

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第4603246号  
(P4603246)

(45) 発行日 平成22年12月22日(2010.12.22)

(24) 登録日 平成22年10月8日(2010.10.8)

(51) Int.Cl.		F I
<b>AO1N 1/02</b>	<b>(2006.01)</b>	AO1N 1/02
<b>A61K 31/16</b>	<b>(2006.01)</b>	A61K 31/16
<b>A61K 31/4412</b>	<b>(2006.01)</b>	A61K 31/4412
<b>A61P 7/00</b>	<b>(2006.01)</b>	A61P 7/00
<b>A61P 25/28</b>	<b>(2006.01)</b>	A61P 25/28

請求項の数 27 (全 18 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2003-138927 (P2003-138927)  
 (22) 出願日 平成15年5月16日(2003.5.16)  
 (65) 公開番号 特開2004-2418 (P2004-2418A)  
 (43) 公開日 平成16年1月8日(2004.1.8)  
 審査請求日 平成18年3月30日(2006.3.30)  
 (31) 優先権主張番号 10222561-3  
 (32) 優先日 平成14年5月17日(2002.5.17)  
 (33) 優先権主張国 ドイツ(DE)

(73) 特許権者 503178174  
 ドクトル・フランツ・ケーラー・ヒェミー  
 ・ゲゼルシャフト・ミット・ベシュレンク  
 テル・ハフツング  
 Dr. Franz Koehler C  
 hemie GmbH  
 ドイツ連邦共和国64665アルスパッハ  
 ーヘーンライン、ノイエ・ベルクシュトラ  
 ーセ3-7番  
 (74) 代理人 100081422  
 弁理士 田中 光雄  
 (74) 代理人 100068526  
 弁理士 田村 恭生  
 (74) 代理人 100103115  
 弁理士 北原 康廣

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 臓器保護溶液

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

灌流、手術、移植または凍結保存とその後の再灌流の後の臓器または単離された細胞系もしくは組織部分の貯蔵性損傷、虚血性損傷または再灌流性損傷を防止するための保護溶液であって、(i) 電解質としてのアルカリオンおよび所望によるアルカリ土類イオン、緩衝剤並びにポリオールおよび/または糖を含有し、(ii) 290 mosm/l ~ 350 mosm/l の浸透圧モル濃度および6.8 ~ 7.4 のpH値を有し、(iii) 1種もしくは複数種のヒドロキサム酸誘導体であって、ヒドロキサム酸の窒素原子上の水素原子がメチル基によって置換されると共に、ヒドロキサム酸の炭素原子上の水素原子が、ヒドロキシ基および/またはメトキシ基を有するアリール基によって置換されたヒドロキサム酸誘導体が添加されることを特徴とする該保護溶液。

【請求項2】

下記の群から選択される1種もしくは複数種の化合物を含有する請求項1記載の溶液：

- サリチル - N - メチルヒドロキサム酸、
- 3, 4 - ジメトキシ - N - メチル - ベンズヒドロキサム酸、
- 2, 3 - ジメトキシ - N - メチル - ベンズヒドロキサム酸、
- 2, 4 - ジメトキシ - N - メチル - ベンズヒドロキサム酸、
- 3, 5 - ジメトキシ - N - メチル - ベンズヒドロキサム酸、
- 3, 4, 5 - トリメトキシ - N - メチル - ベンズヒドロキサム酸、

【請求項3】

デフェロキサミンが添加される請求項 1 または 2 記載の溶液。

【請求項 4】

6 - ヒドロキシ - 2, 5, 7, 8 - テトラメチルクロマン - 2 - カルボン酸のメチルエステルが添加される請求項 1 から 3 いずれかに記載の溶液。

【請求項 5】

緩衝剤として、ヒスチジンおよび / または 1 種もしくは複数種のアシル化ヒスチジンに基づく緩衝剤を含有する請求項 1 から 4 いずれかに記載の保護溶液。

【請求項 6】

N - アセチルヒスチジンに基づく緩衝剤を含有する請求項 5 記載の溶液。

【請求項 7】

N - アシル化ヒスチジンまたはこれと適当な有機塩基との組合せに基づく緩衝剤を含有する請求項 5 記載の溶液。

【請求項 8】

緩衝剤が、N - グリシルヒスチジン / N - グリシルヒスチジン塩酸塩あるいは N - アセチルヒスチジン / リシンおよび / またはアルギニンおよび / またはコリンに基づく緩衝剤である請求項 7 記載の溶液。

