

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第5881422号
(P5881422)

(45) 発行日 平成28年3月9日(2016.3.9)

(24) 登録日 平成28年2月12日(2016.2.12)

(51) Int.Cl.		F I			
C 1 2 M	3/00	(2006.01)	C 1 2 M	3/00	Z
C 1 2 N	5/071	(2010.01)	C 1 2 N	5/071	
A O 1 N	1/02	(2006.01)	A O 1 N	1/02	

請求項の数 9 (全 21 頁)

(21) 出願番号	特願2011-551848 (P2011-551848)	(73) 特許権者	508253111
(86) (22) 出願日	平成23年1月25日 (2011.1.25)		株式会社オーガンテクノロジーズ
(86) 国際出願番号	PCT/JP2011/051317		東京都港区高輪三丁目25番27号
(87) 国際公開番号	W02011/093268	(74) 代理人	100113376
(87) 国際公開日	平成23年8月4日 (2011.8.4)		弁理士 南条 雅裕
審査請求日	平成25年11月26日 (2013.11.26)	(74) 代理人	100179394
(31) 優先権主張番号	特願2010-18938 (P2010-18938)		弁理士 瀬田 あや子
(32) 優先日	平成22年1月29日 (2010.1.29)	(74) 代理人	100156443
(33) 優先権主張国	日本国(JP)		弁理士 松崎 隆
		(72) 発明者	辻 孝
			東京都新宿区神楽坂1-3 学校法人東京理科大学内
		(72) 発明者	中尾 一久
			東京都新宿区神楽坂1-3 学校法人東京理科大学内

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 臓器又は組織の灌流培養方法及び灌流培養装置

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

哺乳動物から摘出された臓器又は組織を灌流培養する方法であって、該臓器又は組織は、生体内において前記臓器又は組織に連続している第二の臓器又は組織と共に摘出されており、

前記第二の臓器又は組織を固定することによって前記臓器又は組織を吊り下げる工程と、

前記臓器又は組織の血管に灌流液を灌流させる工程と、
を含む、臓器又は組織の灌流培養方法。

【請求項2】

前記灌流工程において、前記臓器又は組織の少なくとも一部を液体中に浸漬させる、請求項1に記載の灌流培養方法。

【請求項3】

前記臓器又は組織が肝臓であり、前記第二の臓器又は組織が横隔膜である、請求項1又は2に記載の灌流培養方法。

【請求項4】

前記臓器又は組織が肝臓であり、前記第二の臓器又は組織が横隔膜及び肋骨である、請求項1又は2に記載の灌流培養方法。

【請求項5】

前記臓器又は組織が腎臓であり、前記第二の臓器又は組織が腎臓の周囲にある脂肪組織

である、請求項 1 又は 2 に記載の灌流培養方法。

【請求項 6】

臓器又は組織を吊り下げる懸垂手段と、

前記臓器又は組織に灌流液を流入させるための灌流液流入用カニューレと、

前記臓器又は組織から灌流液を流出させるための灌流液流出用カニューレと、

を備える、臓器又は組織の灌流培養装置であって、

ここで、前記臓器又は組織は肝臓又は腎臓であり、

前記臓器又は組織が肝臓である場合には、前記懸垂手段は、哺乳動物から肋骨及び横隔膜と共に摘出した肝臓を、その肋骨で固定可能な構成であり、

前記臓器又は組織が腎臓である場合には、前記懸垂手段は、哺乳動物から周囲の脂肪組織と共に摘出した腎臓を、その脂肪組織で固定可能な構成である、
灌流培養装置。

10

【請求項 7】

前記臓器又は組織を吊り下げた状態で、該臓器又は組織の少なくとも一部を液体に浸漬させることができる容器

をさらに備える、請求項 6 に記載の灌流培養装置。

【請求項 8】

前記臓器又は組織が肝臓であって、さらに胆管用カニューレを備える、請求項 6 または 7 に記載の灌流培養装置。

【請求項 9】

前記臓器又は組織が腎臓であって、さらに尿管用カニューレを備える、請求項 6 又は 7 に記載の灌流培養装置。

20

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、主として移植を目的として摘出した臓器又は組織を長時間保存するための灌流培養方法及び灌流培養装置に関する。

【背景技術】

【0002】

病気や事故による臓器の不可逆的な機能不全に対する治療として、現在は主に臓器移植が行われている。免疫抑制剤や移植技術の進展によって、移植件数が増加し、その成功率は飛躍的に上昇しているものの、慢性的な臓器不足が移植医療の深刻な問題となっている（非特許文献 1）。この臓器不足に対応するために、移植動物の臓器を移植する方法や免疫学的な拒絶反応が起こりにくい遺伝子改変動物の開発（非特許文献 2、3）、さらに臓器の機能を人工物で代替することを目指した人工臓器の開発が進められているものの（非特許文献 4）、どの技術開発も成体臓器の機能を代替するまでには至っていない。

30

【0003】

移植に供するドナー臓器が不足するのは、提供される臓器の数だけではなく、摘出した臓器を移植可能な状態で保存できる時間が短いことも大きな原因の 1 つとなっている。そのため摘出した臓器を生体外で長期間移植可能な状態で保存するための技術の開発が進められている。現在もっとも広く用いられている方法は、細胞の代謝を抑制するために臓器内血液を低温の臓器保存液に置き換えてから、低温の保存液に浸漬する単純冷却法である。また、保存している臓器内の老廃物の除去を目的として、臓器内血管網に低温の臓器保存液を灌流させながら低温で浸漬保存する灌流冷却保存法があり、最近欧米で治験が進められている（非特許文献 5）。しかし、これらの方法で保存した臓器を安全に使用することができる期間には限界があり（例えば、単純冷却法による肝臓の使用限界は 20 時間と考えられている）、更なる保存期間の延長技術が求められている。

40

【0004】

肝臓を長期間保存する装置として、肝臓の下大静脈断端に臓器支持管を挿入し、肝臓全体を吊り下げ、肝臓が該支持管と容器部の肝臓の置かれる面に支えられて、拡張した状態

50

で保持され得る人工臓器システムが提案されている（例えば、特許文献1の段落0024、図2及び図4を参照）。

【先行技術文献】

【特許文献】

【0005】

【特許文献1】特開2003-206201号公報

【非特許文献】

【0006】

【非特許文献1】Lechler Rl. et al.: Nat. Med. 11(6): 605, 2005

【非特許文献2】Eventov-Friedman S. et al.: Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 102(8): 2928, 2005

