

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公開特許公報(A)

(11) 特許出願公開番号

特開2007-295802

(P2007-295802A)

(43) 公開日 平成19年11月15日(2007. 11. 15)

(51) Int. Cl.		F I		テーマコード (参考)	
C 1 2 N	1/04	(2006.01)	C 1 2 N	1/04	4 B O 6 5
A O 1 N	1/02	(2006.01)	A O 1 N	1/02	4 H O 1 1
C 1 2 N	5/06	(2006.01)	C 1 2 N	5/00	E

審査請求 未請求 請求項の数 8 O L (全 18 頁)

(21) 出願番号	特願2004-216568 (P2004-216568)	(71) 出願人	503239039
(22) 出願日	平成16年7月23日 (2004. 7. 23)		メビックス株式会社
			東京都千代田区神田小川町 3-4 御茶ノ
			水三四ビル
		(74) 代理人	100088904
			弁理士 庄司 隆
		(74) 代理人	100124453
			弁理士 資延 由利子
		(74) 代理人	100129160
			弁理士 古館 久丹子
		(72) 発明者	林 同文
			東京都文京区本郷2丁目13-13 10
			O 1

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 微生物及び動物由来物の保存方法

(57) 【要約】

【課題】 本発明の課題は、微生物及び動物由来物の保存方法を提供することである。

【解決手段】 微生物又は動物由来物を、静電場雰囲気内に置いて保存することによる。静電場雰囲気は、100V～5000Vの交流又は直流電圧を電極に印加して形成される。静電場雰囲気での保存温度は、-20～40℃であり、静電場雰囲気でなければ微生物やヒトを含む動物由来物が凍結しうる-12～-1℃でも凍結させることなく保存することができる。器官、臓器、組織、細胞、血液製剤、精製蛋白質、組換え蛋白質、培養細胞、培養組織等の保存に有用であり、特に移植領域、再生医療領域、基礎研究領域、遺伝子治療領域、臨床検査領域、製薬・試薬領域等に利用することができる。

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

微生物又は動物由来物を、静電場雰囲気内におくことを特徴とする微生物又は動物由来物の保存方法。

【請求項 2】

静電場雰囲気が、100V～5000Vの交流又は直流電圧を電極に印加して形成される請求項 1 に記載の保存方法。

【請求項 3】

微生物又は動物由来物を、 -20°C ～ 40°C で静電場雰囲気内におくことを特徴とする請求項 1 又は 2 に記載の保存方法。

【請求項 4】

微生物又は動物由来物が、保存液中に浸漬状態である請求項 1～3 の何れか一に記載の保存方法。

【請求項 5】

微生物又は動物由来物が、静電場雰囲気中にそのまま存置される請求項 1～3 の何れか一に記載の保存方法。

【請求項 6】

微生物又は動物由来物が以下から選択される何れかである請求項 1～5 の何れか一に記載の保存方法；

臓器・組織、気管、生物由来製剤、培養細胞・培養組織、遺伝子、核酸、ウイルス、細菌、真菌、精製蛋白質、遺伝子組換え蛋白質、臨床検査用検体、研究用検体。

【請求項 7】

臓器・組織が腸管、肝臓、脾臓又は膵臓の何れかである請求項 6 に記載の保存方法。

【請求項 8】

培養細胞が、接着性細胞又は浮遊細胞である請求項 6 に記載の保存方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、微生物及び動物由来物の新規な保存方法に関する。さらに詳しくは、微生物及び動物由来物を静電場雰囲気内におくことを特徴とする保存方法に関する。

【背景技術】

【0002】

脳死ドナーからの肝移植は末期肝疾患に対する治療法として確立され、欧米ではすでに年間8,000例以上行なわれている。わが国でもようやく1997年に臓器移植法が施行されたが、6年を経過した2003年10月現在、脳死者からの肝提供による肝移植はわずか23例に過ぎない。一方、我が国では身内又は配偶者から肝提供をうける生体部分肝移植が1989年に初めて施行されて以来、現在までに2300例以上が実施され、生体肝移植はいまや日常の診療となりつつある。

【0003】

ドナー手術と同時進行可能で、最短の冷保存が可能な生体肝移植と異なり、脳死肝移植の場合、長時間の冷保存（ $0\sim 4^{\circ}\text{C}$ ）が不可避である。1980年代後半にUniversity of Wisconsin (UW) 液が開発され、冷保存時間の限界が従来の7～8時間より24時間に大幅に延長し、肝移植は緊急手術より準緊急・待機手術へと変貌を遂げた。しかし現在でも5～10%の症例に移植後グラフト機能不全がみられ、実際には16時間を超える保存ではグラフト機能不全が起こる確率が非常に高くなる。また心臓・肺移植では保存の限界はいまだに6～7時間であり緊急手術の域を出ていないのが現状である。そこで保存時間のさらなる延長が可能であれば、その各種臓器移植に及ぼす世界的な影響ははかりしれないほど大きいと考えられる。

【0004】

臓器保存の温度に注目すれば従来の冷保存温度である 4°C では代謝は $1/10$ になり、

10

20

30

40

50

−4℃では1/17になることが知られ、氷点下非凍結保存の有用性が示唆されていた。従来、非凍結剤を用いた実験が行われてきたが、氷点下非凍結保存は可能であるものの、非凍結剤によるグラフト障害が避けられなかった。

【0005】

移植技術の発達により、移植対象動物の組織等の保存方法の改良は種々検討されている。組織を凍結させない条件での保存は、組織がより自然に近い状態にあるため好ましい保存方法である。たとえば、グルコースを含む第一液で血管内の血液を排除かつ置換し、ジメチルスルフォキシド又はグリセリンとマンニットを含む第二液で第一液を置換した後、凍結させずに0℃ないし20℃で保存する方法が開示されている（特許文献1）。あるいは非還元二糖と充填剤との保存剤の組み合わせによる生存微生物、細胞、又は組織の保存方法の提案もある（特許文献2）。しかし、いずれの保存方法も、安定剤の添加や複雑な処理が必要であり、早期の改良が望まれている。