【請求項 9】

ヒドロキサム酸誘導体を 10 mmol / l までの濃度で含有する請求項 1 から 8 いずれかに記載の溶液。

【請求項 10】

デフェロキサミンを 10 mmol / l までの濃度で含有する請求項 3 から 9 いずれかに記載の溶液。

【請求項 11】

トロロックスを 10 mmol / l までの濃度で含有する請求項 5 から 9 いずれかに記載の溶液。

【請求項 12】

N - アセチルヒスチジン / N - アセチルヒスチジン(-)を 20 ~ 265 mmol / l の濃度で含有する請求項 6 または 8 記載の溶液。

【請求項 13】

電解質として、ナトリウムを目的に応じて 10 ~ 120 mmol / l の濃度で含有する請求項 1 から 12 いずれかに記載の溶液。

【請求項 14】

電解質として、カリウムを目的に応じて 5 ~ 25 mmol / l の濃度で含有する請求項 1 から 13 いずれかに記載の溶液。

【請求項 15】

電解質として、マグネシウムを目的に応じて 3 ~ 27 mmol / l の濃度で含有する請求項 1 から 14 いずれかに記載の溶液。

【請求項 16】

電解質として、カルシウムを目的に応じて 0.0001 ~ 1.5 mmol / l の濃度で含有する請求項 1 から 15 いずれかに記載の溶液。

【請求項 17】

アスパラギン酸塩を 140 mmol / l までの濃度で含有する請求項 1 から 16 いずれかに記載の溶液。

【請求項 18】

塩化物を含有する請求項 1 から 17 いずれかに記載の溶液。

【請求項 19】

アスパラギン酸塩を塩化物に比べて過剰に含有する請求項 18 記載の溶液。

【請求項 20】

- ケトグルタレートを目的に応じて 1 ~ 9 mmol / l の濃度で含有する請求項 1 から 19 いずれかに記載の溶液。

10

20

30

40

50

## 【請求項 2 1】

オスモライトを目的に応じて 1 4 0 mmol / l までの濃度で含有する請求項 1 から 2 0 いずれかに記載の溶液。

## 【請求項 2 2】

虚血性損傷および再灌流性損傷を保護するための請求項 1 から 2 1 いずれかに記載の溶液。

## 【請求項 2 3】

梗塞または炎症反応後の虚血性損傷および再灌流性損傷を保護するための請求項 2 2 記載の溶液。

## 【請求項 2 4】

心筋梗塞、卒中発作、災害外科手術または手足の再灌流の後の再灌流損傷に対して使用するための請求項 2 記載の溶液。

10

## 【請求項 2 5】

高鉄血症に原因がある病気の治療に使用するための請求項 2 記載の溶液。

## 【請求項 2 6】

アルツハイマーに原因がある病気の治療に使用するための請求項 2 5 記載の溶液。

## 【請求項 2 7】

ラジカル、酸素ラジカルまたは  $H_2O_2$  による細胞損傷に原因がある病気の治療に使用するための請求項 2 記載の溶液。

## 【発明の詳細な説明】

20

## 【0001】

## 【発明の属する技術分野】

本発明は、血液が十分に供給されない虚血性臓器の長時間に及ぶこともある手術を実施できるようにするために、臓器、特に心臓、肺臓、腎臓、肝臓、膵臓および血管系を保護する溶液または輸送中もしくは貯蔵中の他の保存方法による組織の損傷を少なくしてこの種の臓器を移植するために該臓器を保存する溶液または虚血性臓器の再灌流(reperfusion)のための溶液の改良された組成に関する。従って、本発明は G M P 基準の要求に従う適当な溶液とその製造法を提供する。

## 【0002】

## 【従来の技術】

30

1955年にメーローズによって高カリウム血症性心停止が発見されて以来、心臓外科医は、虚血性の不安定な心臓について複雑な手術を実施する立場に置かれていた。当時の心臓麻痺溶液を用いることによってわずかに40分間までは手術をおこなうことができたが、最初は先天性の心臓奇形の手術による復元と心臓弁プロテーゼの移植が可能であった。心臓外科医の里程標は、1967年にバーナードによっておこなわれた心臓移植である。

## 【0003】

別の研究の目標は、その時まで制限されていた手術時間を適当な溶液とその使用方法によって延長させることであった。既に60年も前に、ブレットシュナイダーの研究グループは、心筋層の保護を改善するための新しい構想に従って、虚血時間を著しく長くすることを可能にした。最初は、ナトリウムを断つことによって心停止が誘発され、また、基質(例えば、タンパク質、アセチルコリンおよびノヴァカイン)を用いることにより細胞膜を保護し、これによって細胞内水腫の発生を阻害することができた。

40

## 【0004】

心臓、腎臓およびその他の臓器の保護溶液であって、ヒスチジン+ヒスチジン-HClに基づく緩衝剤系によって特徴づけられ、さらにナトリウムイオン、カリウムイオンおよびマグネシウムイオン並びにポリオールまたは糖を含有する保護溶液が知られている(特許文献1参照)。この保護溶液を使用することによって、非処置心臓の場合に比べて約8倍の許容される虚血時間が得られる。

## 【0005】

50

この溶液の改良法が知られている（特許文献 2 参照）。この方法によれば、保護溶液を用いる臓器の持続的な灌流の間（約 8 ~ 10 分間）における ATP - 損失のクエン酸塩サイクルの有利な影響による好気性物質代謝が、 $\alpha$ -ケトグルタレートの添加によって低減される。

【 0 0 0 6 】

その後、臨床医と生理学者の注目は、低温で低酸素の臓器を暖めることと血液の再灌流によって、該臓器の機能を完全に回復させる虚血の終了時期に向けられた。このような研究によれば次のことが判明した。即ち、所謂「再灌流段階」においては、再灌流損傷（I - R - 損傷）という概念によって一緒に把握される種々の病態生理学的過程がおこなわれる。この場合、特に、炎症性過程の一部は原因と考えられ、一部は結果と考えられる内皮細胞損傷がもたらされ、また、これらの病因においては、反応性の酸素種が重要な意義を持つと考えられている。最近になって、臓器の保護するために使用される低温化も特有の損傷要因になることが判明した。現在使用されている保存溶液は、このような損傷に対して保護能を発揮しない。

10

【 0 0 0 7 】

【特許文献 1】

ヨーロッパ特許第 1 2 2 7 2 号明細書

【特許文献 2】

ヨーロッパ特許第 5 4 6 3 5 号明細書

【 0 0 0 8 】

20

【発明が解決しようとする課題】

本発明の目的は、虚血と再灌流の間における下記の病態生理学的過程を防止または低減させることである：

- ( i ) 虚血性損傷
- ( ii ) 低温損傷（低温誘発性アポプトシス）
- ( iii ) 再灌流損傷
- ( iv ) 炎症性過程。

【 0 0 0 9 】

【課題を解決するための手段】

この課題は、本願の請求項の特に 1 または 8 記載の臓器保護溶液によって解決された。即ち本発明は、灌流、手術、移植または凍結保存とその後の再灌流の後の臓器または単離された細胞系もしくは組織部分の貯蔵性損傷、虚血性損傷または再灌流性損傷を防止するための保護溶液であって、( i ) 電解質としてのアルカリイオンおよび所望によるアルカリ土類イオン、緩衝剤並びにポリオールおよび / または糖を含有し、( ii ) 約 290 mosm / l ~ 約 350 mosm / l の浸透圧モル濃度および約 6.8 ~ 約 7.4 の pH 値を有し、( iii ) ヒドロキサム酸および / または 1 種もしくは複数種のヒドロキサム酸誘導体が添加されることを特徴とする該保護溶液に関する。

30

【 0 0 1 0 】

【発明の実施の形態】

心臓麻痺と臓器保存における細胞と組織の損傷に関する前記メカニズムからは、臓器保護溶液の組成に対してはかなりの数の要求があることが明らかである。

40

このような要求を満たすために、本発明者は、請求項 1 および / または 8 に記載の有効に作用する新規な臓器保護溶液の着想を可能にする物質を見出した。この溶液の組成は、上記の損傷過程が発生する前に有効な保護作用が得られるように選択される。

【 0 0 1 1 】

保護機構に方向づける非毒性成分を使用することにより、保存損傷は明確に低減する。偶発的または吻合時に発生する臓器の昇温の際に従来から使用されている保存溶液によってもたらされる有毒性は低減される。この方法により、該臓器の組織の機能と活力が改善され、また、虚血と低温保存の許容度が高くなるので、臓器の保存時間の延長化が可能となる。このことは、移植のための臓器の取り扱い性を改善する理論にも寄与する。

50

## 【 0 0 1 2 】

ヒドロキサム酸の窒素原子上の水素原子が炭素原子数が1～20のアルキル基、アリール基またはアルキルアリール基によって置換されたヒドロキサム酸誘導体の使用が有利であることが実証された。

## 【 0 0 1 3 】

さらに、ヒドロキサム酸誘導体においては、ヒドロキサム酸の炭素原子上の水素原子が炭素原子数が1～20のアルキル基、アリール基またはアルキルアリール基によって置換されていることが推奨され、この場合、これらの置換基はヘテロ原子および/またはヒドロキシ基、アミノ基、メトキシ基を有していてもよい。

