肝臟連繫之肝門

靜脈結紮後，經過 1 週後之宿主肝臟及移植肝臟之免疫染色影像(白蛋白、BrdU)，及表示在一定視野範圍內肝細胞(hepatocyte)數或 BrdU 陽性肝細胞(BrdU positive hepatocyte)數的圖表。

### 【實施方式】

[用於實施發明之態樣]

#### 【0015】<臟器或組織之長期維持方法>

本發明之第一態樣係使用灌流液進行灌流，而長期維持用於移植之哺乳類之臟器或組織的方法，其特徵為包含以下各步驟：  
(a)使前述「臟器或組織」與用於使前述灌流液流入之灌流液流入用插管連接的步驟；(b)從前述「臟器或組織」連接用於使前述灌流液流出之灌流液流出用插管的步驟；(c)將包含紅血球及血液凝固阻礙劑之灌流液灌流於前述臟器或組織內的步驟。

【0016】在本發明中，臟器或組織之「長期維持」意指原樣維持用於移植之臟器或組織的功能，亦即原樣維持於可移植之狀態並長期維持，其方法無特別限定。例如，藉由使用含紅血球及血液凝固阻礙劑之灌流液灌流用於移植之臟器或組織，可長期維持於顯著地抑制臟器摘出後之臟器或組織損害之狀態。

【0017】再者，本發明之使用灌流液進行灌流而維持用於移植之哺乳類之臟器或組織的方法亦係藉由維持臟器或組織之代謝而使臟器或組織之功能回復者，故亦可被理解成：使用灌流液作為培養液之臟器或組織的培養。

【0018】在本發明中，臟器或組織之「移植」，意指將臟器或組織從臟器或組織之捐贈者移植至接受者，移植之種類無特別限定。移植之種類，例如依照捐贈者與接受者之關係分類，可列舉

自體移植、同系移植、同種移植、異種移植等。又，例如依照捐贈者之狀態分類，可列舉活體移植、腦死移植、心跳停止移植等。

【0019】在本發明中，「臟器或組織」只要為可用於灌流之臟器或組織即可，無特別限定，可列舉如：心臟、肝臟、腎臟、肺、胰臟、胃、小腸、大腸、睪丸、卵巢、眼球、牙齒及其周圍組織、毛髮及其周圍組織等。

【0020】在本發明中，「臟器或組織」，在捐贈者為非人類時，可為將用於移植之臟器或組織連接灌流液流入用插管及灌流液流出用插管，於開始灌流後摘出臟器或組織而得的臟器或組織；在捐贈者為人類之情況中，可為摘出用於移植之臟器或組織後，連接灌流液流入用插管及灌流液流出用插管，然後開始灌流的臟器或組織。

【0021】在本發明中，「灌流液」意指本技術領域人士依照作為對象之哺乳類的種類或臟器或組織的種類，可適宜選擇公知之組成或以其為基準之組成。例如，可含細胞之生存所必要的糖類或胺基酸等營養素，可使用一般細胞培養所用的培養液、或臟器保存所用的保存液等，關於其之組成，無特別限定。又，灌流液中亦可含有例如糖質(葡萄糖、海藻糖、棉子糖)、增黏劑(HES、聚葡萄糖(dextran))、抗氧化劑(N-乙醯基半胱胺酸、異嘌呤醇(allopurinol)、麩胺基硫(glutathione))、血管擴張劑(硝基甘油)、細胞激素·成長因子(IGF、FGF、EGF、HGF)。

【0022】在本發明中，臟器或組織之「灌流」意指將用於移植之臟器或組織之血管與灌流液流入及流出用之插管等管子連結，使灌流液與血流同樣地在臟器或組織內流入及流出。灌流之

臟器為肝臟時，例如，可使灌流液從肝門靜脈流入，從肝上部之下大靜脈(inferior vena cava)流出，亦可使用使灌流液從肝動脈流入之途徑。即使為使用肝臟以外之臟器時，本技術領域人士可選擇灌流液流入及流出用的適當血管而用於灌流。

【0023】在本發明中，「哺乳類」無特別限定，本發明之維持方法係可利用於所有哺乳動物的臟器或組織。在以本發明之方法維持用於移植之臟器或組織時，哺乳類，可依照待移植臟器或組織之對象(接受者)而適宜選擇，可列舉如：人類、豬、牛、猴、狒狒、犬、貓、大鼠、小鼠等。在捐贈者為人類時，臟器或組織主要可用腦死捐贈者之臟器或組織，然而不以此為限，亦可使用心跳停止捐贈者之臟器或組織。再者，在使用藉由基因重組技術等在非人類哺乳類之活體內培養用於移植至人類之臟器或組織時等，亦可使用本發明之長期維持方法。

【0024】在本發明中，「插管」只要為用於插入血管之管子等即可，無特別限定，可依照臟器或組織之種類或大小、灌流液之組成等而適宜選擇。

【0025】在本發明之第一態樣中，以在作為捐贈者之哺乳類心跳停止前投予血液凝固阻礙劑為較佳。藉由在哺乳類心跳停止前投予血液凝固阻礙劑，可於心跳停止後抑制在臟器或組織之血管內之血液凝固，並可預防灌流開始後在臟器或組織內發生之循環衰竭。不過，若心跳停止前未投予血液凝固阻礙劑，亦可藉由灌流液中所含之血液凝固阻礙劑得到充分預防循環衰竭之效果。

【0026】在本發明中，「血液凝固阻礙劑」只要是作用於血液凝固系統而具有阻礙凝固之作用的物質即可，無特別限定，可列

舉如：肝素、華法林(warfarin)、醋硝香豆素(acenocoumarol)、苯茛二酮(phenindione)等。在心跳停止前投予血液凝固阻礙劑時，投予方法無特別限定，例如，若血液凝固阻礙劑為肝素，則可投予至靜脈內，若血液凝固阻礙劑為華法林、醋硝香豆素、苯茛二酮等，則可經口投予。又，亦可併用血液凝固阻礙劑之靜脈內投予及經口投予。例如，在心跳停止前進行靜脈內投予肝素的情況，以投予 20 至 4000 單位為較佳，以投予 40 至 2500 單位為更佳。

【0027】又，用於臟器或組織之灌流的灌流液中所含之血液凝固阻礙劑的量，本技術領域人士可依照哺乳類或臟器之種類而適宜選擇。例如，在灌流液中所含之血液凝固劑為肝素之情況中，灌流液中所含之肝素的量，以每 1L 灌流液含 2500 至 80000 單位為較佳，以每 1L 灌流液含 40000 至 60000 單位為更佳。

【0028】在本發明中，在灌流液中添加氧運輸體之方法無特別限定，可在調製灌流液之後添加，亦可在與調製灌流液之同時添加。又，在一實施態樣中，藉由將灌流液中之溶氧濃度保持一定，可長期原樣維持所添加之氧運輸體的功能而進行灌流。用於將灌流液中之溶氧保持一定的方法無特別限定，可使用例如簡易型動物細胞培養裝置(ABLE，日本東京)，將灌流液中之溶氧濃度維持於 6.5 至 7.5mg/L。