【0006】

食品等を、静電場雰囲気を利用して過冷却状態において保存するための装置は、開示されている（特許文献3～7）。しかし、それらはいずれも食品の分野でのみ利用されていたにすぎない。

【0007】

【特許文献1】特開平8-325101号公報

【特許文献2】特表2003-505024号公報

【特許文献3】特開平10-136882号公報

【特許文献4】特開平11-332464号公報

【特許文献5】特開2000-297976号公報

【特許文献6】特開2001-241824号公報

【特許文献7】国際公開WO98/41115号公報

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0008】

微生物及び動物由来物の新規な保存方法の提供が、本発明の課題である。

【課題を解決するための手段】

【0009】

上記課題を解決するために鋭意検討した結果、本発明者らは、微生物又は動物由来物を静電場雰囲気内におくことで微生物及び動物由来物をより自然な形で保存しうることを見出し、本発明を完成した。

つまり本発明は以下からなる。

1. 微生物又は動物由来物を、静電場雰囲気内におくことを特徴とする微生物又は動物由来物の保存方法。
2. 静電場雰囲気が、100V～5000Vの交流又は直流電圧を電極に印加して形成される前項1に記載の保存方法。
3. 微生物又は動物由来物を、−20℃～40℃で静電場雰囲気内におくことを特徴とする前項1又は2に記載の保存方法。
4. 微生物又は動物由来物が、保存液中に浸漬状態である前項1～3の何れか一に記載の保存方法。
5. 微生物又は動物由来物が、静電場雰囲気中にそのまま存置される前項1～3の何れか一に記載の保存方法。
6. 微生物又は動物由来物が以下から選択される何れかである前項1～5の何れか一に記載の保存方法；
臓器・組織、気管、生物由来製剤、培養細胞・培養組織、遺伝子、核酸、ウイルス、細菌、真菌、精製蛋白質、遺伝子組換え蛋白質、臨床検査用検体、研究用検体。
7. 臓器・組織が腸管、肝臓、脾臓又は膵臓の何れかである前項6に記載の保存方法。
8. 培養細胞が、接着性細胞又は浮遊細胞である前項6に記載の保存方法。

【発明の効果】

【0010】

臓器保存においては、氷点下非凍結保存により代謝が抑制されること、抗酸化作用により再灌流時の酸化ストレスを抑制し、虚血再灌流障害を軽減する可能性がある。臓器を静電場雰囲気におき、微振動のエネルギーを与えることで、通常では凍結してしまう温度、例えば -5°C 程度であっても、器官や臓器等が凍結するのを防ぎ、損傷することなく長期保存することが可能となる。

【0011】

静電場雰囲気内で器官や臓器等を保存する本発明の保存方法により、組織等を損傷することなく長期保存することが可能となる。すなわち、本発明の方法では微生物又は動物由来物を長期間、自然に近い状態で、微生物又は動物由来物が有する活性を不活化若しくは不活性化させることなく、又は死滅化させることなく保存することができる。

【発明を実施するための最良の形態】

【0012】

本発明の静電場雰囲気は、例えば閉鎖系又は開放系の容器内を静電場状態にすることにより得られる。静電場雰囲気とするために、種々の手段が公知であるが、例えば容器内の底部に単に電極板を絶縁状態で載置することで達成される。また、通常の家用品又は業務用の冷蔵庫を簡便に静電場冷蔵庫に変換することができる。例えば絶縁材料（塩ビ板）からなる横板と、この横板の両側にヒンジを介して組立て自在とされた側板と、電場箱の底部を閉塞する底板から形成される。そして、その前面と上面は開放されて冷蔵庫の扉を開いたときに対象物の出入が容易に行い得る。接続線、高電圧発生装置で、高電圧がいずれかの金属棒等に印加され、静電場雰囲気が形成される。

【0013】

本発明の微生物又は動物由来細胞の保存方法に使用することができる保存装置として、具体的には、静電場雰囲気を形成させるための電極を備えた容器と、該電極に交流又は直流電圧を印加する静電場発生用電源と、上記容器に、例えば動物の臓器を冷蔵温度に保持できる冷却装置とを備えた装置を例示することができる。

【0014】

更に、冷蔵室内の空気を帯電させるためには、導電性カーテンを設けてもよく、このカーテンは柔軟な布、プラスチック等の表面に導電性塗料を付着せしめたり、カーテン自体を薄いアルミ板等にするにより形成してもよい。そして、カーテンは、レール等を介して高電圧発生装置に接続される。

【0015】

本発明の静電場雰囲気は、 $100\text{V}\sim 5000\text{V}$ 、好ましくは $100\text{V}\sim 3000\text{V}$ の交流又は直流電圧を電極に印加して形成される。印加する電圧は、保存対象物やその保存状態により適宜選択することができる。特に、保存液中で保存する場合や保存容器の材質により、印加する電圧を選択することができる。電流は交流、直流のいずれであってもよい。

【0016】

本発明の静電場雰囲気内におく保存方法に適用されうる温度は、 $-20\sim 40^{\circ}\text{C}$ 、好ましくは $-20\sim 5^{\circ}\text{C}$ 、より好ましくは $-12\sim -1^{\circ}\text{C}$ 、さらに好ましくは $-5\sim -1^{\circ}\text{C}$ である。保存する温度は、保存対象物やその保存状態により適宜選択することができる。特に例えば 0°C 以下であっても、過冷却現象により、保存対象物を凍結させることなく保存することができる。ここに過冷却現象とは、液体が凍り始める寸前の温度である氷結点を下回る温度であっても物質が凍らない現象をいう。氷結点を下回る温度の場合でも、本発明の静電場雰囲気下では、物質へ温度を伝えと同時に微振動エネルギーが起これ、水溶液は凍結せず、微生物及び動物由来物の凍結もおこらないと考えられる。

【0017】

微生物又は動物由来物が保存液中に浸漬状態であるとは、微生物及び動物由来物が金属やプラスチック等の容器内の保存液中に浸っている状態をいい、一般的に公知のあらゆる

細胞等の保存液や今後開発される保存液を利用することができる。保存液の代表的なものとして、例えば今日の移植(Vol.11, No.5, September p.549-557(1998))に例示されるリンゲル液、ユーロコリンズ溶液、UW溶液、SLS溶液、H-L溶液、HTK溶液等や、市販品、例えばラクテック(大塚製薬製)が挙げられる。