## 【 0 0 1 4 】

また、ヒドロキサム酸の窒素原子上の置換基とヒドロキサム酸の炭素原子上の置換基は環を形成していることも有利である。

## 【 0 0 1 5 】

本発明においては、下記の1種もしくは複数種の化合物および/またはこれらの塩類を含有させることが推奨される；

アセトヒドロキサム酸、

アセト-N-メチルヒドロキサム酸、

N-ベンジルアセトヒドロキサム酸、

ヘキサンヒドロキサム酸、

ヘキサン-N-メチルヒドロキサム酸、

ベンズヒドロキサム酸、

N-メチルベンズヒドロキサム酸、

サリチルヒドロキサム酸、

サリチル-N-メチルヒドロキサム酸、

サリチル-N-ベンジルヒドロキサム酸、

2-フェニルアセトヒドロキサム酸、

2-フェニルアセト-N-メチルヒドロキサム酸、

3,4-ジメトキシベンズヒドロキサム酸、

3,4-ジメトキシ-N-メチル-ベンズヒドロキサム酸、

2,3-ジメトキシ-N-メチル-ベンズヒドロキサム酸、

2,4-ジメトキシ-N-メチル-ベンズヒドロキサム酸、

3,5-ジメトキシ-N-メチル-ベンズヒドロキサム酸、

2,4-ジヒドロキシベンズヒドロキサム酸、

2,3-ジヒドロキシベンズヒドロキサム酸、

3,4-ジヒドロキシベンズヒドロキサム酸、

3,4,5-トリメトキシ-ベンズヒドロキサム酸、

3,4,5-トリメトキシ-N-メチル-ベンズヒドロキサム酸、

4-ヒドロキシ-3-メトキシ-ベンズヒドロキサム酸、

2-ヒドロキシ-3-メトキシ-ベンズヒドロキサム酸、

2-ヒドロキシ-5-メトキシ-ベンズヒドロキサム酸、

2-ヒドロキシ-3-メチル-イソカルボスチリル、

4-クロル-N-メチル-ベンズヒドロキサム酸、および

6-シクロヘキシ-1-ヒドロキシ-4-メチル-2(1H)-ピリドン。

## 【 0 0 1 6 】

さらに、デフェロキサミンの添加も考慮に値し、有利であり、その濃度は約10mmol/lまでにすることが推奨される。

## 【 0 0 1 7 】

6-ヒドロキシ-2,5,7,8-テトラメチルクロマン-2-カルボン酸の誘導体または対応するメチルエステルを添加することが推奨される。

## 【 0 0 1 8 】

10

20

30

40

50

N - アセチルヒスチジン (Ac-N-His)、特に N - アシル化ヒスチジンまたはこれらと適当な有機塩基との組合せ、例えば、N - グリシルヒスチジン / N - グリシルヒスチジン - ヒドロクロリドあるいは N - アセチルヒスチジン / リシンおよび / またはアルギニンおよび / またはコリンに基づく緩衝剤の使用が有効である。

【 0 0 1 9 】

本発明による溶液は、リシンおよび / またはリシン誘導体、好ましくはリシン含有ジペプチドのようなカチオン源並びに所望によるアスパラギン酸塩のようなアニオン源を含有するのが有利である。

【 0 0 2 0 】

ヒドロキサム酸および / またはその誘導体の溶液中の濃度は、約 1 0 mmol / l までにするのが有利である。

【 0 0 2 1 】

また、トロロックスは、約 1 0 mmol / l までの濃度で溶液中に含有させるのが有効である。

【 0 0 2 2 】

N - アセチルヒスチジン / N - アセチルヒスチジン (-) の濃度は約 2 0 ~ 約 2 6 5 mmol / l にするのが有利である。

【 0 0 2 3 】

さらに、溶液中には電解質としてナトリウムを約 1 0 ~ 約 1 2 0 mmol / l の濃度で添加することが推奨される。選択的または補充的なカリウムを約 5 ~ 約 2 5 mmol / l の濃度で含有させるのが有利である。

【 0 0 2 4 】

さらにまた、マグネシウムを約 3 ~ 約 2 7 mmol / l の濃度で含有させるのが有利である。

【 0 0 2 5 】

最後に、カルシウムを約 0 . 0 0 0 1 ~ 約 1 . 5 mmol / l の濃度で含有させるのが有利である。

【 0 0 2 6 】

特に、リシンおよび / またはその誘導体、好ましくはリシン含有ジペプチドを約 1 4 0 mmol / l までの濃度で含有させることが推奨される。

【 0 0 2 7 】

アスパラギン酸塩の溶液中の濃度は約 1 4 0 mmol / l までにするのが有利である。

【 0 0 2 8 】

溶液中に塩化物を含有させる場合、塩化物に対してアスパラギン酸塩を過剰に使用することが推奨される。

【 0 0 2 9 】

- ケトグルタレート含有量は約 1 ~ 約 9 mmol / l の濃度にするのが有利であることが実証された。

【 0 0 3 0 】

オスマライト (Osmolyt) は溶液中に約 1 4 0 mmol / l までの濃度で含有させるのが有利である。

【 0 0 3 1 】

前記の請求項に記載の溶液を調製するためには、次の製法が推奨される： ( i ) 過剰な水 ( 必要な水分量の約 9 0 % の水が有効 ) に電解質を攪拌下で溶解させ、 ( ii ) 次いで緩衝剤を添加し、さらにヒドロキサム酸および / またはその誘導体を添加し、 ( iii ) 溶液の pH 値を調整し、 ( iv ) 1 種もしくは複数種のオスマライトを添加し、 ( v ) 溶液の体積を水を用いて所要の体積まで増大させる。

【 0 0 3 2 】

ヒドロキサム酸および / またはその誘導体を得るためには、低級アルコールおよび / または DMF および / または THF を溶剤として使用するのが有利である。

【 0 0 3 3 】

10

20

30

40

50

この方法は、カルボン酸との反応を塩基触媒の存在下でおこなうときに特に有効である。

【0034】

特に請求項5に記載の本発明は、心筋梗塞、卒中発作、災害外科手術または手足の再灌流の後の再灌流損傷の緩和もしくは防止のために適用される。さらに、該発明は、病因が高鉄血症（例えば、アルツハイマー）あるいはラジカル、酸素ラジカルもしくは $H_2O_2$ による細胞損傷にあるような病気の治療に適用することが推奨される。