10

【非特許文献3】Yang YG. et al.: Nat. Rev. Immunol. 7(7): 519, 2007

【非特許文献4】Malchesky PS. et al.: Artif. Organs. 30(9): 655, 2006

【非特許文献5】Moers C. et al.: N. Engl. J. Med. 360(1): 7, 2009

【非特許文献6】Butler AJ. Et al.: Transplantation 73(8): 1212, 2002

【非特許文献7】Nui A. et al.: Int. J. Artif. Oigans 26(1): 46, 2003

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0007】

特許文献1の方法では、臓器に支持管を挿入することから、臓器に損傷を与えやすい。また、本発明者らが類似の構成で実験したところ、肝臓全体に灌流液が行き渡らないことを確認した。

20

そこで、本発明は、臓器の隅々にまで灌流液を行き渡らせることにより、機能を十分に維持した状態で臓器を長時間保存できる灌流培養方法及び灌流培養装置を提供することを課題とする。

【課題を解決するための手段】

【0008】

本発明者らは、上記課題を解決するために検討を重ねた結果、臓器又は組織（以下、「臓器等」という場合もある。）を灌流培養する際、臓器等自体を吊り下げるのではなく、生体内で臓器等に連続している第二の臓器又は組織ごと臓器等を摘出し、当該第二の臓器又は組織を固定することによって培養する臓器等を吊り下げることにより、臓器等に損傷を与えることなく、且つ、灌流液が全体に行き渡るように培養できることを見出した。

30

また、臓器等を吊り下げて培養するに当たり、臓器等の少なくとも一部が浮力を受けるように臓器等浸漬用の液体中に浸漬させることによって、臓器等のより隅々にまで灌流液を行き渡らせることができ、機能を維持できる時間が著しく長くなることを見出し、本発明を完成するに至った。

即ち、本発明の一つの局面（one aspect）は、

〔1〕哺乳動物から摘出された臓器又は組織を灌流培養する方法であって、該臓器又は組織は、生体内において前記臓器又は組織に連続している第二の臓器又は組織と共に摘出されており、前記第二の臓器又は組織を固定することによって前記臓器又は組織を吊り下げる工程と、前記臓器又は組織の血管に灌流液を灌流させる工程と、を含む、臓器又は組織の灌流培養方法；

40

〔2〕前記灌流工程において、前記臓器又は組織を、その少なくとも一部を臓器等浸漬用の液体中に浸漬させる、上記〔1〕に記載の灌流培養方法；

〔3-1〕前記臓器又は組織が肝臓であり、前記第二の臓器又は組織が横隔膜である、上記〔1〕又は〔2〕に記載の灌流培養方法；

〔3-2〕前記臓器又は組織が肝臓であり、前記第二の臓器又は組織が横隔膜及び肋骨である、上記〔1〕又は〔2〕に記載の灌流培養方法；

〔4〕前記臓器又は組織が腎臓であり、前記第二の臓器又は組織が腎臓の周囲にある脂肪組織である、上記〔1〕又は〔2〕に記載の灌流培養方法；

50

〔 5 〕哺乳動物から摘出された臓器又は組織を灌流培養する方法であって、前記臓器又は組織を吊り下げ、且つ該臓器又は組織の少なくとも一部を臓器等浸漬用の液体中に浸漬させる工程と、前記臓器又は組織の血管に灌流液を灌流させる工程と、を含む、臓器又は組織の灌流培養方法；
に関する。

即ち、本発明の別の一つの局面（another aspect）は、〔 6 〕臓器又は組織を吊り下げる懸垂手段と、前記臓器又は組織に灌流液を流入させるための灌流液流入用カニューレと、前記臓器又は組織から灌流液を流出させるための灌流液流出用カニューレと、を備える、臓器又は組織の灌流培養装置；

〔 7 〕前記臓器又は組織を吊り下げた状態で、該臓器又は組織の少なくとも一部を臓器等浸漬用の液体に浸漬させることができる容器をさらに備える、上記〔 6 〕に記載の灌流培養装置；

〔 8 - 1 〕前記臓器又は組織が肝臓であって、さらに胆汁を回収するための胆管用カニューレを備える、上記〔 6 〕又は〔 7 〕に記載の灌流培養装置；

〔 8 - 2 〕前記臓器又は組織が肝臓であって、前記懸垂手段は、哺乳動物から肋骨及び横隔膜と共に摘出した肝臓を、その肋骨で固定可能な構成である、上記〔 6 〕、〔 7 〕又は〔 8 - 1 〕に記載の灌流培養装置；

〔 9 - 1 〕前記臓器又は組織が腎臓であって、さらに尿を回収するための尿管用カニューレを備える、上記〔 6 〕又は〔 7 〕に記載の灌流培養装置；及び

〔 9 - 2 〕前記臓器又は組織が腎臓であって、前記懸垂手段は、哺乳動物から周囲の脂肪組織と共に摘出した腎臓を、その脂肪組織で固定可能な構成である、上記〔 6 〕、〔 7 〕又は〔 9 - 1 〕に記載の灌流培養装置、
に関する。

【発明の効果】

【 0 0 0 9 〕

本発明に係る臓器又は組織の灌流培養方法及び灌流培養装置によれば、臓器に損傷を与えることなく、臓器の隅々にまで灌流液を行き渡らせることが可能なので、臓器の機能を維持したまま長時間保存し、良好な状態で移植に供することができる。