【0018】

微生物又は動物由来物が、静電場雰囲気内にそのまま存置されるとは、微生物又は動物由来物が、水溶液中におかれることなくそのまま静電場雰囲気内におかれることをいい、物質そのものが金属やプラスチック等の容器内に収納されて保存されていても良い。例えば、微生物を静電場雰囲気内にそのまま存置すると、過冷却現象により仮死状態とすることができ、精製蛋白質であれば、そのまま安定に不活化の心配なく長期保存することが可能である。また、採血した血液の由来物を、CPD液(クエン酸ナトリウム、クエン酸、グルコース、 $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ を含む)やMAP液(マンニトール、アデニン、リン酸を含む)等を含むプラスチック(pp)製の採血用バッグに入れて、静電場雰囲気内にそのまま存置すると、例えば0℃以上でも安定に保存することができる。

10

【0019】

かくして、本発明の方法は、移植領域での臓器・組織保存、生物由来製剤領域での成分保存、血漿分画製剤の保存、再生医療領域での細胞・組織保存、基礎実験領域での各種培養細胞保存、遺伝子治療領域での遺伝子及び薬剤を導入したベクターの保存、臨床検査領域での検体保存、製薬・試薬領域での精製蛋白質保存等の領域で利用することができる。

【0020】

本発明の保存方法が適用される微生物及び動物由来物は、細菌、真菌類、ウイルス等の微生物、ヒト及びヒト以外の動物由来の物質を含むことを意味する。例えば移植領域での臓器・組織では、心臓、肺、肝臓、腎臓、膵臓、脾臓、腸管、小腸、心臓弁、皮膚、血管、角膜、眼球、硬膜、骨、気管、耳小骨等が挙げられる。生物由来製剤領域での成分では、血液や尿成分由来の精製蛋白質、例えば血液凝固因子、抗凝固因子、トロンビン、ウロキナーゼ、ウリナスタチン、プラセンタやこれらの遺伝子組換え蛋白質、その他ゼラチン、ヘパリン、コンドロイチン、ヒアルロン酸等が挙げられる。再生医療領域での細胞・組織では、造血幹細胞、ES細胞(胚性幹細胞)、骨髄、各種因子等が挙げられる。臨床検査領域での検体では、生化学検体、内分泌検体、ウイルス検体、細菌検体、真菌検体、免疫血清検体、細胞性免疫検体、遺伝子、染色体検体、染色体検体、血液学検体、微生物検体、病理学検体等が挙げられる。遺伝子治療領域では遺伝子及び薬剤を導入したベクターを含む微生物が挙げられる。さらに、基礎実験領域では、各種臓器や摘出生体試料および検体、各種培養細胞では、血管内皮細胞、血管平滑筋細胞、血液幹細胞などの培養系細胞および再生医療用各種細胞等を挙げられ、また各種アッセイ等にも利用可能な細胞にも適用することができる。例えば、市販の株化細胞や、生体から取得した細胞等が挙げられ、特に浮遊細胞の保存には好適に適用することができる。また抗体など凍結保存が不適切な蛋白質全般に適用することが出来る。

20

30

【実施例】

【0021】

以下に実施例で本発明を説明するが、これらは本発明の典型的代表例を示すものであって、本発明はこれらに限定されるものではない。

40

【0022】

(実施例1) 腎臓

1) 腎臓の摘出及び保存

ラット成獣を麻酔し、四肢を18G針で固定し、ラットの胸から腹にかけて開腹した。横隔膜直下で大動脈をクランプし、下大静脈・肝静脈を併せクランプし、その遠位部を開窓し、紙ワイパーを挿入した。該ラットの左腎静脈の背側に大動脈を同定し、ラクテック(大塚製薬製)5mLで腎臓をゆっくり灌流した。

該ラットの左右の腎臓を摘出し、ラクテック(大塚製薬製)を含むデッシュに置いた。腎臓片に注射針を用いて4mLの保存液を注入し、各保存条件で保存した。

50

2) 腎臓の保存

1回目：4℃で電圧を印加しない非電場雰囲気内及び-5℃で500V、1000Vの各電圧を印加した静電場雰囲気内で、28時間保存した。

2回目：0℃での非電場雰囲気内及び-3℃で100Vの電圧を印加した静電場雰囲気内で、各々28.5時間及び67時間保存した。

3) 結果

上記保存条件下で保存したときの液中に漏出した乳酸脱水素酵素 (l-lactate dehydrogenase、以下「LDH」) を測定した。さらに、2回目には腎臓組織切片を染色し、光学顕微鏡にて観察した。

その結果を表1及び表2に示した。個体差は認められたものの、4℃又は0℃での非電場雰囲気内よりも、-5℃又は-3℃での静電場雰囲気内で保存したときの方が保存溶液に漏出したLDHの値は低値であり、良好な結果を示した。また、2回目の28.5時間保存後の組織片は、非電場雰囲気内では変性所見が観察されたが、静電場雰囲気内で保存したときは明らかな変性は観察されなかった。

【表1】

腎臓1回目

No.	時間(hr)	温度(℃)	電圧(V)	重量(g)	液量(ml)	LDH(IU/l)	備考
1-1	28	4	0	1.52	4	982	
1-2				1.60	4	1658	
2-1	28	-5	500	1.46			液漏れ・凍結
2-2				1.60	4	90	
3-1	28	-5	1000	1.52	4	400	
3-2				1.28	4	100	

【表2】

腎臓2回目

No.	時間(hr)	温度(℃)	電圧(V)	重量(g)	液量(ml)	LDH(IU/l)
A-1	28.5	0	0	1.87	4	343
A-2				1.81	4	229
B-1	28.5	-3	100	1.65	4	183
B-2				1.56	4	221
C-1	67	0	0	1.40	4	638
C-2				1.51	4	1006
D-1	67	-3	100	1.34	4	480
D-2				1.41	4	700