【0035】

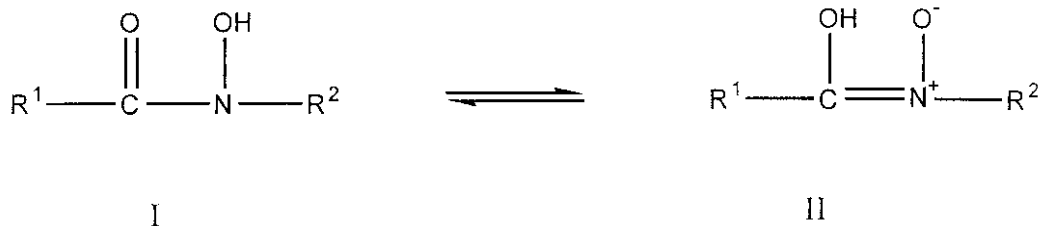
鉄キレート化剤は鉄依存性の低温損傷および低温誘発性のアポプトシスを阻止する。この細胞損傷を低減させるための化合物としては、全ての錯体形成剤が適しているわけではない。例えば、EDTAは、強い鉄錯体を形成するが、このリガンドはカストジオール（Cu stodiol）中に含まれるヒスチジンのように、ここでは有効ではない。それどころか、鉄は特殊な方法によってリガンドによって結合されなければならない、また、該リガンドは細胞内のコンパートメント内へ迅速かつ十分な濃度で到達しなければならない。

10

【0036】

デフェロキサミン中には3倍含まれるヒドロキサム酸IおよびIIの構造要素は、鉄に対しては適当な構造要素およびリガンドとして特別な意義を有する（次式参照）：

【化1】



20

【0037】

式中、 $R^1$ は直鎖状または分枝鎖状の $C_1 \sim C_{20}$ アルキル、アリアルまたはアルキル-アリアルを示し、ヘテロ原子および/または他の置換基（例えば、 $-OH$ 、 $-NH_2$ 等）を有していてもよい。また、 $R^2$ はHを示すか、または $R^1$ の場合と同じ意義を有していてもよい。この場合、 $R^1$ と $R^2$ は閉環していてもよく、および/または他の置換基を有していてもよい（例えば、2-ヒドロキシピリジン-N-オキソおよびその誘導体）。このような環状化合物は、 $R^1$ と $R^2$ が共役二重結合を有する環を形成する場合には、別の互変異性体構造を有する。デフェロキサミンに比べて小さくて親油性の物質を用いることによって、強い鉄キレート化剤の細胞内への迅速な適用法が実現される。

30

【0038】

簡単なヒドロキサム酸は有利な作用を示すが、良好な効能を得るためには、一定の親水性/親油性比が必要である。さらに、次のことが判明した。即ち、ヒドロキサム酸の窒素原子にアルキル基が置換した化合物（ $R^2 = \text{アルキル}$ ）は非置換化合物（ $R^2 = H$ ）に比べて一般により効果的である。 $R^2$ が強い電子吸引性基、例えば、 $-CO-R^3$ （ $R^3$ は $R^1$ と同意義である）である場合には、該置換基を有する化合物は効力のないものとなるが、このような化合物（例えば、N-ヒドロキシスクシンイミド、3,4-ジヒドロ-3-ヒドロキシ-4-オキソ-1,2,3-ベンゾトリアジン）は弱い鉄錯体を形成する。

40

【0039】

2種類の例示化合物の効能を図1および図2において例証する。

本発明による溶液には、ヒドロキサム酸および/またはその誘導体を、目的に応じて約10mmol/lまでの濃度で含有させてもよい。

【0040】

図1は、肝臓の内皮細胞の低温損傷に対するサリチル-N-メチルヒドロキサム酸の抑制効果を示すグラフである。培養したラットの肝臓の内皮細胞をウィスコンシン大学-溶液（UW）中（4）、1mMサリチル-N-メチルヒドロキサム酸の存在下または不存在下において、好気性条件下で72時間培養させた後、細胞培養培地中（37）で3時間

50

加温した。細胞損傷のパラメーターとしては、細胞質ゾルの乳酸デヒドロゲナーゼ (LDH) の遊離 (%) を用いた。

【0041】

図2は、肝細胞の低温損傷に対する3,4-ジメトキシ-N-メチル-ベンズヒドロキサム酸の抑制効果を示すグラフである。培養したラットの肝細胞をウィスコンシン大学-溶液(UW)中(4)、1mM 3,4-ジメトキシ-N-メチル-ベンズヒドロキサム酸の存在下または不存在下において、好気性条件下で24時間培養させた後、細胞培養培地中(37)で3時間加温した。細胞損傷のパラメーターとしては、細胞質ゾルの乳酸デヒドロゲナーゼ(LDH)の遊離(%)を用いた。

【0042】

デフェロキサミンは強い鉄キレート化剤であって、鉄に対しては、6座リガンドとして非レドックス活性形態で結合する。従って、デフェロキサミンは、低温条件下に比較的長時間さらされる場合に最適な保護手段を提供する。しかしながら、デフェロキサミンは比較的大きな親水性分子であるために、限定的な膜透過性を有する。従って、デフェロキサミンは、完全な保護手段を提供するために十分な濃度と速度で全ての細胞内コンパートメント内へは到達できない。デフェロキサミンは溶液中へ、好ましくは約10mmol/lまでの濃度で含有させることができる。

【0043】

本発明による臓器保護溶液へ合目的的に添加することができるその他の化合物は請求項5および6に記載された化合物である。

【0044】

本発明の別の実施態様においては、本発明による溶液には6-ヒドロキシ-2,5,7,8-テトラメチルクロマン-2-カルボン酸(「トロロックス(Trolox)」)またはその誘導体が添加される。低温損傷と再酸素供給損傷に際して発生する細胞内ラジカルを捕獲するために、比較的親水性であるが膜透過性のラジカル捕獲剤であるトロロックスおよびその誘導体が添加される。本発明による溶液中のトロロックス誘導体の濃度は合目的的に約10mmol/lまでである。

【0045】

全ての臓器保護溶液は、虚血中の不可避的なアシドーシスを阻止する緩衝剤を用いて処理される。この場合、リン酸塩または重炭酸塩は多くの場合に使用される無機緩衝剤系である。緩衝能とpHの安定性に関しては「カストジオール(Custodiol)」(登録商標)に使用されている有機緩衝剤系のヒスチジン/ヒスチジン-HClが優れていることが判明している。緩衝剤系として、ヒスチジン/ヒスチジン-HClの代わりに、前述の溶液や他の既知の保護溶液に配合されるヒスチジン誘導体、例えば、N-アセチルヒスチジンを使用するときには、特別な利点が得られる。

【0046】

図3は、ヒスチジン/ヒスチジン-HClおよびN-アセチルヒスチジンの中和曲線を示す。生理学的なpH値の範囲内における利用可能な緩衝能は、基質に対する使用塩基の割合に基づいて、N-アセチルヒスチジンの場合は約60%であり、また、ヒスチジンの場合は約30%である。