【図面の簡単な説明】

【 0 0 1 0 〕

【図 1】図 1 は、本発明に係る臓器又は組織の灌流培養装置の一例を示す模式図である。

【図 2】図 2 は、図 1 に示す灌流培養装置の培養容器を拡大した模式図である。なお、図 2 の模式図においては、単なる例示として、肝臓が描かれている。

【図 3】図 3 は、本発明に係る臓器又は組織に接続するカニューレの一例を示す模式図である。

【図 4】図 4 は、気泡除去装置の一例を示す模式図である。

【図 5】図 5 は、前灌流回路の一例を示す模式図である。

【図 6】図 6 は、各種固定方法によって灌流培養した肝臓に、トリバンブールを循環させた後の外観及びマイクロ C T 像である。

【図 7】図 7 は、各種固定方法によって灌流培養した肝臓の G O T 及び G P T の時間変化である。

【図 8】図 8 は、液体中での吊り下げ型固定方法によって灌流培養した肝臓の尿素合成量の時間変化である。

【図 9】図 9 は、液体中での吊り下げ型固定方法によって灌流培養した肝臓の胆汁産生量の時間変化である。

【図 1 0】図 1 0 は、静置固定方法および液体中での吊り下げ型固定方法によって灌流培養した腎臓の G O T 及び G P T の時間変化である。

【発明を実施するための形態】

【 0 0 1 1 〕

[臓器又は組織の灌流培養方法]

10

20

30

40

50

本発明に係る臓器灌流培養方法の第一の態様は、哺乳動物から摘出された臓器又は組織を灌流培養する方法であって、当該臓器又は組織は、生体内において前記臓器又は組織に連続している第二の臓器又は組織と共に摘出されており、第二の臓器又は組織を固定することによって臓器又は組織を吊り下げる工程と、臓器又は組織の血管に灌流液を灌流させる工程と、を含むことを特徴とする。

【0012】

本明細書において、「哺乳動物」は、特に限定されず、本発明に係る灌流培養方法はあらゆる哺乳動物の臓器等に利用できる。本発明に係る方法で培養した臓器等を移植に用いる場合、哺乳動物は、臓器等を移植する対象（レシピエント）に応じて適宜選択することができ、例えば、ヒト、ブタ、ウシ、サル、ヒヒ、イヌ、ネコ等を挙げることができる。レシピエントがヒトである場合、臓器等は、主として脳死患者から摘出されたものが用いられる。

10

【0013】

本明細書において「臓器又は組織（臓器等）」は、灌流培養に適する臓器又は組織である限り特に限定されず、例えば、心臓、肝臓、腎臓、肺、膵臓、胃、小腸、大腸、歯とその周囲組織、毛髪とその周囲組織等が挙げられる。

【0014】

本発明において臓器等の「灌流培養」とは、摘出した臓器等の血管にカニューレ等のチューブを連結し、血流と同様に灌流液を流入及び流出させて臓器を培養することをいう。灌流液は、当業者が、哺乳動物や臓器の種類に応じて、公知の組成又はそれに準ずる組成を適宜選択することができる。例えば、細胞の生存に必要な糖類やアミノ酸などの栄養素が含まれているものであればよく、一般的な細胞培養に用いる培養液、又は臓器保存に用いられる臓器保存液を用いることができ、その組成は特に限定されない。

20

【0015】

本発明に係る灌流培養方法では、生体内において臓器等に連続している第二の臓器又は組織と共に摘出された臓器等を用いる。かかる構成によれば、当該第二の臓器又は組織を固定して、培養する臓器等を吊り下げることができるので、培養する臓器等に損傷を与えることなく、臓器等の隅々にまで培養液を行き渡らせることができる。

第二の臓器又は組織は、生体内において臓器等に連続した臓器又は組織であることが好ましく、生体内において臓器等の上部に連続した臓器又は組織であることがより好ましい。かかる臓器又は組織を用いて吊り下げれば、生体内での構成に類似した環境で臓器等を培養することができる。ここで、生体内の構成に類似した環境とは、臓器等が容器の内面等の硬質な材料から圧迫を受けることなく、自然な形状を維持できる環境を意味する。従来の臓器等の灌流培養は、シャーレ等の容器に臓器等を載置して行われていたため、シャーレに接する部分の血管が圧迫され、灌流液が十分に行き渡らなかった。本発明の方法によれば、臓器等を吊り下げて、生体内での構成に類似した環境で培養するので、臓器等全体に灌流液を行き渡らせることができる。

30

また、第二の臓器又は組織を固定する場合、第二の臓器又は組織は損傷を受けても差支えないので、支持管を挿入する、クリップで挟む、縫合糸で縫うなどの方法でしっかりと固定することができる。

40

例えば、培養する臓器が肝臓である場合、生体内ではその上部に横隔膜が連続し、当該横隔膜は肋骨に接続している。従って、横隔膜のみ、あるいは横隔膜と肋骨を、第二の臓器又は組織として用いることができる。哺乳動物から肝臓を摘出する際に横隔膜を一緒に摘出すれば、当該横隔膜を固定することにより、肝臓を生体内に近い環境で吊り下げることができる。横隔膜に加えて肋骨も一緒に摘出すれば、肋骨を固定することができるので、より安定的に吊り下げることが可能である。

【0016】

第二の臓器又は組織のその他の例としては、腎臓や膵臓を培養する場合には、これらの臓器の表面に付着する脂肪組織；消化器系の臓器を培養する場合には、上流に隣接する臓器（具体的には、小腸を培養する場合の胃や十二指腸、大腸を培養する場合の小腸）；歯

50

とその周囲組織を培養する場合の顎骨、歯槽骨、歯根骨、歯肉；毛髪とその周囲組織を培養する場合の表皮、真皮、脂肪組織、等が挙げられるがこれらに限定されない。

【0017】

本発明の灌流培養方法において、臓器等の血管に灌流液を灌流させる工程（灌流工程）は、例えば、臓器等の血管につないだチューブをポンプに連結し、灌流液を流入及び流出させることによって行うことができる。

【0018】

本発明の灌流培養方法は、灌流工程において、臓器等の少なくとも一部を臓器等浸漬用の液体中に浸漬させて行うことが好ましい。そうすることで、臓器等の少なくとも一部が浮力を受けることとなり、単に吊り下げる場合と比較して、さらに生体内の構成に近い環境を作り出すことができ、臓器等の隅々まで灌流液を行き渡らせることができる。臓器等は、少なくともその30%が液体中に存在する状態が好ましく、より好ましくは50%、さらに好ましくは80%、最も好ましくは、全体が液体中に存在する状態とする。臓器等浸漬用の液体は、灌流液と同様に、哺乳動物及び臓器等の種類によって当業者が適宜選択することができ、灌流液と同一の組成であっても異なった組成であってもよい。