【0029】在本發明中，「氧運輸體」只要是具有藉由與氧結合運輸氧之功能者即可，無特別限定。例如，可使用紅血球、全氟化碳、血紅素小胞體、人造紅血球等。

【0030】再者，在本發明中，在使用「紅血球」作為「氧運輸體」的情況，「紅血球」只要是可添加於灌流液者即可，無特別

限定，可使用來自各種哺乳類的紅血球。例如，就取得紅血球之動物而言，可列舉人類、豬、牛、猴、狒狒、犬、貓、大鼠、小鼠等。待移植臟器或組織之接受者為人類時，從抑制移植所引起之排斥反應的觀點而言，紅血球以使用從接受者本身取得者為較佳。又，在未使用從接受者本身取得之紅血球時，從抑制移植所引起之排斥反應的觀點而言，以使用與接受者相同血型的紅血球為較佳。又，紅血球之調製方法亦無特別限定，例如可藉由將從哺乳類取得之血液以培養液稀釋、離心後，將血漿成分洗淨而調製。

【0031】在本發明中，灌流液中之氧運輸體的濃度係本技術領域人士可依照作為對象之臟器或組織、所使用之氧運輸體之種類而適宜設定。例如，在使用「紅血球」作為氧運輸體的情況中，灌流液中之紅血球濃度係以每 1L 灌流液含  $0.5 \times 10^{11}$  個細胞至  $50.0 \times 10^{11}$  個細胞為較佳，以每 1L 灌流液含  $1.0 \times 10^{11}$  個細胞至  $50.0 \times 10^{11}$  個細胞為更佳，以每 1L 灌流液含  $2.0 \times 10^{11}$  個細胞至  $50.0 \times 10^{11}$  個細胞為最佳。若灌流液中之紅血球濃度，未達每 1L 灌流液含  $0.5 \times 10^{11}$  個細胞，則臟器之氧供給量不足，將引起臟器內之細胞壞死；若超過每 1L 灌流液含  $50.0 \times 10^{11}$  個細胞，則灌流時將引起紅血球之梗塞而造成臟器損害。

【0032】在本發明中，臟器或組織之灌流，可在將臟器或組織之溫度維持於  $4^{\circ}\text{C}$  至  $37^{\circ}\text{C}$  之狀態下進行，以在將臟器或組織之溫度維持於  $15^{\circ}\text{C}$  至  $33^{\circ}\text{C}$  之狀態下進行為較佳，以在維持於  $20^{\circ}\text{C}$  至  $25^{\circ}\text{C}$  之狀態下進行為最佳。臟器或組織之灌流，若臟器或組織之溫度未達  $4^{\circ}\text{C}$ ，則將因低溫損害而發生臟器功能衰竭，若超越

37°C，將見到肝損害值上升。

【0033】在本發明中，將灌流期間之臟器或組織維持於一定溫度之方法無特別限定，例如，藉由使臟器或組織漂浮之液體的溫度維持於所欲之溫度下進行灌流，可將臟器或組織維持於一定之溫度。較佳為藉由將灌流至臟器或組織之灌流液的溫度維持於室溫(25°C)至 37°C，並將使臟器或組織漂浮之液體的溫度維持於 20°C 至 25°C，可使臟器或組織之溫度維持於所欲之溫度。

【0034】用於將灌流期間之臟器或組織維持於一定溫度的裝置無特別限定，例如，可使用加熱器等，從外部對放入臟器或組織之容器賦予溫度變化，亦可使用管理灌流液本身溫度用之裝置等，直接對灌流液賦予溫度變化。

【0035】在本發明中，「使灌流液循環」意指不廢棄從連接於臟器或組織之灌流液流出用插管流出的灌流液，而係使其通過灌流液流入用插管，再度流入臟器或組織，並重覆此操作。

【0036】在本發明中，使灌流液灌流至臟器或組織，將臟器或組織「洗淨」，意指使灌流液流入/流出臟器或組織之血管，並使流出之灌流液不循環而予以排除。藉由使用灌流液將臟器或組織洗淨，可除去因心跳停止而造成血流停止之臟器或組織中所累積的活性氧、細胞本身的溶解物、微小血栓等，而減輕因此引起之臟器或組織的損害。

【0037】在本發明之維持方法中，可使用與身體內連接於臟器或組織之第二臟器或組織而一起摘出的臟器或組織。若藉由此種構成，則在進行灌流時，由於可將該第二臟器或組織固定，而將灌流之臟器或組織垂吊，因而不會對灌流之臟器或組織造成損

傷，並可使灌流液運行到臟器或組織之各個角落。

【0038】第二臟器或組織以在身體內與臟器或組織連接的臟器或組織為較佳，以在身體內與臟器或組織之上部連接的臟器或組織為更佳。若使用該臟器或組織並使其垂吊，將能在與活體內構成類似的環境中將臟器或組織灌流。其中，與活體內之構成類似的環境，意指臟器或組織不受容器之內面等硬質材料壓迫，可維持自然形狀的環境。先前之臟器或組織的灌流，由於係將臟器或組織裝載培養皿等容器中而進行，接觸培養皿之部分血管受到壓迫，灌流液無法充分運行。若依照上述之態樣，將臟器或組織垂吊，由於係在與活體內之構成類似的環境灌流，可使灌流液運行到臟器或組織全體。

【0039】又，將第二臟器或組織固定時，由於即使第二臟器或組織受到損傷也不要緊，所以可藉由插入支持管、用夾具挾持、以縫合線縫合等方法緊緊地固定。例如，灌流之臟器為肝臟時，在活體內之上部連接橫隔膜，該橫隔膜連接肋骨。因此，可只使用橫隔膜，或使用橫隔膜及肋骨作為第二臟器或組織。從哺乳動物摘出肝臟時，若將橫隔膜一起摘出，則藉由固定該橫隔膜，可將肝臟在與活體內近似之環境中垂吊。若除了橫隔膜以外而將肋骨亦一起摘出，由於可將肋骨固定，更可安定地垂吊。

【0040】就第二臟器或組織之其他例子而言，在灌流腎臟或胰臟的情況，可列舉附著於此等臟器之表面的脂肪組織；在灌流消化器系統之臟器的情況，可列舉鄰接於上游之臟器(具體而言，灌流小腸之情況的胃或十二指腸，或培養大腸之情況的小腸)；在灌流牙齒及其周圍組織的情況，可列舉顎骨、齒槽骨、齒根骨、

齒肉；在灌流毛髮及其周圍組織的情況，可列舉表皮、真皮、脂肪組織等，然而不以此等為限。

【0041】本發明之維持方法，以在其灌流步驟中，使臟器或組織以其至少一部分承受浮力之方式浸漬於液體而進行為較佳。如此進行，則臟器或組織之至少一部受到浮力，與僅是垂吊之情況相比，可形成與身體內之構成更為近似的環境，而可使灌流液運行到臟器或組織的各個角落。臟器或組織以至少其之 30% 存在於液體中之狀態為較佳；更佳 50%，進一步更佳 80%，最佳係全體存在於液體中之狀態。

【0042】臟器或組織之浸漬用液體，與灌流液同樣地，係本技術領域人士可依照哺乳類及臟器等之種類來適宜選擇，其可為與灌流液相同之組成，亦可為相異之組成。

【0043】在根據本發明之維持方法中，以將臟器或組織固定於臟器固定用灌流容器中之狀態進行灌流為較佳。固定於臟器固定用灌流容器中之臟器或組織，可使用與在活體內連接於用於移植之臟器或組織之第二臟器或組織一起摘出的臟器或組織。在臟器固定用灌流容器中可設置有懸垂機構，係可藉由前述第二臟器或組織而將用於移植之臟器垂吊。臟器固定用灌流容器內可充滿液體，而成為使臟器或組織以受到浮力之方式可至少一部分浸漬於液體的構成。臟器固定用灌流容器可為任何材料，亦可使用例如玻璃或壓克力製作。在臟器固定用灌流容器中，藉由前述第二臟器或組織將用於移植之臟器或組織垂吊而固定，並在使用於移植之臟器或組織以浸漬於液體之狀態進行灌流，將不會使灌流之臟器或組織受到損傷，且可使灌流液運行到臟器或組織之各個角