【0047】

本発明による溶液中の上記の緩衝剤系の濃度は、好ましくは約20~約265mmol/lにすることができる。

【0048】

図3から明らかなように、N-アセチルヒスチジンは、ヒスチジン/ヒスチジン-HClに比べて約2倍の改善された緩衝能を示す。ヒスチジン誘導体の添加によって、良好な緩衝能を損なうことなく、ヒスチジンの望ましくないいくつかの副作用(いくつかの細胞型、例えば肝細胞における特に温熱時または低温時の毒性)も回避される(図4参照)。

【0049】

図4は、温暖条件下におけるヒスチジンの毒性に対する実例およびヒスチジン誘導体によ

10

20

30

40

50

るこの毒性の低減効果を示すグラフである。

【 0 0 5 0 】

培養した肝細胞を 1 9 8 mM の L - ヒスチジンまたは 1 9 8 mM の N - アセチルヒスチジンの存在下または不存在下において、好気性条件下、3 7 °C で 5 時間温置した。基礎溶液としては、細胞の培養に常用されている生理的塩溶液であるクレブス - ヘンセライト緩衝液 ( K H ) を使用した。ヒスチジンまたはその誘導体を含有する溶液においては、NaCl 濃度は約 9 9 mM に低下させ、また pH 値は HCl または NaOH の添加によって 7 . 2 に調整した。

【 0 0 5 1 】

これらのさらに発展させた溶液を用いることによって、保存後の細胞の機能をさらに改善された状態に維持することが可能となる。

10

【 0 0 5 2 】

カチオンの 1 種としては、ナトリウムが好適である。低ナトリウム濃度は、細胞膜の電気機械的脱結合 ( 心停止 ) に対して好ましく、また、該低ナトリウム濃度は、低酸素によって誘発されるナトリウム流の回避 / 低減化に起因して、低酸素損傷を低減させる。さらに、他の物質 ( 例えば、緩衝剤等 ) に対する浸透予備力 ( osmotic reserve ) が保持される。溶液のナトリウム濃度が低い場合でも、ナトリウム ( 1 4 0 mM ) の間質での増加が迅速におこなわれるので、再灌流段階におけるホメオスタシスの迅速な調整が可能である。従って、本発明による溶液におけるナトリウムの濃度を約 1 0 ~ 約 1 2 0 mmol / l にすることが推奨される。

20

【 0 0 5 3 】

比較的低い濃度であるが、生理学的に細胞外の濃度値の範囲にあるカリウム濃度は細胞膜の電気機械的脱結合 ( 心停止 ) を支持するが、強い高カリウム性 ( hyperkalemic ) 溶液の欠点を回避する。 ( 強い高カリウム性溶液は迅速な心停止を誘発するが、再酸素供給段階においては律動障害および場合によっては再灌流損傷の増大の原因となる。再灌流段階においては、間質のカリウム濃度の調整が経時的に遅延するので、このような溶液の存在下での臓器の遅延した初期機能の役割分担は高くなる。 ) 弱い高カリウム性溶液は次の利点を有する。即ち、被移植臓器の再灌流前の該溶液による洗浄は不要であり ( 該溶液はその保護特性を虚血時間の終りまで発揮することができる。 ) 、また、高い全身的許容度を示す。従って、本発明による溶液中のカリウム濃度を約 5 ~ 約 2 5 mmol / l にすることが推奨される。

30

【 0 0 5 4 】

血清の基準値に比べてマグネシウムの濃度は明らかに高くなっているが、これは、マグネシウムは多数の糖分解酵素系の補因子 ( cofactor ) として嫌気性物質代謝を支持し、低温虚血の間も A T P の形成のために寄与する。さらに、マグネシウムは、Na<sup>+</sup> - K<sup>+</sup> - A T P アーゼの活性を維持するために寄与し、イオンのホメオスタシスの変化を阻止する。生理学的な Ca<sup>2+</sup> - 拮抗剤として、マグネシウムは、細胞内のカルシウム蓄積の有害な効果に対しても阻止作用を示す。

再灌流段階においては、好気性エネルギー物質代謝を刺激するために、マグネシウムの貯蔵が必要となる。マグネシウムの血管拡張特性は、再灌流損傷における括約効果も阻止する。従って、本発明による溶液中のマグネシウムの濃度を約 3 ~ 約 2 7 mmol / l にすることが推奨される。

40

【 0 0 5 5 】

虚血並びにこれに関連する細胞内アジドーシスおよびナトリウムのホメオスタシス妨害の条件下においては、細胞質ゾルのカルシウム増大の危険がある。これによって望ましくない活性、例えば、プロテアーゼとホスホリパーゼの刺激活性の増大がもたらされ、また、心臓の場合には、A T P の多量の消費を伴う高収縮が付随する。従って、虚血中のカルシウムの生理学的機能は最大限に抑制されなければならないので、溶液中のカルシウム濃度は細胞質の濃度範囲内にすべきである。このため、本発明による溶液中のカルシウムの濃度を約 0 . 0 0 0 1 ~ 約 1 . 5 mmol / l にすることが推奨される。

50

## 【0056】

塩基性アミノ酸であるリシン、アルギニンおよびこれらの誘導体は、グリシンを含むジペプチド (Lys - Gly、Gly - Lys、Arg - Gly、Gly - Arg) として、不足する塩基等価物を補充するために添加される。これはカチオン (ナトリウム、カリウム、マグネシウムおよびカルシウム) の濃度と割合が、上記の理由に基づいて一定の範囲に維持されるからである。本発明による溶液中のリシンおよび / またはリシン誘導体並びにアルギニンおよび / またはアルギニン誘導体の濃度はそれぞれ約 140 mmol / l までにすることができる。

## 【0057】

生理学的な細胞外アニオンである塩化物は、低温虚血中のイオンのホメオスタシスの妨害を低減させるために、生理学的な値に比べて低い濃度で使用される。これは、ナトリウムのようなカチオンの低酸素誘発性流入に対して有効である。電子的中性の理由から、このカチオン流入は並行しておこなわれるアニオン (好ましくは塩化物アニオン) の流入によって左右される。多くの研究者は、塩化物の高濃度は細胞内水腫の程度を促進すると推論していることを考慮することができる。従って、本発明による溶液中の塩化物の濃度は、できる限り生理学的な水準よりも低い値 (最大で 90 mmol / l まで) に維持することが推奨される。塩化物と共に、不透過性アニオンとしてラクトバイオネート (Lactobionat) を約 140 mmol / l までの濃度で添加することができる。

## 【0058】

臓器保護溶液に使用されるアニオンの濃度は、一般にカチオンと使用される有機緩衝剤の選択によって左右される。不透過性アニオン (例えば、ラクトバイオネート) を使用することによって、細胞内水腫の発生は阻止される。アスパラギン酸塩は優れた代替物であり、特にアスパラギン酸塩を用いることによって多くの目的が達成される：