【0019】

本発明に係る臓器又は組織の灌流培養方法の第二の態様は、哺乳動物から摘出された臓器等を灌流培養する方法であって、臓器等を吊り下げ、且つ臓器等の少なくとも一部を臓器浸漬用の液体に浸漬させる工程と、臓器等の血管に灌流液を灌流させる工程と、を含むことを特徴とする。

本発明に係る臓器又は組織の灌流培養方法の第一の態様において使用された用語は、第二の態様においても同義で用いられているので、ここでは説明を省略する。

【0020】

本発明に係る方法の第二の態様において、臓器等を吊り下げる工程は、臓器等がその機能を維持できる限りどのような方法であってもよいが、好ましくは生体内における環境に類似した状態とする。従って、生体内と上下方向を同一にし、できるだけ非侵襲的な方法で吊り下げることが好ましい。

【0021】

[臓器又は組織の灌流培養装置]

本発明に係る臓器又は組織の灌流培養装置は、臓器等を吊り下げる懸垂手段と、臓器等を吊り下げた状態で、該臓器等の少なくとも一部を臓器等浸漬用の液体に浸漬させることができる容器と、臓器等に灌流液を流入させるための灌流液流入用カニューレと、臓器等から灌流液を流出させるための灌流液流出用カニューレと、を備えることを特徴とする。

【0022】

当該装置を肝臓の培養に用いる場合は、さらに胆管用カニューレを備えることが好ましい。肝臓の胆管に胆管用カニューレを挿入することで、肝臓から分泌される胆汁を培養容器の外部で回収することができる。

【0023】

当該装置を腎臓の培養に用いる場合は、さらに尿管用カニューレを備えることが好ましい。腎臓の尿管に尿管用カニューレを挿入することで、腎臓から分泌される尿を培養容器の外部で回収することができる。

【0024】

また、当該装置を肝臓の培養に用いる場合であって、肝臓が肋骨及び横隔膜と共に摘出されたものである場合、懸垂手段は、肋骨を固定できる構成であることが好ましい。

【0025】

また、当該装置を腎臓の培養に用いる場合であって、腎臓が周囲の脂肪組織と共に摘出されたものである場合、懸垂手段は、脂肪組織を固定できる構成であることが好ましい。

【0026】

本発明に係る灌流培養装置の一例として、肝臓培養装置1を図1に示し、その概要を以下に説明する。肝臓培養装置1は、横隔膜及び肋骨と共に摘出された肝臓を培養するため

10

20

30

40

50

のものであり、肝臓はその全体が液体中に浸漬された状態で灌流培養される。

【 0 0 2 7 】

肝臓培養装置 1 は、肝臓固定用培養容器 1 0、肝臓に固定される灌流液流入用カニューレ 2 0 及び灌流液流出用カニューレ 3 0 を備え、各カニューレにはチューブ 8 0、8 2 が接続されている。灌流液流入用カニューレ 2 0 に連結されるチューブ 8 0 は、灌流液流入用ペリスタルティックポンプ 7 0 を介してマイクロキャリアスピナーフラスコ 6 2 に接続されており、マイクロキャリアスピナーフラスコ 6 2 中の灌流液を灌流液流入用カニューレ 2 0 に供給する。

灌流液流入用カニューレ 2 0 を通じて肝臓 1 0 0 に流入した灌流液は、灌流液流出用カニューレ 3 0 に流出し、灌流液流出用カニューレ 3 0 に連結されたチューブ 8 2 等を通じてマイクロキャリアスピナーフラスコ 6 2 に排出される。

以下、各構成要素の好ましい例について説明する。

肝臓固定用培養容器 1 0 の拡大図を図 2 に示す。

培養容器 1 0 には、肝臓 1 0 0 を肋骨 1 0 4 によって吊り下げ可能な懸垂手段 1 0 6、1 0 8 が設けられている。培養容器 1 0 内は、液体で満たすことができ、肝臓 1 0 0 が浮力を受けるようにその全体を浸漬させられる構成となっている。また、培養容器 1 0 の壁には、カニューレに連結されるチューブ 8 0、8 2 を通すための貫通孔 9 9 a、9 9 b が形成されている。

また、培養容器 1 0 には、カニューレ又はそれに連結するチューブを固定する固定具 9 6、9 8 が設けられている。カニューレを固定具 9 6、9 8 で固定することによって、カニューレが臓器の内部に入りすぎて臓器に損傷を与えたり、臓器からはずれたりすることを防ぎ、培養液を安定に循環させることができる。固定具 9 6、9 8 は、例えば、カニューレ又はチューブが嵌合可能な数ミリメートルのスリットを先端に入れた柱状の部材を用いることができる。当該部材を培養容器内壁に固着させ、カニューレをスリットに嵌合させることによって、カニューレが固定される。

培養容器 1 0 は、どのような素材であってもよいが、たとえばガラスやアクリルを用いて作製することができる。

【 0 0 2 8 】

灌流液流入用カニューレ 2 0 を図 3 上段に、灌流液流出用カニューレ 3 0 を同図中段に、胆管用カニューレ 4 0 を同図下段に示す。図 3 に示す各カニューレは、適用する臓器又は組織に応じて、カニューレを構成する各部材、例えばカテーテル部分、のサイズ等を変更することができる。例えば、肝臓の灌流培養においては、灌流液流入/流出用カニューレは、留置針（例えば流入用は 2 2 G、流出用は 1 6 G）のカテーテル部分 2 1、3 1 を切り取り、シリコンチューブ 2 5、3 5（例えば内径 1 mm）に接続して軟性絹製縫合糸 2 4、3 4 で 2 箇所を縛って固定し、パラフィルム 2 2、3 2 を巻いて作製する。胆管用カニューレ 4 0 は留置針（例えば 2 7 G）のカテーテル部分 4 1 をルアーロックフィッティング 4 2（例えば 1.5 mm ID 用）を介してシリコンチューブ 4 5（例えば内径 1 mm）に接続して作製する。各カニューレのカテーテルと反対の端には、ルアーロックフィッティング 2 3、3 3、4 3 を接続し、チューブ 8 0、8 2、8 8（図 1）と連結できるようになっている。