落。

【0044】亦即，在一實施態樣中，本發明亦可為一種臟器或組織之維持裝置，其具備包含氧運輸體及血液凝固阻礙劑之灌流液、用於使灌流液流入前述臟器或組織的灌流液流入用插管，及用於使灌流液從前述臟器或組織流出的灌流液流出用插管。

【0045】又，在一實施態樣中，前述維持裝置亦可具備將前述臟器或組織垂吊之懸垂機構。再者，前述維持裝置亦可進一步具備一容器，該容器可在將前述臟器或組織以垂吊之狀態，使前述臟器或組織之至少一部分浸漬於臟器或組織浸漬用液體。

【0046】在本發明中，臟器或組織之損傷程度的測量方法無特別限定，本技術領域人士可依照為對象之臟器或組織而適宜選擇。例如，在成為對象之臟器或組織係肝臟之情況中，藉由肝損害酵素(ALT)活性、組織學分析、膽汁產生量之測量、白蛋白合成量之測量、藉由氨負荷試驗進行之尿素合成之測量、肝臟內毛細血管網之分析等，可測量肝臟之損傷程度。

#### 【0047】<臟器或組織之摘出方法>

本發明之第二態樣係為了長期維持用於移植之哺乳類之臟器或組織而採行的臟器或組織之摘出方法，其特徵為包含以下之步驟：(f)將前述「臟器或組織」從前述哺乳類摘出的步驟，及(g)在前述步驟(f)之前，將血液凝固阻礙劑投予至前述哺乳類的步驟，前述哺乳類為非人類或人類(但是，人類中限於腦死患者)。在本發明之第一態樣中所使用之術語，由於在第二態樣中亦以同義使用，所以省略其之說明。

【0048】在本發明之第二態樣中，藉由在捐贈者心跳停止前

投予血液凝固阻礙劑，可抑制於心跳停止後血液在臟器或組織之血管內凝固，並可預防灌流開始後在臟器或組織中所引起的循環衰竭。

【0049】在本發明之第二態樣中，血液凝固阻礙劑之投予方法無特別限定，例如，若血液凝固阻礙劑為肝素，則可經由靜脈內投予，若血液凝固阻礙劑為華法林、醋硝香豆素、苯茛二酮等，則可經口投予。又，亦可將血液凝固阻礙劑之靜脈內投予及經口投予併用。關於血液凝固阻礙劑之投予量亦無特別限定，本技術領域人士可依照投予血液凝固阻礙劑之哺乳類的種類、週齡、體重等而適宜調製。

【0050】在本發明中，將用於移植之臟器或組織從捐贈者摘出之時點無特別限定。例如，在捐贈者為非人類之情況中，可將用於移植之臟器或組織與灌流液流入用插管及灌流液流出用插管連接，開始灌流後，將臟器或組織摘出；在捐贈者為人類之情況中，可於摘出用於移植之臟器或組織後，將其與灌流液流入用插管及灌流液流出用插管連接，然後開始灌流。

【0051】<用於移植之哺乳類的臟器或組織>

本發明之第三態樣係用於移植之哺乳類之臟器或組織，其特徵為前述「臟器或組織」係從哺乳類摘出者，且前述「臟器或組織」中之血液已用包含氧運輸體及血液凝固阻礙劑之灌流液置換。本發明之第一態樣中所使用之術語，由於在第三態樣中亦以同義使用，因此省略說明。

【0052】在本發明之第三態樣中，將臟器或組織中之血液用包含氧運輸體及血液凝固阻礙劑之灌流液置換的方法無特別限

定，例如，可藉由使灌流液灌流於臟器或組織內而置換。

【0053】再者，本說明書中所用之術語係用於說明特定之實施態樣，無意限定本發明。

【0054】又，在本說明書中所使用之「包含」的術語意圖排除文義上明顯有不同理解的情況，其認定所記述之事項(構件、步驟、要素、數字等)為存在者，不過不排除記述以外之事項(構件、步驟、要素、數字等)之存在。

【0055】只要無不同的定義，此處所用之所有術語(包含技術術語及科學術語)具有與本發明所屬之技術領域人士所廣泛理解者相同之意義。此處所用之術語，只要未明示不同的定義，皆可被解釋成具有與本說明書及相關技術領域之意義整合的意義，而不應以理想化或過度形式化之意義來解釋。

【0056】第一、第二等術語雖有時係為了表現多種要素而使用，不過此等要素應被理解成不受此等術語所限定。此等術語只為將一個要素與其他要素區別而使用，例如，將第一要素記為第二要素，同樣地將第二要素記為第一要素，在不超脫本發明之範圍內均可行。

【0057】以下，藉由實施例更具體地說明本發明，然而，本發明可藉由各種態樣而具體化，不能解釋成只限於此處所記載之實施例。

實施例

【0058】(1)灌流液之調製

<紅血球之調製>

在本實施例中，展示使用紅血球作為氧運輸體的試驗例，以

作為本發明之一實施態樣。人類紅血球濃液係從日本紅十字血液中心，以不能使用於輸血等之血液讓渡申請書為依據，接受分贈。在 50ml 前述人類紅血球濃液中添加 200ml 之 L-15 培養基 (SIGMA)，並以 2000rpm 進行 5 分鐘之離心操作。離心後，將沉澱之紅血球成分以外的上清液除去，添加 L-15 培養基 (SIGMA)，使全量成為 250ml。藉由重複此操作 2 次，調製成用於臟器或組織之灌流的人類紅血球。

#### 【0059】<灌流液之調製>

灌流所用之灌流液，係在 L-15 培養基 (SIGMA) 中添加 10% 胎牛血清 (FBS) (Gibco，美國紐約)、100U/ml 青黴素、100  $\mu$ g/ml 鏈黴素 (streptomycin)、0.25  $\mu$ g/ml 兩性黴素 (amphotericin) B (Nacalai Tesque，日本京都)、50  $\mu$ g/ml 建它黴素 (gentamicin) 硫酸鹽 (Wako，日本大阪)、2mM 之 L-丙胺醯基·L-醯胺酸、50 單位/ml 之肝素 (Wako，日本大阪) 及 3  $\mu$ g/ml 之環孢素 (cyclosporine) A 而調製。

【0060】以上述方式所調製之灌流液在本實施例中稱為「未添加紅血球之灌流液」。又，在未添加紅血球之灌流液中，以濃度成為  $5.0 \times 10^{11}$  cells/L 添加人類紅血球而成的灌流液在本實施例中稱為「添加紅血球之灌流液」。

#### 【0061】(2) 溫缺血模型大鼠之製作

將 8 週齡 Wistar 大鼠 (日本 SLC) 放入充滿乙醚 (Wako) 之乾燥器中，進行吸氣麻醉。使用 25G 注射針 (Terumo，Tokyo，Japan) 及 1ml 注射器 (Terumo)，將調製成終濃度為 25000U/ml 之 100  $\mu$ l 之肝素鈉 (Wako) 溶液注射入已施行吸氣麻醉之大鼠之陰莖靜脈中。將已施行注射之大鼠靜置 5 分鐘，使肝素鈉溶液運行至全身後，藉

由頸椎脫臼宰殺。在本實施例中，將藉由頸椎脫臼宰殺的時點，當作心跳停止的開始時點。將宰殺之大鼠使用細胞培養用培育器(SANYO, Tokyo, Japan)，於室溫(25°C)至 37°C 靜置 1 小時。將培育後之大鼠當作本實施例中之溫缺血模型大鼠。