(a) アスパラギン酸塩は酸等価物として好ましくない塩化物と代替する。

(b) アスパラギン酸は膜における物質交換を有効に支持すると共に、ホメオスタシスの回復を促進する。

(c) アスパラギン酸塩は、臓器の再灌流と再酸素供給の臨界段階において、 $\alpha$ -ケトグルタレートと共に好気性物質交換を補助すると共に、臓器の初期機能を促進する。

## 【0059】

特に再酸素供給の段階においては、臓器の増大する加温に伴ってエネルギー需要が著しく高くなると、エネルギーの強制的な供給が必要となり、また、この加温段階における ATP の不足は臓器の機能を著しく阻害し、再灌流損傷の程度を増大させる。本発明による溶液中のアスパラギン酸塩の濃度を約 140 mmol / l までにすることが推奨される。本発明による溶液においては、アスパラギン酸塩は塩化物に比べて過剰に存在させるのが有効である。

## 【0060】

アミノ酸であるグリシンは比較的高いミリモル濃度で使用する。この理由は、このような濃度のグリシンは原形質膜の安定化 (拡散配向性物質交換の回避) によって低酸素誘発性ナトリウム流入を阻害し、さらにマクロファージの活性化を阻止するからである。本発明による溶液中のグリシンの濃度を約 30 mmol / l までにすることが推奨される。

## 【0061】

低温虚血中の臓器のエネルギー需要は非常に少ないわけではないので、これを補充するために、エネルギー放出性物質またはエネルギー物質交換促進性物質が溶液に添加される。この場合、種々の添加物が考慮されるが (前述のアスパラギン酸塩および  $\alpha$ -ケトグルタレート等)、例えば、グルコースが添加される。

## 【0062】

溶液の生理学的なグルコース濃度は、比較的低濃度のグリコーゲン調製物に基づく外因性グルコース供給がおこなわれる細胞 (例えば、内皮細胞) が、虚血中の嫌気性糖分解によってエネルギーを獲得することを可能にする。このグルコース濃度は、他の細胞、特に肝細胞によるグルコースの過剰摂取が回避されるように選択される (従来保存溶液の場合には、非常に高いグルコース濃度が問題となっていた)。従って、本発明による溶液中の

10

20

30

40

50

グルコースの濃度を約 10 mmol / l までにすることが推奨される。

【0063】

- ケトグルタレートはアスパラギン酸塩と共に、低酸素条件下における物質代謝を支持する。この濃度は約 1 ~ 約 9 mmol / l にするのが有効である。

【0064】

浸透性物質の添加は、約 300 mosm / L の必要な生理学的浸透圧が得られるようにしておこなうことが必要である。このためには、一般に、ポリオール / 糖 (例えば、マンニトール) または高分子量物質 (例えば、HES、デキストラン) が使用される。しかしながら、後者は好ましくはない。何故ならば、HES とデキストランを用いたときにもたらされる高い粘度は保護特性を損うという欠点があるからである。

10

「カストジオール」(登録商標) および UW - 溶液の 4 における粘度はそれぞれ 1.8 cP および 4.8 cP である。

【0065】

オスモライトとしては、臓器に応じて、マンニトール、キシリトール、ソルビトール、サッカロースまたはラフィノースを使用することができる。本発明による溶液中のオスモライトの濃度は 100 mmol / l までにするのが有効である。

【0066】

間質水腫の発生を回避するためには、いくつかの臓器 / 組織の場合には、コロイド浸透性物質、例えば、デキストラン - 40 / デキストラン - 70 等を添加するのが有効である。このような添加物質は特に肺臓や脾臓の保護に有効である。

20

【0067】

細胞と組織の凍結に対しては、付加的な抗凍結剤、例えば、ジメチルスルホキシド (DMSO) をさらに添加するのが有利である。

【0068】

図 5 は、過酸化水素による肝細胞の細胞損傷および種々のヒドロキサム酸を用いる該細胞損傷の保護効果を示すグラフである。N4 は以下の実施例 2 で調製した溶液 (但し、トロロックスおよびヒドロキサム酸誘導体は含有しない) を意味する。

グラフ 1) は N4 + H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (20 mM / l) の場合を示し、

グラフ 2) は N4 + H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (20 mM / l) + 4 - クロル - N - メチル - ベンズヒドロキサム酸 (1 mM / l) の場合を示し、

30

グラフ 3) は N4 + H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (20 mM / l) + 2 - ヒドロキシ - 3 - メチル - イソカルボステリル (1 mM / l) の場合を示し、

グラフ 4) は N4 + H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (20 mM / l) + 3, 4, 5 - トリメトキシ - N - メチル - ベンズヒドロキサム酸 (1 mM / l) の場合を示し、

グラフ 5) は N4 + H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (20 mM / l) + 3, 4 - ジメトキシ - N - メチル - ヒドロキサム酸 (1 mM / l) の場合を示す。

【0069】

図 6 は、肝細胞の低温損傷に対する新規な保存溶液の抑制効果を示すグラフである。培養したラットの肝細胞を本発明による溶液 [緩衝剤としての N - アセチルヒスチジンのほかに、トロロックス (1 mM / l) およびヒドロキサム酸誘導体であるベラトリル - N - メチルヒドロキサム酸 (0.5 mM / l) を含有する溶液] または比較のためのクレブス - ヘンセライト緩衝液 (KH) 中において、4 で 24 時間温置した。この低温での温置は好気性条件下でおこなった。24 時間後、再灌流の模擬実験のために、処理細胞を 37 の細胞培養培地中において再び温めた。細胞損傷の指標として、細胞質ゾルの乳酸デヒドロゲナーゼ (LDH) の遊離 (%) を用いた。

40

【0070】

実施例

以下、本明細書において権利請求される発明の保護範囲に包含される溶液例について説明する。

実施例 1 ~ 5

50

本発明に従って調製した臓器保護溶液の配合処方を以下の表 1 ~ 表 5 に示す。

【 0 0 7 1 】

【 表 1 】

	mmol/l
Na(+)	25
K(+)	15
Mg(++)	10
Ca(++)	0.1
Cl(-)	25
アスパラギン酸塩(-)	33
Ac-N-His	60
Ac-N-His(-)	60
リシン-H(+)	60
グリシン	10
トリプトファン	2
ベラトリル-N-メチルヒドロキサム酸	2
トロロックス	2
ケトグルタレート(-)	2
N-メチルサリチルヒドロキサム酸	2
pH	7.2
浸透圧モル濃度	310

10

20

【 0 0 7 2 】

【 表 2 】

	mmol/l
Na(+)	15
K(+)	10
Mg(++)	8
Ca(++)	0.015
Cl(-)	0.03
アスパラギン酸塩(-)	38
Ac-N-His	60
Ac-N-His(-)	60
リシン-H(+)	60
グリシン	10
トリプトファン	2
2,3-ジメトキシ-N-メチルベンズヒドロキサム酸	2
トロロックス	2
ケトグルタレート(-)	3
N-メチルサリチルヒドロキサム酸	2
マンニトール	30
pH	7.2
浸透圧モル濃度	310