灌流液流入用カニューレ 2 0 は、例えば肝臓 1 0 0 の門脈に、灌流液流出用カニューレ 3 0 は、例えば肝臓の静脈に、それぞれ直接又は間接的に接続される。

灌流液流入用カニューレ 2 0 は、灌流液流入量ペリスタルティックポンプ 7 0 に接続されており、ポンプ 7 0 を稼働させることによって、灌流液流入用カニューレ 2 0 から肝臓 1 0 0 に灌流液が流入する。流入した灌流液は、肝臓 1 0 0 内を通過して灌流液流出用カニューレ 3 0 から流出し、チューブ 8 2 に流入する。また、肝臓から分泌された胆汁は、胆管用カニューレ 4 0 から、胆汁回収回路（胆汁回収チューブ 8 8 及び胆汁回収瓶 6 8）に回収される。

【 0 0 2 9 】

灌流液流入用カニューレ 2 0 はルアーロックフィッティング 2 3（例えば 2.5 mm I

10

20

30

40

50

D用)を用いてシリコンチューブ80(例えば内径2mm)に連結し、同様にルアーロックフィッティングを用いてシリコンチューブをファームドチューブ(例えば内径3.15mm)に接続する。このファームドチューブにフッ素グリースを塗布し、灌流液流入用ペリスタルティックポンプ70に設置する。

【0030】

灌流液流出用カニューレ30はルアーロックフィッティング33(例えば2.5mm ID用)を用いてシリコンチューブ82(例えば内径2mm)に連結する。さらにこのシリコンチューブを、蓋に3本のテフロンチューブ(例えば内径1mm; T1及びT2。3つ目は図示せず)を刺したシリコン栓付きスコット瓶60(例えば100ml)の、テフロンチューブT1に接続する。

10

一方、スコット瓶60の別の2本のテフロンチューブのうちの一つには、内側に瓶底に達する長さのシリコンチューブ(例えば内径2mm)(図1のT2)、外側には両端にシリコンチューブ(例えば内径2mm)を連結したファームドチューブを接続する。シリコンチューブの他端は、灌流液流出用ペリスタルティックポンプ72を介して、シリコン栓付きマイクロキャリアスピナーフラスコ(例えば1000ml)62の図中右側の蓋に刺された3本のテフロンチューブ(T3及びT4。3本目は図示せず)のうち、瓶内側にシリコンチューブを連結せず先端が液表面に届かない方のテフロンチューブT3(ASONE)に接続する。

スコット瓶60の蓋に刺された3本目のテフロンチューブは、瓶外部でエアフィルターを接続する。

20

【0031】

灌流液はマイクロキャリアスピナーフラスコ62に巻いたヒーターで保温される。温度は対象となる哺乳動物の平均体温とすることが好ましく、ヒトであれば37前後とすることが好ましい。ヒーターとしては、セルマスターフレキシブルヒーター(Wakenyaku, Kyoto, Japan)とセルマスター1700(Wakenyaku)、温度電極(Mettler Toledo, Tokyo, Japan)が好ましく用いられる。マイクロキャリアスピナーフラスコ62の2つの蓋にはそれぞれ3本のテフロンチューブが刺されており、図中右側の蓋に刺された瓶底に達するシリコンチューブ(例えば内径2mm)を連結したテフロンチューブT4は、灌流液流入用ペリスタルティックポンプ70とシリコンチューブを介して連結される。

30

図中右側の蓋に刺されたもう一本のテフロンチューブは、瓶外部でエアフィルターを接続する。

なお、低温で臓器等を培養する際には、ヒーターの代わりに公知の保冷装置を用い、灌流液を保冷することができる。保冷温度は、4~35とすることが好ましく、20~35とすることがより好ましい。また、低温で臓器等を培養する際には、臓器等を浸漬させる液体も低温とし、培養中の臓器等も同時に保冷することが好ましい。このような保冷に用いる保冷装置としては、例えば、各種ラジエーターやペルチェ式冷却装置が挙げられる。

【0032】

灌流液流入用ペリスタルティックポンプ70と灌流液流入用カニューレ20の間、および灌流液流出用カニューレ30とスコット瓶60の間のシリコンチューブに、流路切り替えコック84、86を取り付け、その先に灌流液を採取するための灌流液回収用チューブ(例えば15ml)をとりつける。

40

【0033】

灌流液流入用ペリスタポンプ70と灌流液流入用カニューレ20の間に、気泡除去装置50を設置する。気泡除去装置50の構成を図4に示す。ルアーロックフィッティングプラグ51で栓をしたシリコンチューブをY字チューブで連結して、回路に混入した気泡が肝臓に流入することを防ぐと共に、それらの気泡をルアーロックフィッティングプラグ51(ISIS)から排出するための装置を設置する。Y字チューブとしては、ミニフィッティング(F)53(6.5mm ID用; ISIS)が好ましく用いられる。

50

【0034】

灌流培養24時間ごとに灌流液を交換するために、図1に示すようにマイクロキャリアスピナーフラスコ62の図中左側の蓋に刺された3本のテフロンチューブ(T5及びT6。3本目は図示せず)のうち、内側にシリコンチューブを連結せず先端が液表面に届かない方のテフロンチューブT5と内側にシリコンチューブを連結し先端が液面に達している方のテフロンチューブT6のそれぞれに、両端にシリコンチューブを接続したファームドチューブを接続する。もう1つのテフロンチューブにはエアフィルターを接続する。

テフロンチューブT5に接続したシリコンチューブは、灌流液追加用ペリスタルティックポンプ74を介して、新鮮な培地を含んだ灌流液追加用スコット瓶64(例えば200ml)に連結する。

テフロンチューブT6に接続したシリコンチューブは、灌流液回収用ペリスタルティックポンプ78を介して、灌流液追加用スコット瓶66(例えば2000ml)に連結する。

10

【0035】

肝臓を摘出する際にも灌流液を送液できるよう、図5に示す前灌流回路を構築する。灌流液流入用カニューレ20をルアーロックフィッティング23でシリコンチューブ(例えば内径2mm)に連結し、このシリコンチューブを気泡除去装置50'に接続する。気泡除去装置50'に別のシリコンチューブを連結し、さらにフッ素グリースを塗布したファームドチューブ(例えば内径3mm)を連結して、ペリスタルティックポンプ94に設置する。ファームドチューブのもう一端にシリコンチューブ(例えば内径2mm)を連結し、灌流液をスコット瓶92から送液する。