【0062】再者，大鼠之管理及操作係依照美國國家衛生研究所之實驗動物指南進行。又，所有實驗係經東京理科學大學實驗動物管理委員會之許可後實施。

### 【0063】(3)灌流回路之構築

將本實施例中所使用之灌流回路 1 的概略圖展示於第 1 圖中。在第 1 圖中，將加入第一容器 30 及第二容器 31 之灌流液，藉由簡易型動物細胞培養裝置 20(ABLE, Tokyo, Japan)，將灌流液之溫度及灌流液中之溶氧量維持恆定。使用蠕動泵(peristaltic pump)40(IWAKI/AGC TECHNO GLASS, 日本千葉)，使加入第一容器 30 中之灌流液流入/流出放在臟器固定用灌流容器 10 中成為灌流對象之臟器或組織。使流出之灌流液回收於第二容器 31 中。再度使用蠕動泵 41，使回收於第二容器 31 之灌流液回到第一容器 30 中。為了連續地採集從臟器或組織流出之灌流液，在連結臟器或組織與第二容器 31 之管子的一部分中設置灌流液回收端口 50。將以上之回路當作本實施例中所使用的灌流回路。

### 【0064】(4)灌流液中之最適當紅血球濃度之研究

將 8 週齡 Wistar 大鼠(日本 SLC)放入充滿乙醚(Wako)之乾燥器中，進行吸氣麻醉。使用 25G 注射針(Terumo, 日本東京)及 1ml 注射器(Terumo)，將調製成終濃度為 25000U/ml 的肝素鈉(Wako)溶液 100  $\mu$ l 注射入前述大鼠的下腔大靜脈。將已施行注射之大鼠

靜置 5 分鐘，使肝素鈉溶液運行於全身後，藉由頸椎脫臼宰殺。剛宰殺後立即將肝臟以後述(6)記載之方法摘出，連接灌流回路進行灌流。亦即，在本條件之研究中，並非使用溫缺血模型大鼠之肝臟，而係使用剛宰殺後之大鼠的肝臟。

【0065】在灌流液方面，準備以(1)之方法所調製之未添加紅血球之灌流液、在未添加紅血球之灌流液中分別以使濃度成爲  $0.5 \times 10^{11}$  個細胞/L、 $2.0 \times 10^{11}$  個細胞/L、 $5.0 \times 10^{11}$  個細胞/L 之方式添加用(1)之方法所調製之人類紅血球的灌流液，並使用此等灌流液。灌流期間，使用簡易型動物細胞培養裝置將灌流液之溫度維持於  $37^{\circ}\text{C}$ ，又，將灌流液中之全部溶氧維持於  $6.77\text{mg/L}$ 。灌流時，藉由將臟器固定用灌流容器內部之 L-15 培養基維持於  $22^{\circ}\text{C}$ ，使肝臟之溫度維持於  $22^{\circ}\text{C}$ 。灌流期間，使用蠕動泵分別將各灌流液之流速調爲  $11\text{ml/分鐘}$ 。在灌流回路中之灌流期間，每 4 小時從灌流液回收端口取樣從肝臟流出之灌流液。將從灌流液回收端口所取樣之灌流液，以  $1800\text{rpm}$  離心 3 分鐘，回收上清液。上清液中之 ALT 活性係使用 Wako 轉胺酶 CII 試驗套組(Transaminase CII Test Wako(Wako))，依照所附加之使用說明書來測量。

【0066】又，灌流後開始 48 小時後之肝臟，立即藉由 4% 多聚甲醛(paraformaldehyde)-磷酸緩衝液灌流 15 分鐘，進行固定。將已藉由灌流進行固定之肝臟切分爲組織片後，浸漬於 4% 多聚甲醛-磷酸緩衝液中 24 小時，進一步進行固定。將已藉由浸漬進行固定之前述組織片以乙醇溶液脫水，並以二甲苯使其透明後，以石蠟置換、包埋。將已包埋之試料薄切成厚度  $5\mu\text{m}$ ，依照一般方法實施 HE 染色。染色之試料係藉由設置有 AxioCamMRc5 (Carl

Zeiss, Jene, Germany)之 Axio Imager A1(Carl Zeiss)進行鏡檢，並使用 Axio Vision Rel.4.7.(Carl.Zeiss)取得圖像。

【0067】將在各個紅血球濃度條件下所得到之 ALT 活性的比較顯示於第 2 圖中。如第 2 圖所示，令人驚奇地發現人類紅血球濃度依存性地抑制 ALT 活性的上升，並可知本實施例中，在使用以使濃度成爲  $5.0 \times 10^{11}$  個細胞/L 之方式添加人類紅血球的灌流液進行灌流之組中，最能抑制 ALT 活性之上升。

【0068】又，將在各個紅血球濃度條件下進行灌流後之肝臟的組織影像顯示於第 3 圖中。如第 3 圖所示，在使用以使濃度成爲  $0.5 \times 10^{11}$  個細胞/L 之方式添加人類紅血球的灌流液進行灌流之群中，可見一部分肝竇(sinusoid)擴張及廣泛性之肝實質細胞(hepatic parenchymal cells)消滅，在使用以使濃度成爲  $2.0 \times 10^{11}$  個細胞/L 之方式添加人類紅血球的灌流液進行灌流之組中，可見輕微肝竇擴張及部分之肝實質細胞消滅，在使用以使濃度成爲  $5.0 \times 10^{11}$  個細胞/L 之方式添加人類紅血球的灌流液進行灌流之組中，可見到保持與剛宰殺後之肝臟約略同等之肝竇構造，及肝實質細胞的生存。亦即，可見到紅血球濃度依存性地抑制肝臟組織損害，在本實施例中，可知在使用以使濃度成爲  $5.0 \times 10^{11}$  個細胞/L 之方式添加人類紅血球的灌流液進行灌流之組中，最能抑制組織損害。

【0069】亦即，可知藉由使用以使濃度成爲  $5.0 \times 10^{11}$  個細胞/L 之方式添加人類紅血球的灌流液灌流用於移植之臟器或組織，最能顯著地抑制摘出後之臟器或組織的損害，藉此可原樣維持臟器或組織之功能而長期保存。

【0070】(5)灌流時之最適當溫度條件的研究

將 8 週齡 Wistar 大鼠(日本 SLC)放入充滿乙醚(Wako)之乾燥器中，進行吸氣麻醉。使用 25G 注射針(Terumo, Tokyo, Japan)及 1ml 注射器(Terumo)，將調製成終濃度 25000U/ml 之 100  $\mu$ l 之肝素鈉(Wako)溶液注射入前述大鼠之下腔大靜脈。將已注射之大鼠靜置 5 分鐘，使肝素鈉溶液運行全身後，藉由頸椎脫臼宰殺。屠殺後立即將肝臟以後述(6)記載之方法摘出，連接灌流回路，進行灌流。亦即，本條件之研究中，不使用溫缺血模型大鼠之肝臟，而使用剛宰殺後之大鼠的肝臟。

【0071】灌流液係使用以(1)記載之方法所調製的添加紅血球之灌流液。灌流期間，使用簡易型動物細胞培養裝置將灌流液之溫度維持於 37°C，又，將灌流液中之全部溶氧維持於 6.77mg/L。灌流期間，藉由將臟器固定用灌流容器內部之 L-15 培養基維持於 37°C、33°C、或 22°C，而將肝臟溫度分別維持於上述各溫度。灌流期間，使用蠕動泵，將添加紅血球之灌流液之流速調為 11ml/分鐘。在灌流回路中之灌流期間，每 4 小時從灌流液回收端口取樣從肝臟流出之添加紅血球之灌流液。將從灌流液回收端口所取樣之灌流液，以 1800rpm 進行離心 3 分鐘，回收上清液。灌流液上清液中之 ALT 活性，係使用 Wako 轉胺酶 CII 試驗套組(Wako)，依照所附加之使用說明書測量。