10

20

【 0 0 7 3 】

【 表 3 】

	mmol/l
Na(+)	15
K(+)	10
Mg(++)	16
Ca(++)	0.04
Cl(-)	0.03
アスパラギン酸塩(-)	54
Ac-N-His	60
Ac-N-His(-)	60
リシン-H(+)	60
グリシン	6
トリプトファン	2
2,3-ジメトキシ-ベンズヒドロキサム酸	1
トロロックス-OCH <sub>3</sub>	2
ケトグルタレート(-)	3
2-ヒドロキシ-3-メチル-イソカルボストリリル	1
マンニトール	20
pH	7.2
浸透圧モル濃度	310

30

40

【 0 0 7 4 】

50

【表 4】

	mmol/l
Na(+)	15
K(+)	10
Mg(++)	8
Ca(++)	0.015
Cl(-)	0.03
アスパラギン酸塩(-)	31
Ac-N-His	70
Ac-N-His(-)	70
リシン-H(+)	70
グリシン	8
トリプトファン	2
2-ヒドロキシ-3-メチル-イソカルボストリリル	2
ケトグルタレート(-)	2
N-メチルサリチルヒドロキサム酸	2
マンニトール	20
pH	7.2
浸透圧モル濃度	310

10

20

【 0 0 7 5 】

【表 5】

	mmol/l
Na(+)	16
K(+)	10
Mg(++)	8
Ca(++)	0.05
Cl(-)	0.1
アスパラギン酸塩	16
N-Ac-His	80
ヒスチジン	88
L-アルギニン	12
グリシン	20
L-アラニン	10
トリプトファン	2
$\alpha$ -ケトグルタレート	3
マンニトール	40
3,4-ジメトキシ-N-メチル-ヒドロキサム酸	2
pH	7.1
浸透圧モル濃度	307

30

40

【 0 0 7 6 】

本発明による溶液は、臓器保護用溶液の機能性成分、即ち緩衝剤系、電解質、保護作用性物質およびオスモライトを用いて調製した。先ず第一に、緩衝剤を必要量の水の約 90%

50

に溶解させた。ついで、電解質として必要なカチオン、例えば、ナトリウム、カリウム、マグネシウムおよびカルシウムの中性塩を前述の生理学的に有意な濃度で添加し、攪拌下で溶解させた。次いで、該溶液に添加すべき保護作用性物質はその他の成分として加えた。溶液のpH値を調べ、必要に応じて、請求項1に記載の値に調整した。最後に所定量のオスモライトを添加し、得られた溶液を所定の体積まで希釈した後、適当な容器へ移し、殺菌処理に付した。

【0077】

環状ヒドロキサム酸、例えば、2-ヒドロキシピリジン-N-オキシドから誘導される化合物の調製法は、例えば、「オーガニック・シンセシス」、総集巻V、第623頁以降に記載されている。カルボン酸誘導体からのヒドロキサム酸の調製法は、フーベン・ヴェイル著、「メトーデン・デア・オーガニッシェン・ケミー」、第686頁以降に記載されている。この場合、溶剤としては、低級アルコール、DMF、またはTHF等が使用される。相当するカルボン酸との反応は、塩基性触媒（例えば、 $\text{NaOCH}_3$ 、 $\text{K}_2\text{CO}_3$ 、 $\text{CaO}$ 等）を用いておこなうことができる。さらに、環状ヒドロキサム酸の調製に関しては、次の文献を参照することができる：A.クレーマンおよびJ.エンジェル著、「薬学的作用物質」、第2版（1982年）、第206頁以降。

【図面の簡単な説明】

【図1】 肝臓の内皮細胞の低温損傷に対するサリチル-N-メチルヒドロキサム酸の抑制効果を示すグラフである。

【図2】 肝細胞の低温損傷に対する3,4-ジメトキシ-N-メチル-ベンズヒドロキサム酸の抑制効果を示すグラフである。

【図3】 ヒスチジン/ヒスチジン-HClおよびN-アセチルヒスチジンの中和曲線を示す。

【図4】 温暖条件下におけるヒスチジンの毒性に対する実例およびヒスチジン誘導体によるこの毒性の低減効果を示すグラフである。

【図5】 過酸化水素による肝細胞の細胞損傷および種々のヒドロキサム酸を用いる該細胞損傷の保護効果を示すグラフである。

【図6】 肝細胞の低温損傷に対する新規な保存溶液の抑制効果を示すグラフである。

【符号の説明】

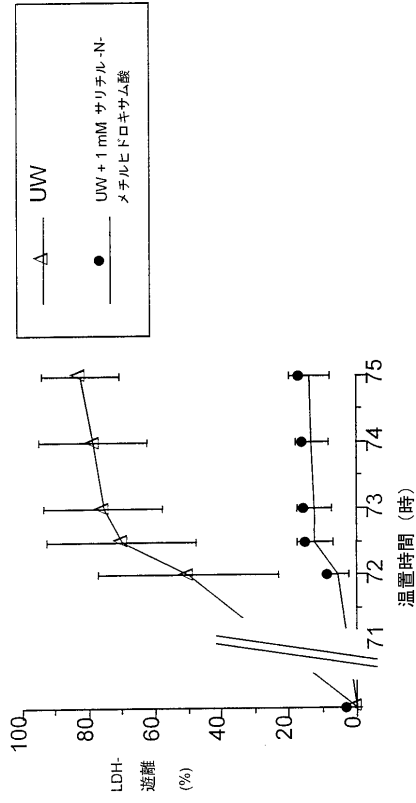
- 1) は  $\text{N}_4 + \text{H}_2\text{O}_2$  (20mM/l) の場合を示す。
- 2) は  $\text{N}_4 + \text{H}_2\text{O}_2$  (20mM/l) + 4-クロル-N-メチル-ベンズヒドロキサム酸 (1mM/l) の場合を示す。
- 3) は  $\text{N}_4 + \text{H}_2\text{O}_2$  (20mM/l) + 2-ヒドロキシ-3-メチル-イソカルボステリリル (1mM/l) の場合を示す。
- 4) は  $\text{N}_4 + \text{H}_2\text{O}_2$  (20mM/l) + 3,4,5-トリメトキシ-N-メチル-ベンズヒドロキサム酸 (1mM/l) の場合を示す。
- 5) は  $\text{N}_4 + \text{H}_2\text{O}_2$  (20mM/l) + 3,4-ジメトキシ-N-メチル-ヒドロキサム酸 (1mM/l) の場合を示す。