【0023】

(実施例2) 肝臓

1) 肝臓の摘出

ラット成獣を麻酔し、四肢を18G針で固定し、ラットの胸から腹にかけて開腹した。門脈からUW液(今日の移植: Vol.11, No.5, September p.549-557(1998)) 4mLをゆっくり注入し、肝臓を灌流・摘出し、UW液を含むデッシュに置き、臓器保存した。摘出した肝臓片に注射針を用いて10mLの保存液を注入し、各保存条件で冷蔵した。

2) 肝臓の保存

4℃での非電場雰囲気内及び-5℃で500V、1000Vの各電圧を印加した静電場雰囲気内で、肝臓を4時間保存した。

3) 結果

各条件下で保存したときの保存液内に漏出したグルタミン酸－オキサロ酢酸トランスアミナーゼ（glutamic-oxaloacetic transaminase、以下「GOT」）、グルタミン酸－ピルビン酸トランスアミナーゼ（glutamic-pyruvic transaminase、以下「GPT」）、LDHの測定結果を表3に示した。その結果、500Vの電圧を印加した静電場雰囲気内で保存したときに最も良好な結果が得られた。

【表3】

肝臓

No.	時間(hr)	温度(℃)	電圧(V)	重量(g)	液量(ml)	GOT(IU/l)	GPT(IU/l)	LDH(IU/l)
1	4	4	0	16.50	10	142	83	1744
2	4	-5	500	16.45	10	79	31	1352
3	4	-5	1000	16.68	10	106	80	1313

10

【0024】

(実施例3) 心臓

1) 心臓の摘出及び保存

ラット成獣を麻酔し、四肢を18G針で固定し、ラットの胸から腹にかけて開胸した。心臓を大血管と共に速やかに摘出し、ラクテック（大塚製薬製）を含むデッシュ（6cm）に置き、臓器保存した。

自律心拍により、保存した心臓の心腔内はラクテック（大塚製薬製）に置換された。

心臓片に注射針を用いて4mLの保存液を注入し、各保存条件で冷蔵した。

20

2) 心臓の保存

4℃での非電場雰囲気内及び-5℃で500V、1000Vの各電圧を印加した静電場雰囲気内で、心臓を4時間保存したときの保存液内のGOT、GPT、LDHを測定した。また、組織切片を染色し、光学顕微鏡にて観察した。

3) 結果

各条件下で保存したときの保存液内に漏出したクレアチンキナーゼ(creatine kinase、以下「CK」)、GOT、及びLDHの測定結果を表4に示した。その結果、非電場雰囲気内よりも静電場雰囲気内で保存した方が、保存溶液に漏出したCK、GOT、及びLDHの値は低値であり、良好な結果を示した。心筋組織は、各条件において細胞質及び核ともに明らかな変化は認められず、良好であった。

30

【表4】

心臓

No.	時間(hr)	温度(℃)	電圧(V)	重量(g)	液量(ml)	CK(IU/l)	GOT(IU/l)	LDH(IU/l)
1	4	4	0	1.54	4	2498	248	766
2	4	-5	500	1.60	4	817	60	213
3	4	-5	1000	1.57	4	858	48	259

【0025】

(実施例4) 心臓片

40

1) 心臓の摘出及び保存

ラット雄成獣をエーテル麻酔し、四肢を18G針で固定し、腹から頸にかけて左右に開腹した。肝臓の上縁を横隔膜から切離し横隔膜を穿孔して開胸した。横隔膜前縁を左右に開腹した後、胸骨に沿って両側の肋骨を切断した。下行大動脈をクランプし、臓器心筋保護液ラクテックG（大塚製薬製）を5mL注入し、下行大動脈近位部に心筋保護液ミオテクター（日清製油製）を3mL注入し、心臓を摘出し、ミオテクターを含むデッシュに置き、臓器保存した。

2) 心臓の保存

18G針で4mLの心筋保護液を心臓に注入し、軽く揺らした後、2℃での非電場雰囲気内及び100V、500Vの各電圧を印加した静電場雰囲気内で保存した。

50

3) 結果

各条件下で保存したときの心筋保護液内に漏出したクレアチンホスホキナーゼ (creatin phospho kinase、以下「CPK」)、GOT、LDHの測定結果を表5に示した。対照として保存1時間後についても測定した。24時間保存後、非電場雰囲気内に比べて電圧を静電場雰囲気内で保存した方がCPK、GOT及びLDHの漏出が低く抑えられる傾向が認められた。

【表5】

心	保存時間 (hr)	保存温度 (°C)	V	g	ml	CPK	GOT	LDH
対照	1	0	0	1.38	4	563	82	464
A	24	2	0	1.53	4	470	339	1312
	24	2	100	1.38	4	429	231	1123
	24	2	500	1.34	4	293	278	969

10

【0026】

(実施例5) 肝臓

1) 肝臓の摘出及び保存

実施例4で心臓が摘出された後のラットの下大動脈のクランプをはずし、門脈のなるべく遠位から臓器保存液ビアスパン(藤沢薬品工業製)4mLをゆっくり注入し、肝臓を摘出し、ビアスパンを加えたデッシュに置き、臓器保存した。

20

2) 肝臓の保存

18G針で10mLの保存液を肝臓に注入し、軽く揺らした後、2°Cでの非電場雰囲気内及び100V、500Vの各電圧を印加した静電場雰囲気内で保存した。

3) 結果

各条件下で保存したときの保存液内に漏出したGOT、GPT、LDH、γGPT、アルカリホスファターゼ(alkaline phosphatase、以下「ALP」)の測定結果を表6に示した。保存1時間後の測定値を対照とした。その結果、24時間保存後では対照に比べてGOT、GPT、LDH及びALPは増加の傾向が認められたが、静電場雰囲気内で保存したほうが、GOT、GPT及びLDHの漏出が低く抑えられる傾向が認められた。