【0072】於 37°C 灌流之肝臟從灌流開始 20 小時後，於 33°C 灌流之肝臟從灌流開始 32 小時後，於 22°C 灌流之肝臟從灌流開始 48 小時後，分別進行固定。固定係藉由使用 4%多聚甲醛-磷酸緩衝液灌流肝臟 15 分鐘而進行。將已藉由灌流進行固定之肝臟切成組織片後，浸漬在 4%多聚甲醛-磷酸緩衝液中 24 小時，進一

步進行固定。將已藉由浸漬進行固定之前述組織片用乙醇溶液脫水，用二甲苯使其透明後，以石蠟置換、包埋。將包埋之試料薄切成厚度  $5\ \mu\text{m}$ ，依照一般方法實施 HE 染色。染色之試料係藉由設置有 AxioCamMRc5 (Carl Zeiss, Jene, Germany) 之 Axio Imager A1 (Carl Zeiss) 進行鏡檢，並使用 Axio Vision Rel.4.7 (Carl Zeiss) 取得圖像。

【0073】將於各個溫度條件下所得到之 ALT 活性的比較展示於第 4 圖中。如第 4 圖所示，令人驚奇地發現在將肝臟維持於  $22^\circ\text{C}$  下進行灌流之組，最能抑制 ALT 活性之上升。

【0074】又，在各個溫度條件下進行灌流後之肝臟的組織影像展示於第 5 圖中。如第 5 圖所示，於  $37^\circ\text{C}$  進行灌流時，在從灌流開始算起經過 20 小時之時點，可見到肝實質細胞的壞死或肝竇構造的崩壞。又，於  $33^\circ\text{C}$  進行灌流之情況，雖可見到較長期之組織構造的維持效果，然而在從灌流開始算起經過 32 小時之時點，可見肝實質細胞的壞死及肝竇構造的崩壞。然而，於  $22^\circ\text{C}$  進行灌流之情況，即使在從灌流開始算起經過 48 小時之時點，亦可見與剛宰殺後之肝臟約略同等之肝竇構造，且可知肝臟內之血管網構造亦高度保存。

【0075】亦即，可知藉由將用於移植之臟器或組織維持於  $22^\circ\text{C}$  下進行灌流，最能顯著地抑制臟器或組織之損害，藉此，可原樣維持臟器或組織之功能而長期保存。

【0076】(6) 使用添加紅血球之灌流液的肝臟之灌流  
<溫缺血模型大鼠之肝臟的洗淨及肝臟的摘出>

實驗中係使用依照(2)記載之方法所製成的溫缺血模型大

鼠。切開溫缺血模型大鼠的腹部，將肝下部下大靜脈剝離至左腎靜脈分岐處為止，將右腎靜脈、左腎靜脈、腰靜脈分別使用絲製縫合線 7 號(Natume)結紮。從左腎靜脈分岐處，在尾側之肝下部下大靜脈以絲製縫合線 4 號(Natume)作成 1 個結紮用圈。將肝門靜脈從結締組織剝離，依固有肝動脈(proper hepatic artery)、幽門靜脈、脾靜脈之順序，以絲製縫合線 7 號 (Natume)進行結紮。將 2 條絲製縫合線 4 號(Natume)以適當間隔在肝門靜脈作成 2 個結紮用圈。藉由簡易型動物細胞培養裝置，將添加紅血球之灌流液之溫度維持於 37℃，將添加紅血球之灌流液中之溶氧維持於 6.77mg/L。使用蠕動泵，在灌流液流入用插管中使添加紅血球之灌流液以 11ml/分鐘之速度流動，將肝門靜脈切半，並插入前述灌流液流入用插管。繼而，立即將肝下部下大靜脈藉由結紮用圈於下部切斷，使添加紅血球之灌流液從切斷部流出。將 2 個肝門靜脈結紮用圈結紮，將灌流液流入用插管固定於肝門靜脈，將灌流液流入用插管之插入部分以適量之 Aron Alpha A(Daiichi Sankyo, Tokyo, Japan)固定。

【0077】切開肋骨，在肝上部下大靜脈以絲製縫合線 4 號(Natume)作成 2 處結紮用圈。將右心房切半後，將設置於肝下部下大靜脈之圈結紮。在切半之右心房部分插入灌流液流出用插管，將肝上部下大靜脈之 2 處結紮用圈結紮，固定灌流液流出用插管，將結紮部位、灌流液流出用插管之插入部位以 Aron Alpha A(Daiichi Sankyo)固定。將總膽管切半，插入膽汁流出用插管，並以 Aron Alpha A(Daiichi Sankyo)固定。露出橫隔膜，將左右之橫隔動・靜脈以絲製縫合線 7 號(Natume)結紮。切除肝臟周圍之器官、

結締組織後，在將肋骨及橫隔膜與肝臟原樣連結下，從背面將肝臟切離而摘出。

【0078】將摘出之肝臟運送至臟器固定用灌流容器中，藉由將肋骨固定於臟器固定用灌流容器所附屬之固定器具，將整個肝臟垂吊，在臟器固定用灌流容器內部填滿 L-15 培養基。使肝臟在藉由肋骨及橫隔膜垂吊之狀態下漂浮於 L-15 培養基中。藉由將臟器固定用灌流容器內部之 L-15 培養基維持於 22°C，使漂浮之肝臟的溫度維持於 22°C。

【0079】使添加紅血球之灌流液流入肝臟後 100 分鐘，進行肝臟之血管內洗淨。將本實施例中用於洗淨肝臟之裝置的概略圖展示於第 6 圖中。在第 6 圖中，將摘出之肝臟固定於臟器固定用灌流容器 11 中。使加入至第一容器 32 之添加紅血球之灌流液通過灌流液流入用插管而流入肝臟，並通過灌流用流出用插管而從肝上部下大靜脈流出。從肝上部下大靜脈流出之添加紅血球之灌流液不循環回第一容器 32 而取出，全部回收於第二容器 33 中。前述 100 分鐘之洗淨期間，係每 10 分鐘從設置在連接於灌流液流出用插管之管子之一部分上的灌流液回收端口 51 取樣從肝臟流出之添加紅血球之灌流液。

#### 【0080】<灌流回路中之灌流>

前述 100 分鐘之肝臟洗淨後，將肝臟連接至(3)所記載之灌流回路。藉由簡易型動物細胞培養裝置，將添加紅血球之灌流液之溫度維持於 37°C，將添加紅血球之灌流液中之溶氧維持於 6.77mg/L。灌流期間，藉由將臟器固定用灌流容器內部之 L-15 培養基維持於 22°C，使漂浮之肝臟的溫度維持於 22°C。使用蠕動泵

(IWAKI/AGC TECHNO GLASS, Chiba, Japan), 將前述添加紅血球之灌流液以 11ml/分鐘之速度流入連接於灌流回路之肝臟中。在灌流回路中之灌流期間, 每 4 小時從灌流液回收端口取樣從肝臟流出之添加紅血球之灌流液。