これによりスコット瓶92から送液された灌流液は、灌流液流入用カニューレ20を通じて肝臓に流入し、灌流液流出用カニューレ30へ流出する。灌流液流出用カニューレ30は、ルアーロックフィッティング33でシリコンチューブ(例えば内径2mm)に連結されており、肝臓より流出した灌流液はシリコンチューブから排出され、廃棄される。

前灌流回路に接続された肝臓は、灌流液流入用カニューレ20および灌流液流出用カニューレ30をルアーロックフィッティング23、33によってシリコンチューブからはずし、ルアーロックフィッティング23、33をシリコンチューブ80、82(図1)のルアーロックフィッティングに接続することにより、図1に示す灌流回路に接続することができる。

20

30

【0036】

ここまで、本発明に係る灌流培養装置の一例として、肝臓培養装置1の概要を説明したが、肝臓培養装置1と同様の構成により、他の臓器等を灌流培養することもできる。例えば、腎臓を同様の構成で灌流培養することができる。その際、下記のように構成を変更することができる。

【0037】

例えば、灌流液流入/流出用カニューレは、留置針(例えば流入用は26G、流出用は16G)のカテーテル部分109、110を、尿管用カニューレは先端の細かいゲルロード用チップ(例えばエッペンドルフ社製GELoader Tip 0,5-20?l)の先端部分111を使用する以外は、図3に示した肝臓の灌流培養に用いるカニューレと同様である。

また、灌流液流入用カニューレ20は、例えば腎臓の腎動脈に、灌流液流出用カニューレ30は、例えば腎臓の腎静脈に、尿管用カニューレ40は、例えば尿管にそれぞれ直接的又は間接的に接続される以外は、肝臓の場合と同様である。

40

【0038】

灌流液流入用カニューレ20はルアーロックフィッティング23(例えば1.5mmID用)を用いてシリコンチューブ80(例えば内径1.0mm)に連結し、同様にルアーロックフィッティングを用いてシリコンチューブをファームドチューブに接続する。このファームドチューブ(例えば内径1.6mm)にフッ素グリースを塗布し、灌流液流入用ペリスタルティックポンプ70に設置する。

灌流液流出用カニューレ30はルアーロックフィッティング33(例えば1.5mmID

50

D用)を用いてシリコンチューブ82(例えば内径1mm)に連結する。さらにこのシリコンチューブを、蓋に3本のテフロンチューブ(例えば内径1mm; T1及びT2。3本目は図示せず)を刺したシリコン栓付きスコット瓶60(例えば100ml)の、テフロンチューブT1に接続する。

一方、スコット瓶60の別の2本のテフロンチューブのうちの一つには、内側に瓶底に達する長さのシリコンチューブ(例えば内径2mm)(図1のT2)、外側には両端にシリコンチューブ(例えば内径2mm)を連結したファームドチューブを接続する。シリコンチューブの他端は、灌流液流出用ペリスタルティックポンプ72を介して、シリコン栓付きマイクロキャリアスピナーフラスコ(例えば1000ml)62の図中右側の蓋に刺された3本のテフロンチューブ(T3及びT4。3本目は図示せず)のうち、瓶内側にシリコンチューブを連結せず先端が液表面に届かない方のテフロンチューブT3(ASONE)に接続する。

10

スコット瓶60の蓋に刺された3本目のテフロンチューブは、瓶外部でエアフィルターを接続する。

【0039】

また、灌流液回収用のチューブ、気泡除去用装置、および培地交換用灌流回路は、肝臓培養装置と同様の構成で使用することができる。

【0040】

腎臓を摘出する際にも灌流液を送液できるよう、図5に示す前灌流回路を構築する。灌流液流入用カニューレ20をルアーロックフィッティング23でシリコンチューブ(例えば内径1.0mm)に連結し、このシリコンチューブを気泡除去装置50'に接続する。気泡除去装置50'に別のシリコンチューブを連結し、さらにフッ素グリースを塗布したファームドチューブ(例えば内径1.6mm)を連結して、ペリスタルティックポンプ94に設置する。ファームドチューブのもう一端にシリコンチューブ(例えば内径1.0mm)を連結し、灌流液をスコット瓶92から送液する。

20

これによりスコット瓶92から送液された灌流液は、灌流液流入用カニューレ20を通じて腎臓に流入し、灌流液流出用カニューレ30へ流出する。灌流液流出用カニューレ30は、ルアーロックフィッティング33でシリコンチューブ(例えば内径2mm)に連結されており、腎臓より流出した灌流液はシリコンチューブから排出され、廃棄される。前灌流回路に接続された腎臓は、灌流液流入用カニューレ20をルアーロックフィッティング23によってシリコンチューブからはずし、ルアーロックフィッティング23をシリコンチューブ80(図1)のルアーロックフィッティングに接続することにより、図1に示す灌流回路に接続することができる。

30

【0041】

なお、本明細書において用いられる用語は、特定の実施態様を説明するために用いられるのであり、発明を限定する意図ではない。

また、本明細書において用いられる「含む」との用語は、文脈上明らかに異なる理解をすべき場合を除き、記述された事項(部材、ステップ、要素、数字など)が存在することを意図するものであり、それ以外の事項(部材、ステップ、要素、数字など)が存在することを排除しない。

40

【0042】

異なる定義が無い限り、ここに用いられるすべての用語(技術用語及び科学用語を含む。)は、本発明が属する技術の当業者によって広く理解されるのと同じ意味を有する。ここに用いられる用語は、異なる定義が明示されていない限り、本明細書及び関連技術分野における意味と整合的な意味を有するものとして解釈されるべきであり、理想化され、又は、過度に形式的な意味において解釈されるべきではない。