30

【表6】

肝	保存時間 (hr)	保存温度 (°C)	V	g	ml	GOT	GPT	LDH	γ-GPT	ALP	Bil
対照	1	0	0	13.42	10	138	71	2293	<2	9	0
A	24	2	0	13.74	10	537	404	8124	<2	60	0
	24	2	100	11.35	10	159	238	2951	<2	39	0
	24	2	500	12.67	10	189	85	2140	<2	32	0
B	24	2	0	13.13	10	1034	798	15430	<2	25	0
	24	2	100	11.81	10	448	274	7075	<2	23	0
	24	2	500	11.77	10	567	376	9384	<2	33	0

40

【0027】

(実施例6) 心臓片

1) 心臓の摘出及び保存

ラット雄成獣をエーテル麻酔し、四肢を18G針で固定し、腹から頸にかけて皮切を置いて左右に開腹した。肝臓の上縁を横隔膜から切離し横隔膜を穿孔して開胸した。横隔膜前縁を左右に開腹した後、下行大動脈をクランプし、臓器保存液ラクテックG(大塚製薬

50

製)を5 mL注入し、下行大動脈近位部に心筋保護液ミオテクター(日清製油製)を3 mL注入し、心臓を摘出し、ミオテクターを含むデッシュに置き、臓器保存した。

2) 心臓の保存

18 G針で4 mLの保存液を心臓に注入し、軽く揺らした後、0℃での非電場雰囲気内及び100 V、500 Vの各電圧を印加した静電場雰囲気内で心臓を保存した。

3) 結果

各条件下で保存したときの保存液内に漏出したCPKの測定結果を表7に示した。保存開始30分後の測定値を対照とした。その結果、4時間後では、対照に比べてCPK値はほとんど増加しなかった。24時間保存後では、非電場雰囲気内ではCPK値が増加していたが、静電場雰囲気内では低く抑えられる傾向が認められた。

10

【表7】

心臓	保存時間 (hr)	保存温度 (℃)	V	g	ml	CPK
対照	0.5	0	0	1.73	4	717
			0	1.27	4	829
			0	1.68	4	791
			0	1.56	4	825
A	4	0	0	1.73	4	670
			500	1.27	4	642
B	24	0	0	1.68	4	1655
			500	1.56	4	1265
C	24	0	0	1.59	4	2322
			100	1.48	4	976
D	24	0	0	1.51	4	2009
			100	1.74	4	904

20

30

【0028】

(実施例7) 肝臓

1) 肝臓の摘出及び保存

実施例6で心臓が摘出された後のラット下大動脈のクランプをはずし、門脈のなるべく遠位から臓器保存液ビアスパン(藤沢薬品工業製)4 mLをゆっくり注入し、肝臓を摘出し、ビアスパンを加えたデッシュに置き、臓器保存した。

2) 肝臓の保存

18 G針で10 mLの保存液を肝臓に注入し、軽く揺らした後、0℃での非電場雰囲気内及び100 V、500 Vの各電圧を印加した静電場雰囲気内で保存した。

40

3) 結果

各条件下で保存したときの保存液内に漏出したGOT, GPT, LDH, γGPT, ALPの測定結果を表8に示した。対照として、保存30分後についても測定した。その結果、肝臓保存後24時間ではGOT, GPT, LDH及びALPは増加の傾向が認められたが、静電場雰囲気内で保存した方が各物質の漏出が低く抑えられる傾向が認められた。

【表 8】

肝	保存時間 (hr)	保存温度 (℃)	V	g	ml	GOT	GPT	LDH	ALP
対照	0.5	0	0	14.23	10	38	35	378	4
			0	11.78	10	34	18	300	5
			0	12.62	10	41	84	1108	3
A	4	0	0	14.23	10	146	124	1452	15
			500	11.78	10	52	24	502	8
B	24	0	0	13.90	10	581	257	6417	41
			100	12.25	10	279	183	2622	15

10

【0029】

(実施例 8) 腎臓

1) 肝臓の摘出及び保存

実施例 7 で肝臓が摘出された後のラットから左右の腎臓を順次摘出し、ラクテック（大塚製薬製）を加えたデッシュに置き、臓器保存した。

2) 腎臓の保存

18G 針で 4 mL の保存液を腎臓に注入し、軽く揺らした後、0℃での非電場雰囲気内及び 100V、500V の各電圧を印加した静電場雰囲気内で保存した。

20

3) 結果

各条件下で保存したときの保存液内に漏出した GOT 及び LDH の測定結果を表 9 に示した。対照として、保存 30 分後についても測定した。その結果、23 時間及び 69 時間保存後では GOT 及び LDH の測定値が増加の傾向が認められたが、静電場雰囲気内で保存した方が各物質の漏出が低く抑えられる傾向が認められた。

【表 9】

腎	保存時間 (hr)	保存温度 (℃)	V	g	ml	GOT	LDH
対照	0.5	室温	0	1.66	4	<4	<24
				1.50	4	<4	<24
				1.65	4	<4	<24
				1.51	4	<4	<24
				1.81	4	<4	<24
				1.55	4	26	27
				1.46	4	10	38
				1.63	4	<4	69
A-1	23	0	0	1.66	4	14	402
			500	1.65	4	6	111
A-2	23	0	0	1.50	4	8	165
			500	1.51	4	<4	50
B-1	69	0	0	1.42	4	69	1333
			100	1.49	4	52	557
B-2	69	0	0	1.42	4	73	1355
			100	1.35	4	31	504

30

40

【0030】

50

(実施例 9) 心臓

1) 心臓の摘出

ラット雄成獣をエーテル麻酔し、四肢を 18 G 針で固定し、腹から頸にかけて皮切をおいて左右に開腹した。肝臓の上縁を横隔膜から切離し横隔膜を穿孔して開胸した。横隔膜前縁を左右に開腹した後、下行大動脈をクランプし、臓器保存液ラクテック G (大塚製薬製) を 5 mL 注入し、下行大動脈近位部に心筋保護液ミオテクター (日清製油製) を 3 mL 注入し、心臓を摘出し、ミオテクターを含むデッシュに置いた。

2) 心臓の保存

18 G 針で 4 mL の保存液を心臓に注入し、軽く揺らした後、0 °C での非電場雰囲気内及び 100 V、500 V の各電圧を印加した静電場雰囲気内で心臓を保存した。

10

【0031】

3) CK-MB の測定

免疫阻止-UV 法により測定した。上記の保存条件下にて心臓を保存したときの保存液中の CK-M サブユニットのみを特異的に阻害する抗体を用い、CK-B サブユニットの活性を測定し、その値を 2 倍することにより、CK-MB の活性を求めた。