【0081】(7)使用未添加紅血球之灌流液之肝臟的灌流

使用未添加紅血球之灌流液, 進行與(6)同樣之步驟。

【0082】(8)肝臟之組織損害的分析

<肝損害酵素(ALT)活性的分析>

在(6)及(7)之實驗中, 於血管內洗淨期間及於灌流回路之灌流期間, 將從灌流液回收端口所取樣之灌流液以 1800rpm 離心 3 分鐘, 並回收上清液。灌流液上清液中之 ALT 活性, 係使用 Wako 轉胺酶 CII 試驗套組(Wako), 依照所附加之使用說明書測量。

【0083】關於至灌流開始後 48 小時為止之結果, 將使用添加紅血球之灌流液之組與使用未添加紅血球之灌流液之組所得到之結果的比較展示於第 7 圖中。將在第 7 圖中藉由灌流回路灌流開始前(0 分鐘以前)之肝臟洗淨期間, 灌流液中的 ALT 活性之測量圖表的放大圖展示於第 8 圖。如第 7 圖所示, 使用未添加紅血球之灌流液進行灌流時的 ALT 活性, 在藉由灌流回路灌流開始後 48 小時達到 57 單位/肝臟。另一方面, 使用添加紅血球之灌流液進行灌流時的 ALT 活性, 在藉由灌流回路灌流開始後 48 小時, 停留於 32 單位/肝臟。又, 如第 8 圖所示, 於 100 分鐘之血管內洗淨期間進行取樣, 關於從肝臟流出之灌流液的 ALT 活性, 使用未添加紅血球之灌流液之組達到 17 單位/肝臟, 相對於此, 使用添加紅血球之灌流液之組亦停留於 12 單位/肝臟。

【0084】從以上之結果可知，使用添加紅血球之灌流液進行灌流之組，與使用未添加紅血球之灌流液進行灌流之組相比，可明顯地見到肝臟之組織損害之抑制效果。

【0085】<組織學的分析>

在(6)及(7)之實驗中，將 48 小時灌流後之肝臟，立即藉由 4% 多聚甲醛-磷酸緩衝液灌流 15 分鐘，進行固定。將藉由灌流進行固定之肝臟分切為組織片後，浸漬於 4% 多聚甲醛-磷酸緩衝液中 24 小時，進一步進行固定。將藉由浸漬進行固定之前述組織片以乙醇溶液脫水，以二甲苯使其透明後，以石蠟置換、包埋。將包埋之試料薄切成厚度 5  $\mu$  m，依照一般方法實施 HE 染色。染色之試料係藉由設置有 AxioCamMRc5(Carl Zeiss，德國耶拿(Jene))之 Axio Imager A1(Carl Zeiss)進行鏡檢，並使用 Axio Vision Rel.4.7 (Carl Zeiss)取得圖像。

【0086】將使用添加紅血球之灌流液灌流之肝臟的 HE 染色展示於第 9 圖，將使用未添加紅血球之灌流液灌流之肝臟的 HE 染色圖展示於第 10 圖。第 9 圖及第 10 圖分別展示對於肝臟之 1 片切片，以 1 倍至 40 倍之倍率將 1 張圖像之不同部位放大的放大影像。

在第 9 圖及第 10 圖中，倍率 10 倍至倍率 40 倍之組織影像為倍率 1 倍之組織圖中框線所圍部分的放大圖。第 9 圖及第 10 圖之倍率 40 倍的組織影像分別展示肝門靜脈區域、肝實質細胞、中央靜脈之放大圖。如第 9 圖所示，使用添加紅血球之灌流液進行灌流時，在藉由灌流回路之灌流開始後 48 小時的肝臟之組織中，雖然可見某種程度之肝竇擴張，不過多可看見肝實質細胞之生存。

另一方面，如第 10 圖所示，使用未添加紅血球之灌流液進行灌流時，在藉由灌流回路之灌流開始後 48 小時的肝臟之組織中，於肝門靜脈區域周圍可見到正常的染色影像，可觀察到廣泛性之壞死影像及肝竇之部分擴張。

【0087】從以上之結果，可知使用添加紅血球之灌流液進行灌流時，與使用未添加紅血球之灌流液進行灌流時相比，可見肝臟之廣泛性壞死區域縮小及肝竇擴張之抑制效果。

#### 【0088】<白蛋白合成量之測量 1>

在(6)及(7)之實驗中，將從灌流液回收端口連續採集之灌流液以 1800rpm 離心 3 分鐘，回收上清液。灌流液上清液中之白蛋白濃度之測量，係使用 Levis 白蛋白-大鼠(shibayagi，日本群馬縣)，依照所附加之使用說明書藉由 ELISA 法來進行測量。

【0089】將在灌流回路中從開始灌流至 48 小時後為止之灌流液中白蛋白濃度之轉變展示於第 11 圖中。如第 11 圖所示，將使用添加紅血球之灌流液進行灌流時，與使用未添加紅血球之灌流液進行灌流時相比，顯示肝臟之白蛋白合成能力顯著且高度地維持。

#### 【0090】<白蛋白合成量之測量 2>

在(6)及(7)之實驗中，將從灌流液回收端口連續採集之灌流液以 1800rpm 離心 3 分鐘，回收上清液。灌流液上清液中白蛋白濃度之測量，係使用大鼠白蛋白定量套組(Bethyl，Montgomery，USA)，藉由 ELISA 法進行測量。在 96 孔多孔培養盤中將 1 次抗體，即經親和層析純化之綿羊抗-大鼠白蛋白抗體(1：200)固定，以 1%BSA 進行阻斷(blocking)後，添加樣本。使用與 HRP 結合之

綿羊抗大鼠白蛋白抗體(1:30000)作為 2 次抗體進行抗體反應後，藉由 TMB(Bethyl)進行顯色，並藉由使用 VersaMax (Molecular Devices)檢測吸光度，定量地測量白蛋白之濃度。

【0091】將從灌流回路中之灌流開始 48 小時後為止灌流液中之白蛋白濃度的轉變展示於第 12 圖中。如第 12 圖所示，相對於使用添加紅血球之灌流液進行灌流時，在 48 小時之灌流期間所合成之白蛋白量達到  $10.3 \pm 1.3 \mu\text{g/mL}$ ，在使用未添加紅血球之灌流液進行灌流時，48 小時之灌流期間所合成之白蛋白量停留於  $3.5 \pm 1.0 \mu\text{g/mL}$ 。亦即，在使用添加紅血球之灌流液進行灌流時，與使用未添加紅血球之灌流液進行灌流時相比，顯示肝臟之白蛋白合成能力顯著且高度地維持。

【0092】<藉由氨負荷試驗之尿素合成能力的測量>

在(6)及(7)之實驗中，從肝門靜脈將克-漢二氏緩衝液(Krebs-Henseleit Buffer)以 11ml/分鐘之速度灌流至經 48 小時灌流後之肝臟，共計 2 小時，以洗淨臟器內之血液及灌流液。繼而，將添加有 1mM 鳥胺酸鹽酸鹽、1mM 氯化銨之克-漢二氏緩衝液以 11ml/分鐘之速度灌流 30 分鐘，進行氨負荷試驗，連續地採集從肝上部下大靜脈流出之克-漢二氏緩衝液。又，剛宰殺後，將肝臟以(6)記載之方法摘出，連接於灌流回路，將該肝臟亦以與上述同樣之方式實施氨負荷試驗，連續地採集從肝上部下大靜脈流出之克-漢二氏緩衝液。在 30 分鐘之氨負荷試驗終了後，再度輸送克-漢二氏緩衝液，洗淨臟器內之溶液，並連續地採集克-漢二氏緩衝液。將所採集之克-漢二氏緩衝液以 1800rpm 離心 3 分鐘，回收上清液，並使用 F-kit 尿素/氨(JK International，日本東京)，依照所