【0043】

本発明の実施態様は模式図を参照しつつ説明される場合があるが、模式図である場合、説明を明確にするために、誇張されて表現されている場合がある。

第一の、第二のなどの用語が種々の要素を表現するために用いられるが、これらの要素

50

はそれらの用語によって限定されるべきではないことが理解される。これらの用語は一つの要素を他の要素と区別するためのみに用いられているのであり、例えば、第一の要素を第二の要素と記し、同様に、第二の要素は第一の要素と記すことは、本発明の範囲を逸脱することなく可能である。

【0044】

以下において、本発明を、実施例を参照してより詳細に説明する。しかしながら、本発明はいろいろな態様により具現化することができ、ここに記載される実施例に限定されるものとして解釈されてはならない。

【実施例】

【0045】

以下、本発明を実施例に基づいて具体的に説明するが何らこれらに限定されるものではない。

1. 灌流液の作製

灌流液は10% FCS (Life Technologies, California, US) と抗生物質 - 抗真菌剤混合液 (nacalai tesque, Japan)、ゲンタマイシン硫酸塩 (Wako, Osaka, Japan), L-Glutamin (Life Technologies) を添加した L-15 medium (Sigma, Missouri, US) を用いた。1000ml の灌流液を、シリコン栓付き1000ml マイクロキャリアスピンナーフラスコ (Bellco) に入れ、37 で保温した。

【0046】

2. 肝臓の摘出及び前灌流回路への接続

ラットから肝臓を摘出し、図5に示す前灌流回路に接続した。

ジエチルエーテル (Wako) をデシケーター内に充満させ、8 - 10 週齢 Wistar ラット (SLC) をデシケーターに移動させて吸引麻酔した後、25G 注射針 (Terumo) と 1ml シリンジ (Terumo) を用いて終濃度 25mg/ml のペントバルビタールナトリウム (TCI, Tokyo, Japan) 溶液 400µl を腹腔内に注射した。

深麻酔下のラットの下腹部から喉元までの皮膚を正中線に沿って切開した。腹膜を切開し、消化器系の臓器を移動させることで、肝臓、門脈を露出させた。肝臓を肋骨側に持ち上げて肝動脈を露出させ、肝動脈の下から絹製縫合糸 No. 7 (Natume) を通し、結紮した。同様にして肝下部大静脈に絹製縫合糸 No. 4 (Natume) を通し、結紮用ループを1箇所作った。脾胃静脈に絹製縫合糸 No. 7 (Natume) を通し、結紮した。門脈に先曲がり絹製縫合糸 No. 4 (Natume) を、間隔をあけて2本通し、結紮用ループを2箇所作った。前灌流回路 (図5) に 10ml/min で灌流液を流しておき、2つの門脈結紮用ループより肝臓から離れた部位で門脈を半切して素早く門脈に灌流液流入用カニューレ 20 を差し込んだ。直ちに肝下部大静脈を結紮用ループより下部で切断し、灌流液を流入させた。

2つの門脈結紮用ループを結紮してカニューレ 20 を門脈に固定し、カニューレーション部分を少量のアロンアルファ A (Daiichi Sankyo, Tokyo, Japan) で固定した。総胆管を半切して胆管用カニューレ 40 を差し込み、アロンアルファ A (Daiichi Sankyo) で固定した。横隔膜を露出し、左右の横隔動・静脈を絹製縫合糸 No. 7 (Natume) で結紮した。

肋骨の合間を切開して肋骨ごと横隔膜を切り出し、切り出し口よりも上部の肋骨を喉元まで切り開いた。肋骨の一部に切れ目を入れ、肝上部大静脈に絹製縫合糸 No. 4 (Natume) を通し、結紮用ループを2箇所作製した。ループを結紮し、肝下部大静脈からの灌流液の流出を止め、右心房を半切した。半切した右心房部分に灌流液流出用カニューレ 30 を差し込み、肝上部大静脈の結紮用ループ 2箇所を結紮してカニューレを固定し、結紮部位、カニューレーション部位をアロンアルファ A で固定した。肝臓周囲の器官、結合組織を切除後、肋骨と横隔膜を肝臓に連結したまま背面から肝臓を切り離した。

10

20

30

40

50

【 0 0 4 7 】

3 . 肝臓の灌流回路への接続

3 - 1 . 静置固定（従来法）

まず、前灌流回路に接続したまま、培養容器 1 0 の固定具 9 6 に灌流液流入用カニューレ 2 0 を固定し、灌流液流出用カニューレ 3 0 を固定具 9 8 に固定し、胆管用カニューレ 4 0 も固定具（図示せず）に固定した。胆管用カニューレ 4 0 はルアーロックフィッティング 4 3（I S I S）を介して培養容器 2 0 の外部へ流出する胆汁回収回路（チューブ 8 8 及びスコット瓶 6 8）に接続した。

続いて、灌流液流入用カニューレ 2 0 に接続しているシリコンチューブ（A S O N E）をペアン止血鉗子（N a t u m e）ではさみ、一時的に液流を停止させた後、直ちに灌流液流出用カニューレ 3 0 をルアーロックフィッティング 3 3（I S I S）を用いてチューブ 8 2 に連結し、灌流回路に接続した。その後、直ちに灌流液流入用カニューレ 2 0 をルアーロックフィッティング 2 3（I S I S）を用いて前灌流回路から切り離し、灌流液流入用カニューレ 2 0 とチューブ 8 0 とを、ルアーロックフィッティング 2 3（I S I S）を介して連結することで、肝臓への気泡の混入を防止するために予め培養液を満たして気泡を除去しておいた灌流回路と無菌的に接続した。さらに、これと同時に、灌流回路のペアン止血鉗子（N a t u m e）を取り外すことで灌流回路の液流を開始した。

肝臓 1 0 0 は、培養容器 1 0 内の台の上に載置した。

【 0 0 4 8 】

3 - 2 . 溶液中での静置固定（従来法）

3 - 1 と同様の方法で、肝臓 1 0 0 を灌流回路に接続した。

肝臓 1 0 0 は、培養容器 1 0 内の台の上に載置し、培養容器 1 0 内を液体で満たした時に肝臓が浮力で浮かび上がらないように、圧迫しない程度の間隙を残してガーゼで覆い、ガーゼを台に固定した。