4) トロポニン T の測定

免疫化学発光免疫測定法 (ECLIA) により測定した。本法は電気化学発光反応を用いたステップサンドイッチ法である。検体内のトロポニン T とビオチン化抗トロポニン T 抗体をよび $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$ 標識抗トロポニン T 抗体を反応させ、標識抗体-トロポニン T-ビオチン化抗体複合物を生成させた。次にストレプトアビジン (SA) をコーティングした磁性マイクロパーティクル (MP) を加えてアビジン-ビオチン反応をさせた。反応終了後、混合溶液を測定セル内に吸引し、電極の磁力により磁性マイクロパーティクルを電極に引き付け、電気供与物質である、トリプロアミン (TPA) にて B/F 分離を行い、電極による酸化反応と TPA ラジカルの還元作用により生じる Ru^{2+} 錯体からの発光量を測定し、トロポニン T 量を測定した。

20

【0032】

5) 結果

各条件下で保存したときの保存液内に漏出した CK-MB の測定結果を図 1 に、心筋トロポニンの測定結果を図 2 に示した。保存開始 30 分後の測定値を対照とした。その結果、24 時間保存後では静電場雰囲気内で保存した方が、CK-MB 及び心筋トロポニンの測定値が低く抑えられ、印加電圧が 100 V よりも 500 V の方が良好な結果を示した。

30

【0033】

(実施例 10) 腸管の顕微鏡組織

雄性日本白色家兎を過量のネンブタール静脈内投与後、腸管の一部を切離した。1 cm 角に細切後、生理食塩水に浸し、4 °C での非電場雰囲気内及び -5 °C で 3000 V の電圧を印加する静電場雰囲気内で 24、48 及び 96 時間保存し、その後 10 % 緩衝ホルマリンで 24 時間固定した。通常のパラフィン切片/ヘマトキリン・エオジン染色を行い、光学顕微鏡で観察した。切離直後に固定したものを対照とした。

その結果を図 3 に示した。

【0034】

40

(実施例 11) 肝臓の顕微鏡組織

雄性日本白色家兎を過量のネンブタール静脈内投与後、肝臓の一部を切離した。切離した臓器を実施例 10 と同様に細切し、同様に保存、固定、光学顕微鏡で観察した。

その結果を図 4 に示した。

【0035】

(実施例 12) 脾臓の顕微鏡組織

雄性日本白色家兎を過量のネンブタール静脈内投与後、脾臓の一部を切離した。切離した臓器を実施例 10 と同様に細切し、同様に保存、固定、光学顕微鏡で観察した。

その結果を図 5 に示した。

【0036】

50

（実施例 13）脾臓の顕微鏡組織

雄性日本白色家兎を過量のネンブタール静脈内投与後、脾臓の一部を切離した。切離した臓器を実施例 10 と同様に細切し、同様に保存、固定、光学顕微鏡で観察した。

その結果を図 6 に示した。

【0037】

（実施例 14）組織からの培養細胞採取に対する影響

家兎大動脈からのエキスプラント(explant)法による血管平滑筋細胞の採取率を検討した。雄性日本白色家兎を過量のネンブタール静脈内投与後、胸部大動脈を無菌手金に切離し、4℃での非電場雰囲気内及び-5℃で3000Vの電圧を印加する静電場雰囲気内で、0、24及び48時間保存後、37℃、1時間安定化した後、内細胞を擦過除去し、外膜を鋭的に切除した。残った中膜を3mm四方に細切(explant)後、直径60mmの培養皿1枚に10細切片を固着させ、37℃、5%CO₂/95%空気環境下で培養し、2～7日後に細切片により細胞が遊走・増殖する率を算定した。

【表 10】

保存時間	0時間	24時間	48時間
対照	9/9		
4℃		8/10 (80%)	4/10 (40%)
凍結 (-20℃)		6/8 (75%)	3/10 (30%)
NTP (5℃、3000V)		10/10 (100%)	8/9 (89%)

【0038】

その結果を表 10 に示した。表に示すごとく、4℃及び-20℃保存では、時間の経過とともに、血管平滑筋細胞回収率（細胞増殖率）が下がるのに対し、印加条件（-5℃、3000V）下では、48時間保存保存においても高い回収率が得られた。

【0039】

（実施例 15）培養細胞の生存率に対する影響

培養細胞の生存率に対する影響を検討した。培養細胞は、ヒト単球系白血病細胞（U937）を用いた。96ウェルの細胞培養プレートに、2, 1, 0.5, 0.25及び0.125×10⁶細胞/mlを100μ/ウェルずつ播種し、37℃、5%CO₂/95%空気環境下で1時間、安定化させ、その後4℃での非電場雰囲気内及び-5℃で3000Vの電圧を印加する静電場雰囲気内で、0、6、12、24及び48時間保存した。その後、再度37℃、5%CO₂/95%空気環境下で1時間培養後、テトラカラーワン（TetraColor One（生化学社））によるカラーメトリック（Colorimetric）アッセイ（3時間インキュベーション）にて生細胞数を計測した。実験は、3連ずつ2回行った。

【0040】

その結果を、図 7 及び図 8 に示した。両保存条件で、12時間までは両者に殆ど差異は認められなかったが、24時間保存では、非電場雰囲気内で保存した細胞は殆ど死滅するのに対し（図 7）、静電場雰囲気内で保存した場合は、24時間まで生細胞を維持することができた（図 8）。細胞密度に違いによる蛍光の差は認められなかった。

【産業上の利用可能性】

【0041】

以上説明したように、本発明の静電場雰囲気内では、0℃以下であっても微生物又は動物由来物、例えば、器官や臓器等を凍結させることなく保存することができ、0℃以上の場合であっても血液等について良好な状態で保存することができた。つまり、本発明の保