附加之說明書測量尿素量。

【0093】將採集之克-漢二氏緩衝液中所含之尿素量的連續性變化展示於第 13 圖中。如第 13 圖所示，使用添加紅血球之灌流液進行灌流時，與使用未添加紅血球之灌流液進行灌流時相比，藉由氨負荷試驗之尿素的合成量顯著且高度地維持，與剛宰殺後之肝臟相比，亦顯示維持約 60%之尿素合成量。

【0094】亦即，從藉由白蛋白合成量及氨負荷試驗之尿素合成能力的測量結果，使用添加紅血球之灌流液進行灌流時，與使用未添加紅血球之灌流液進行灌流時相比，可知肝臟之代謝功能顯著且高度地維持。

【0095】<肝臟內血管網之分析>

在(6)及(7)之實驗中，將 48 小時灌流後之肝臟，立即藉由生理食鹽水灌流，洗淨臟器內之紅血球或灌流液。洗淨後，使 25ml 之經 FITC 標識之明膠灌流後，藉由置於低溫處，使明膠於臟器之血管網內固化。明膠固化後，使臟器浸漬於 0.5%多聚甲醛-磷酸緩衝液進行固定。然後，使用 OCT 化合物(OCT compound)凍結包埋。將所製成之凍結塊切片成厚度 100  $\mu$  m，以去氧膽酸鈉處理後，用含赫斯特染料(Hoechst)之 4%多聚甲醛-磷酸緩衝液固定。又，剛宰殺後，以(6)記載之方法摘出的肝臟，進行與前述同樣之處理。以封片劑(mounting agent)封片後，使用共軛焦雷射顯微鏡 LSM780(Carl Zeiss)，藉由 Z-stack 取得圖像。

【0096】將各個肝臟切片之螢光影像展示於第 14 圖中。如第 14 圖所示，使用添加紅血球之灌流液進行灌流時，與使用未添加紅血球之灌流液進行灌流時相比，可知螢光色素漏出至血管外者

較少，高度地維持血管構造。

【0097】亦即，從肝臟內血管網之分析，使用添加紅血球之灌流液進行灌流時，與使用未添加紅血球之灌流液進行灌流時相比，可知肝臟之血管構造回復至與剛宰殺後之肝臟近似的狀態。

【0098】(9)藉由異位性肝移植所進行之缺血臟器之植入評估  
<異位性肝移植>

就異位性肝移植之捐贈者而言，係使用：除了心跳停止後 90 分鐘，使用細胞培養用培育器並於室溫靜置以外，以與(2)記載之方法同樣之方法所作成之溫缺血模型大鼠。使用前述溫缺血模型大鼠，以(6)記載之方法進行肝臟之摘出及灌流。灌流後，將肝門靜脈之插管移開，連接新的灌流用管子，使用 500ml 之未加入肝素但加入紅血球的灌流液( $5.0 \times 10^{11}$  個細胞/L)進行灌流。在灌流之期間，使接受者之 13 週齡威斯達(Wistar)大鼠(SLC)移入充滿乙醚(Wako)之乾燥器中，進行吸氣麻醉。在設定成異氟烷(isoflurane)濃度為 4%之麻醉環境下，將大鼠開腹。使右腎動脈露出，從右腎靜脈剝離，使用夾具使此等血管之血流遮斷後，予以切斷。在切斷部位裝上袖套(cuff)。將肝下部下大靜脈用對開夾鉗(half clamp)夾住，並切斷右腎靜脈，摘出右腎。以不使灌流中途停止之方式，將捐贈者之肝設置於手術處，將其肝下部下大靜脈與接受者之右腎靜脈進行端側吻合(end-to-side anastomosis)。繼而，將捐贈者之肝之肝動脈與接受者之右腎動脈藉由袖套法進行吻合。吻合後，進行肝動脈、肝下部下大靜脈之再灌流，將連接肝門靜脈之插管解開後，將捐贈者之肝之肝門靜脈與接受者之門靜脈進行端側吻合，吻合後進行肝門靜脈之再灌流。從陰莖靜脈注入 2ml 之輸液。

將膽管支架插入空腸，進行吻合固定，腹膜、皮膚之縫合，並進行閉腹。將本實施例之異位性肝移植的概略圖展示於第 15 圖中。

**【0099】** <藉由異位性肝移植所進行之缺血臟器的植入評估>

爲了證明已藉由本發明之方法進行灌流之臟器或組織可使用於移植，對於下述第 1 至 3 組，藉由異位性肝移植進行臟器的植入評估。

第 1 組：對於使用本發明之方法進行灌流的肝臟，以上述方法進行異位性肝移植(在本說明書中，亦稱爲紅血球添加組)。

第 2 群：使用經過 90 分鐘溫缺血狀態之大鼠肝臟(亦即，在(2)記載之溫缺血模型大鼠的作成方法中，將藉由細胞培養用培育器進行培育之時間設爲 90 分鐘的大鼠之肝臟)，並使用 UW 液(Viaspan, Astellas Parma Inc., Japan)作爲臟器保存液，於冷溫下進行 100 分鐘之浸透保存後，進行異位性肝移植(在本說明書中，亦稱爲 UW 保存組)。使用 UW 液做爲保存液，於冷溫下之浸透保存，爲現今移植醫療中一般採行之移植用臟器的保存方法。

第 3 組：除了使用未添加紅血球之灌流液進行肝臟之灌流以外，與第 1 組同樣地進行異位性肝移植(在本說明書中，亦稱爲紅血球未添加)。

將各組織至移植第 7 日爲止之大鼠的生存率展示於第 16 圖中。

**【0100】** 如第 16 圖所示，在 UW 保存組中，移植後 7 日之大鼠的生存率爲 40%，在紅血球未添加組中，移植後 7 日之大鼠的生存率爲 60%。另一方面，令人驚奇地，在紅血球添加組中，移植後 7 日之大鼠的生存率爲 100%。又，從移植臟器之外觀所見，

亦顯示在紅血球添加組中，已被移植之臟器藉由宿主之血流而被維持，因而植入活體中。

【0101】再者，對於觀察期間死亡之個體，藉由 HE 染色進行組織分析。其結果，由於在 UW 保存組中，確認肝實質細胞消失、組織纖維化、及淋巴球浸潤，亦在紅血球未添加組中，確認有未見到紅血球滯留及核染色之處所，所以暗示有發生組織壞死的可能性。另一方面，在紅血球添加組中，從移植 7 日後之組織分析的結果可知，移植臟器，雖然可見到肝門靜脈區之格里森鞘 (Glisson's sheath) 有一部分擴大，然而在組織影像中可見到與活體肝臟同樣的生存細胞及肝竇構造，顯示該移植肝之植入。將此等組織分析之結果展示於第 17 圖中。

【0102】亦即，若依照本發明之方法，顯示一度陷於溫缺血狀態之臟器，可維持及/或回復至能安全移植之狀態。由於考量先前將一度陷於溫缺血狀態之臟器用於移植極為困難，本實施例之結果可稱得上是令人驚奇之結果。

【0103】(10)藉由肝切除・肝門靜脈結紮而進行之移植臟器之生理性肝功能分析

<進行異位性肝移植之大鼠的肝切除・肝門靜脈結紮>

以(9)記載之方法進行異位性肝移植，將移植後經過 7 日之個體移入充滿乙醚(Wako)之乾燥器中，進行吸氣麻醉。在設定成異氟烷(isoflurane)之濃度為 4%的麻醉環境下，將大鼠開腹。將宿主肝臟之左葉、左中葉、右中葉於各個分葉處使用絲製縫合線 4 號進行結紮，使血流斷絕後切除。然後，將繫於宿主肝臟之肝門靜脈使用絲製縫合線 4 號結紮，進行腹膜、皮膚之縫合，並進行閉