10

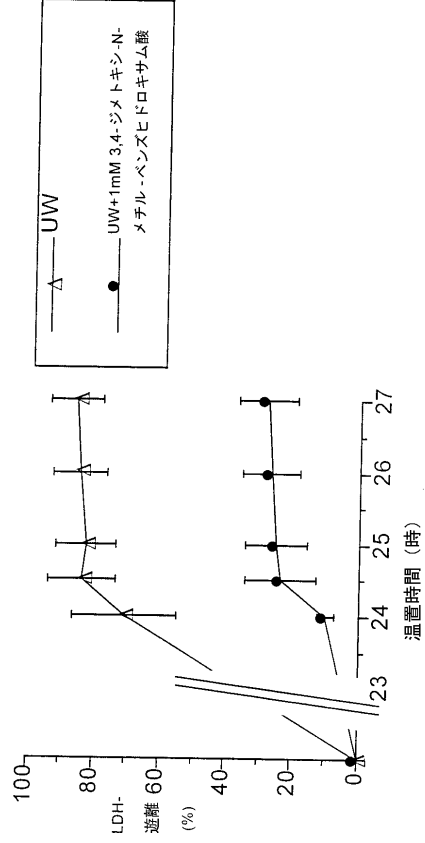
20

30

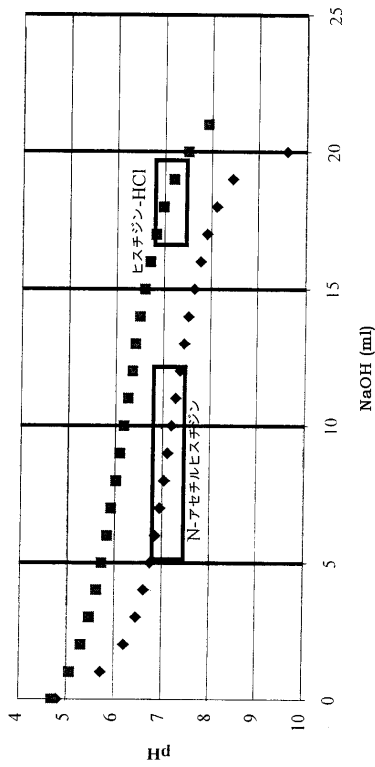
【図 1】



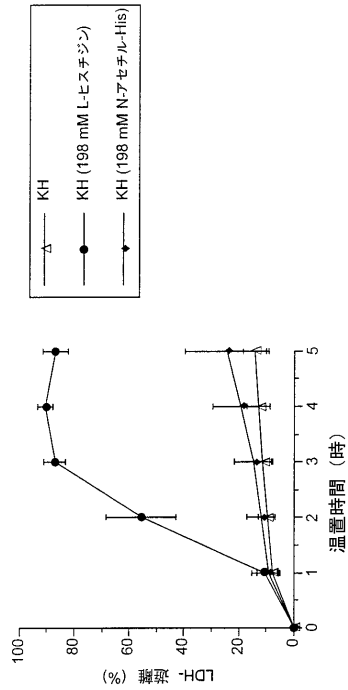
【図 2】



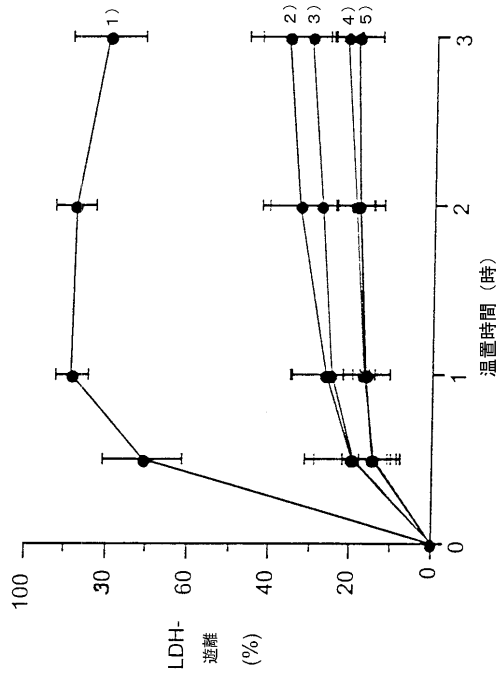
【図 3】



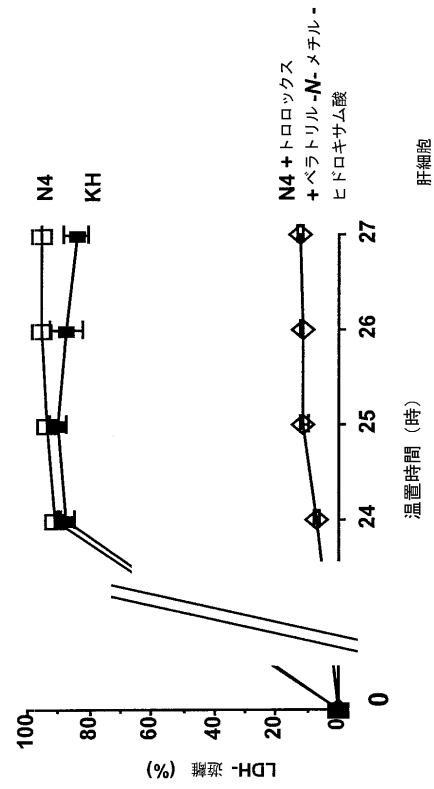
【図 4】



【 図 5 】



【 図 6 】



N4 + トロロックス  
+ ペラトリル-N-メチル-  
ヒドロキサム酸

肝細胞

フロントページの続き

(51)Int.Cl. F I  
A 6 1 P 39/06 (2006.01) A 6 1 P 39/06

- (72)発明者 ヴィルフリート・ブルンス  
ドイツ連邦共和国 6 8 6 4 7 ピブリス、ヴァッテンハイマー・シュトラッセ 3 6 番
- (72)発明者 ゲルノト・ケーラー  
ドイツ連邦共和国 6 4 6 6 5 アルスパッハ - ヘーンライン、ホーホシュトラッセ 1 4 番
- (72)発明者 ヘルベルト・デ・グロート  
ドイツ連邦共和国 4 0 5 9 1 デュッセルドルフ、オットー - ハーン - シュトラッセ 1 7 1 番
- (72)発明者 ウルズラ・ラウエン  
ドイツ連邦共和国 4 5 3 2 7 エッセン、ヴェッケンカンブ 1 0 番

審査官 太田 千香子

- (56)参考文献 特表平 0 6 - 5 0 4 9 8 8 ( J P , A )  
特開平 0 4 - 1 2 8 2 0 1 ( J P , A )  
特開平 0 3 - 2 9 4 2 0 1 ( J P , A )  
特開平 0 1 - 2 6 5 0 2 2 ( J P , A )  
特表平 1 1 - 5 1 4 3 2 6 ( J P , A )  
特開昭 5 8 - 1 2 1 2 1 3 ( J P , A )

(58)調査した分野(Int.Cl. , D B 名)  
A01N 1/02