存方法を適用することで、従来よりも長期間、微生物又は動物由来物を自然に近い状態で保存することが可能となる。

また、培養細胞は4℃の非電場雰囲気内では24時間生細胞の状態で保存することは困難であったが、-5℃の静電場雰囲気内で保存すると細胞が増殖することなく24時間保存することができる。静電場雰囲気内であれば、細胞を増殖させず安定な条件で輸送することが可能となり、便利である。

このことより、本発明の保存方法は、特に移植領域、輸血領域、再生医療領域、基礎実験領域、遺伝子治療領域、臨床検査領域、製薬・試薬領域等に利用することができる。

【図面の簡単な説明】

【0042】

【図1】心臓を各電場雰囲気内で保存したときの保存液中のCK-MBを測定した結果を示す図である。（実施例9）

【図2】心臓を各電場雰囲気内で保存したときの保存液中のトロポニンTを測定した結果を示す図である。（実施例9）

【図3】腸管を各時間保存したときの、顕微鏡組織図である。（実施例10）

【図4】肝臓を各時間保存したときの、顕微鏡組織図である。（実施例11）

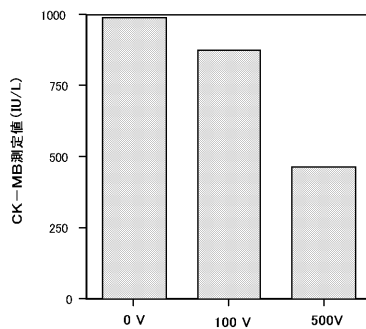
【図5】脾臓を各時間保存したときの、顕微鏡組織図である。（実施例12）

【図6】脾臓を各時間保存したときの、顕微鏡組織図である。（実施例13）

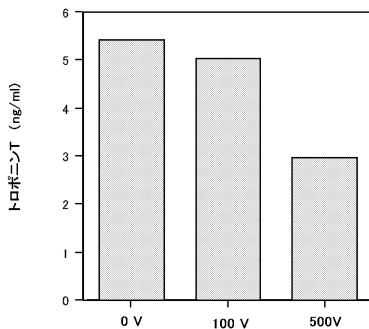
【図7】培養細胞（U937細胞）を非電場雰囲気内で各時間保存したときの、生細胞数を示す図である。（実施例15）