腹。將本實施例中之肝門靜脈結紮的概略圖展示於第 18 圖中。

**【0104】** <移植臟器之生理性肝功能的分析>

爲了證明移植臟器具有正常肝功能，藉由宿主肝臟之部分肝切除及連繫宿主肝臟之肝門靜脈的結紮，使肝功能降低，以評估是否可由移植臟器之功能來代替。在使用先前之臟器保存技術進行移植的 UW 保存組，及在未添加紅血球下進行移植臟器之灌流的紅血球未添加組中，使宿主肝臟之功能降低後，確認所有案例均死亡(第 19 圖)。與此相對地，在使用本發明之方法進行移植臟器之灌流的紅血球添加組中，可見到 5 例中 5 例均爲生存例(第 19 圖)。從以上之結果可明白使用本發明之方法進行灌流的臟器可維持個體生存所必須之臟器功能。

**【0105】** 又，爲了評估移植肝臟於身體內之功能，在紅血球添加組中，分析肝再生能力。移植後 7 日之宿主肝(部分肝切除前)之重量的平均值爲 9.27g，移植肝臟之重量的平均值爲 3.386g。宿主肝之重量的平均值藉由 70%肝切除，減少爲 3.26g。宿主肝之部分肝切除後，經 7 日之觀察後，摘出宿主臟器及移植臟器兩者，測量重量。其結果，宿主肝臟之重量的平均值爲 3.28g，幾乎無變化，然而移植肝臟之重量的平均值增加至 8.24g(第 20 圖)。

**【0106】** 從以上之結果，顯示本發明之方法不僅係使一度陷於溫缺血狀態之臟器可利用於移植的技術，亦爲可重生保持生存所必須之生理功能之臟器的技術。

**【0107】** 再者，爲了判斷移植肝之肝重量的增大是否經過正常肝再生過程，對於宿主肝臟於部分肝切除及肝門靜脈結紮後經過 1 週後的肝臟，藉由 HE 染色進行組織分析，及藉由免疫染色

進行白蛋白及 Brd-U 的表現分析。如第 21 圖及第 22 圖所示，在宿主肝之部分切除前的移植肝中，雖然可見到與肝臟之正常組織同等的組織構造，但是幾乎無法確認白蛋白之表現。然而，伴隨宿主肝臟之肝功能降低，可確認移植肝之肝細胞索的構造變化及肝竇構造的擴張。又，在宿主肝之部分切除後第 7 日之移植肝中，可確認白蛋白之產生量明確地上升。再者，在宿主肝之部分切除後第 7 日的移植肝中，由於 Brd-U 陽性細胞(亦即，細胞分裂產生之細胞)佔全部細胞數之 47.7%，顯示藉由細胞增殖造成肝之再生。

【0108】從以上之結果，可知將藉由本發明之方法進行灌流之肝臟使用於移植時況，對應於宿主肝之肝功能降低，移植之肝臟顯示正常肝功能之回復及重量之增加。

【0109】實驗數據係使用 IBM SPSS Statistics Base(SPSS 股份有限公司，東京，日本)分析皮爾遜(Pearson)之積率相關係數。各實驗數據之統計學上有顯著差異，係使用不成對學生-t 檢定(Unpaired Student' s-t)進行分析。分析係使用共通閘道介面程式(Common Gateway Interface Program) (twk，美國明尼蘇達州聖約翰大學)進行。

#### 【0110】(11)結論

從以上之結果，令人驚奇地知道使用添加紅血球之灌流液灌流移植用臟器時，可見到極高的組織損害之抑制效果。亦即，可知藉由使用添加紅血球之灌流液灌流移植用臟器或組織，可顯著地抑制摘出後之臟器或組織的損害，藉此可原樣維持臟器或組織之功能而長期維持。

【0111】又，可知對於因心跳停止成爲溫缺血狀態之肝臟，

藉由使用添加紅血球之灌流液灌流，可抑制肝損害之發生，並且可使肝實質細胞及肝竇構造回復至近似剛心跳停止後的肝臟狀態。

【0112】再者，已使用添加紅血球之灌流液進行灌流之肝臟用於移植時，與使用先前之臟器保存技術進行保存之肝臟或使用未添加紅血球之灌流液進行灌流之肝臟用於移植時相比，在宿主中顯示極高植入率。又，已使用添加紅血球之灌流液進行灌流之肝臟用於移植時，亦顯示能夠作為具有正常功能及構造之肝臟運作。

【0113】從此等結果顯示：就使來自心跳停止患者之臟器或組織維持及/或回復至適合移植之水準的技術而言，本發明極為有用。當然自不待言，本發明不僅可使用於來自心跳停止患者之臟器或組織，亦可使用於例如來自腦死患者之臟器等各種狀態的臟器或組織。

### 【符號說明】

#### 【0114】

1	灌流回路
10、11	臟器固定用灌流容器
20	簡易型動物細胞培養裝置
30、31、32、33	容器
40、41	蠕動泵
50、51	灌流液回收端口

## 申請專利範圍

1. 一種用於移植之哺乳類之臟器或組織之長期維持方法，其係使用藉由灌流液進行之灌流而長期維持用於移植之哺乳類之臟器或組織，該方法包含下述各步驟：
  - (a)將用於使前述灌流液流入之灌流液流入用插管連接於前述「臟器或組織」的步驟；
  - (b)從前述「臟器或組織」連接用於使前述灌流液流出之灌流液流出用插管的步驟；
  - (c)一邊將前述臟器或組織之溫度維持於 20°C 至 25°C，一邊將包含  $0.5 \times 10^{11}$  個細胞/L 至  $50.0 \times 10^{11}$  個細胞/L 的紅血球及血液凝固阻礙劑之灌流液灌流於前述臟器或組織內的步驟。
2. 如申請專利範圍第 1 項所述之用於移植之哺乳類之臟器或組織之長期維持方法，其中在前述步驟(c)中使灌流液循環。
3. 如申請專利範圍第 2 項所述之用於移植之哺乳類之臟器或組織之長期維持方法，其進一步包含下述步驟：
  - (d)在前述步驟(c)之前，使包含氧運輸體及血液凝固阻礙劑之灌流液灌流入前述「臟器或組織」並且洗淨前述「臟器或組織」，隨後將用於該洗淨之灌流液除去之步驟。
4. 如申請專利範圍第 1 或 2 項所述之用於移植之哺乳類之臟器或組織之長期維持方法，其中
  - 在前述步驟(c)中，前述「臟器或組織」係與活體內連接於前述「臟器或組織」之第二「臟器或組織」一起被摘出者；
  - 藉由固定前述第二「臟器或組織」而將前述「臟器或組織」以垂吊之狀態進行灌流。

5. 如申請專利範圍第 1 或 2 項所述之用於移植之哺乳類之臟器或組織之長期維持方法，其中在前述步驟(c)中，使前述「臟器或組織」以其至少一部分承受浮力之方式浸漬於液體中。
6. 如申請專利範圍第 1 或 2 項所述之用於移植之哺乳類之臟器或組織之長期維持方法，其中前述血液凝固阻礙劑係肝素。
7. 如申請專利範圍第 1 或 2 項所述之用於移植之哺乳類之臟器或組織之長期維持方法，其中前述「臟器或組織」係選自由肝臟、腎臟、胰臟、心臟、肺、胃、睪丸、卵巢、眼球所構成之群組。