【図8】培養細胞（U937細胞）を静電場雰囲気内で各時間保存したときの、生細胞数を示す図である。（実施例15）

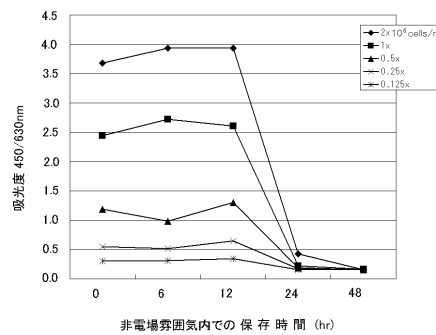
【図1】



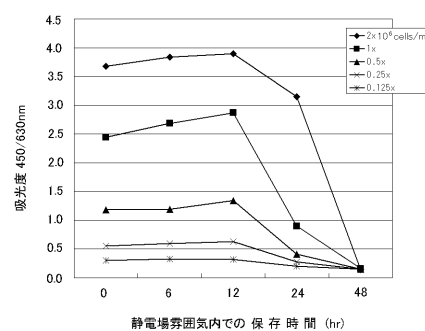
【図2】



【図7】

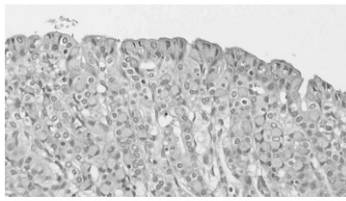


【図8】



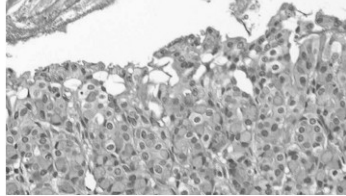
【図 3】

① 切除直後

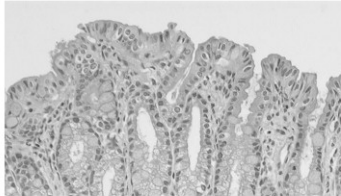


腸管の顕微鏡組織

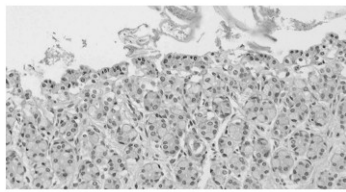
② 4℃、24時間保存



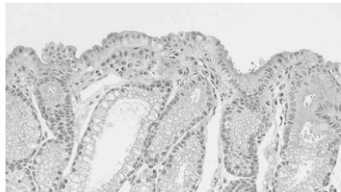
③ -5℃、3000V 24時間保存



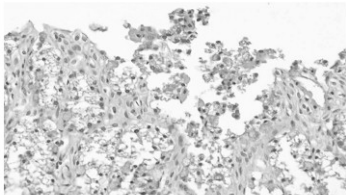
④ 4℃、48時間保存



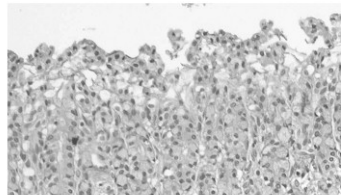
⑤ -5℃、3000V 48時間保存



⑥ 4℃、96時間保存

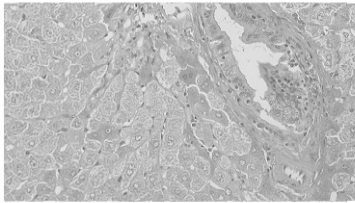


⑦ -5℃、3000V 96時間保存



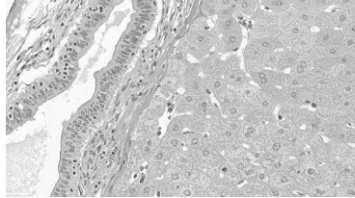
【図 4】

① 切除直後

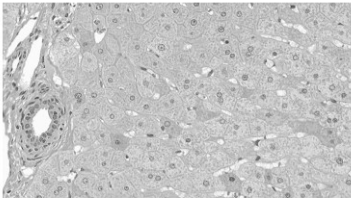


肝臓の顕微鏡組織

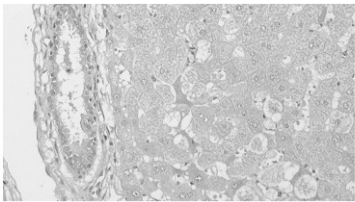
② 4℃、24時間保存



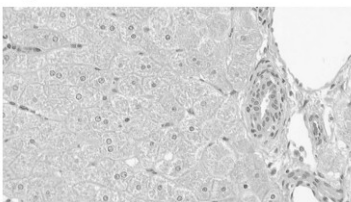
③ -5℃、3000V 24時間保存



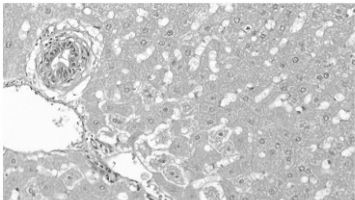
④ 4℃、48時間保存



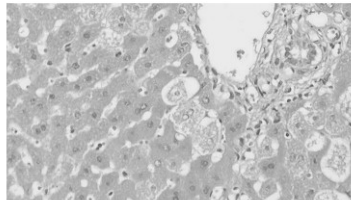
⑤ -5℃、3000V 48時間保存



⑥ 4℃、96時間保存

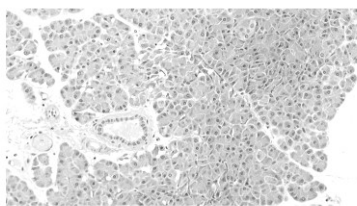


⑦ -5℃、3000V 96時間保存



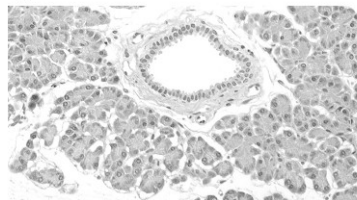
【図 5】

① 切除直後

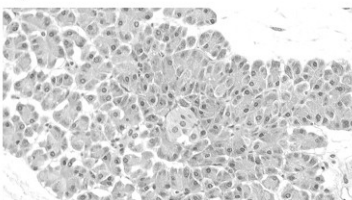


膵臓の顕微鏡組織

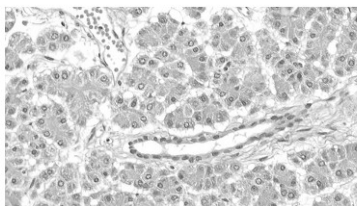
② 4℃、24時間保存



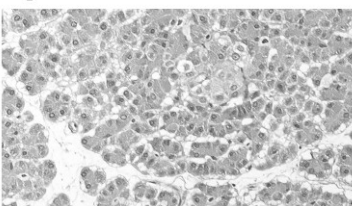
③ -5℃、3000V 24時間保存



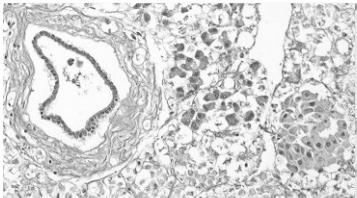
④ 4℃、48時間保存



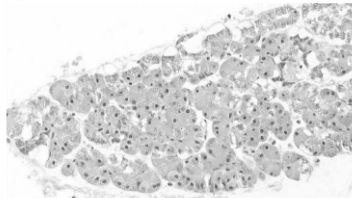
⑤ -5℃、3000V 48時間保存



⑥ 4℃、96時間保存



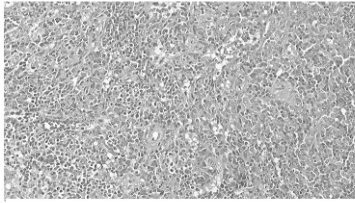
⑦ -5℃、3000V 96時間保存



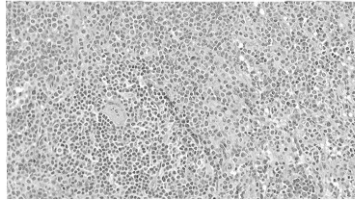
【図 6】

脾臓の顕微鏡組織

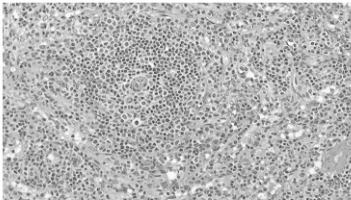
① 切除直後



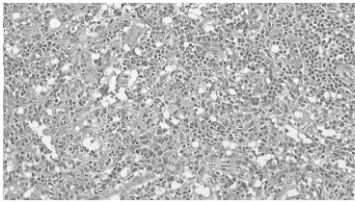
② 4℃、24時間保存



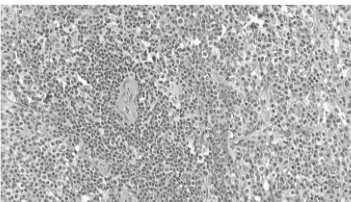
③ -5℃、3000V 24時間保存



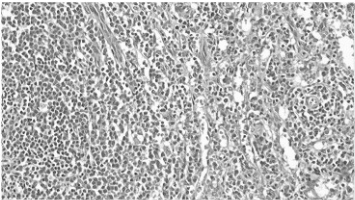
④ 4℃、48時間保存



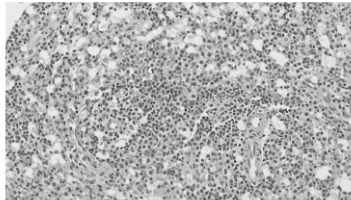
⑤ -5℃、3000V 48時間保存



⑥ 4℃、96時間保存



⑦ -5℃、3000V 96時間保存



フロントページの続き

(72)発明者 麻生 雅是

東京都東村山市青葉町2丁目38番地13号 ライオンズマンション久米川 第5-104

(72)発明者 大社 聡

東京都練馬区中村3丁目39-13 B102

Fターム(参考) 4B065 AA90X AA94X BD12 CA44

4H011 CA01 CA02 CB05 CB08 CD02 CD06 CD13