その後、培養容器 1 0 内を P B S（-）で満たし、肝臓を軽く浮遊させてから容器を密閉した。

【 0 0 4 9 】

3 - 3 . 吊り下げ型固定（本願発明の方法）

3 - 1 と同様の方法で、肝臓 1 0 0 を灌流回路に接続した。

図 2 に示すように、絹製縫合糸 N o . 4（N a t u m e）1 0 6 を用いて肋骨 1 0 4 を培養容器 1 0 付属の固定具 1 0 8 に数箇所固定後、培養容器 1 0 を密閉してから流入用カニューレ 2 0 が下側に来るように培養容器を縦置きし、肝臓 1 0 0 を肋骨 1 0 4 と横隔膜 1 0 2 で吊り下げた。

【 0 0 5 0 】

3 - 4 . 溶液中での吊り下げ型固定（本願発明の方法）

3 - 1 と同様の方法で、肝臓 1 0 0 を灌流回路に接続した。

絹製縫合糸 N o . 4（N a t u m e）1 0 6 を用いて肋骨 1 0 4 を培養容器 1 0 付属の固定具 1 0 8 に数箇所固定後、培養容器 1 0 内部に P B S（-）を満たして肝臓を浮遊させた。培養容器を密閉してから流入用カニューレ 2 0 が下側に来るように培養容器 1 0 を縦置きし、肝臓 1 0 0 を肋骨 1 0 4 と横隔膜 1 0 2 で吊り下げて浮遊させた。

【 0 0 5 1 】

4 . 肝臓の灌流培養

灌流液流入用カニューレ 2 0 とマイクロキャリアスピナーフラスコ 6 2（B e l l c o）の間のペリスタルティックポンプ 7 0（I W A K I）を流速 1 0 m l / m i n となるよう調節し、肝臓 1 0 0 へ灌流液を流入させた。

培養容器をスピナーフラスコ 6 2 よりも垂直方向に持ち上げて静置することで、高低差による重力によって 1 0 m l / m i n の流出速度になるように、培養容器の高さを調節した。これらの流速の調節は、灌流液回収用チューブから一定時間に回収された灌流液量で行った。また 1 0 0 m l スコット瓶 6 0（D U R A N）とマイクロキャリアスピナーフラスコ 6 2 の間のペリスタルティックポンプ 7 2（I W A K I）も流速 1 0 m l / m i

10

20

30

40

50

nとなるように調節した。さらにペリスタルティックポンプ72によって回路内部の圧力が変化しないように、スコット瓶60とマイクロキャリアスピナーフラスコ62の蓋に通気フィルター(Millipore)を設置した。

【0052】

5. 灌流液の臓器内血管への循環の確認

3-1から3-4に記載した各固定方法で固定した肝臓に、「4. 肝臓の灌流培養」の方法に従って、PBS(-)で5倍に希釈したトリパンブルー溶液(Sigma)を10ml送液した後の肝臓の外観、及びマイクロCT像を撮影した。結果を図6に示す。図6中、3-1は、通常の静置固定を示し、3-2は、液体中での静置固定を示し、3-3は、吊り下げ型固定を示し、3-4は、液体中での吊り下げ型固定を示す。図6中、Aは、肝臓の外観を示す写真であり、Bは、肝臓のマイクロCT像を示す。外観を示す写真において、点線で囲んだ領域がトリパンブルーによって染色された部分である。

通常の静置固定(3-1)、液体中での静置固定(3-2)においては、臓器全体が青色に染色されず、肝臓の各葉が折り重なっている領域は染色が認められなかった。吊り下げ型固定(3-3)は一部に染色が認められない領域が存在したものの、臓器のほぼ全体が染色され、通常の静置固定や液体中での静置固定に比べて、臓器内の灌流液の循環が向上していることが明らかになった。液体中での吊り下げ型固定(3-4)は臓器全体が均一に青色に染色されたことから、吊り下げ型固定よりもさらに循環が向上し、臓器内血管の全体に灌流液が循環していることが示された。

【0053】

6. 灌流率の測定

3-1及び3-4に記載した固定方法で固定し、24時間灌流培養した肝臓について、1時間ごとに、流路切り替えコックに接続した15mlチューブ(BD)に、30秒間灌流液を採取し、肝臓へ流入する灌流液の流速、および肝臓から流出する灌流液の流速を測定した。流入量に対する流出量の百分率を計算して灌流率とした。

いずれも24時間、灌流率は90%以上を維持していたことから、正常な灌流培養が行われていることを確認した。

7. 障害酵素活性の測定

1時間ごとに、流路切り替えコックに接続した15mlチューブ(BD)に、30秒間灌流液を回収し、回収した灌流液を、50 μ lずつ0.5mlチューブ(eppendorf, Hamburg, Germany)に分注し、-80 $^{\circ}$ Cで凍結保存した。後日、凍結保存した灌流液を溶解し、15000rpmで5分間遠心分離して、その上清のGOTおよびGPT酵素活性をトランスアミナーゼCII-テストワコー(Wako)に添付された方法に従って測定した。灌流液の交換後の測定値は、交換前後で変化する測定値を上乗せして計算した。

測定結果を図7に示す。通常の静置固定、吊り下げ型固定、溶液中での吊り下げ型固定のいずれも灌流培養18時間後まではGOTが20IU/total medium以下であり、GPTが10IU/total medium以下であった。

培養24時間後の通常の静置固定(3-1)ではGOTが85IU/total medium以上でGPTが30IU/total medium以上であり、吊り下げ型固定(3-3)ではGOTが70IU/total medium以上でGPTが25IU/total medium以上であった。一方、培養24時間後の溶液中での吊り下げ型固定(3-4)ではGOTが40IU/total medium以下でGPTが10IU/total medium以下であった。これより、臓器内血管全体への循環が確保されている溶液中での吊り下げ型固定は、通常の静置固定や吊り下げ型固定に比べて、臓器の障害が抑制されていることが明らかになった。

【0054】

8. 尿素合成量の測定

1時間ごとに、流路切り替えコック84に接続した15mlチューブ(BD)に、30秒間灌流液を回収し、回収した灌流液を、1mlずつ1.5mlチューブ(eppend

10

20

30

40

50

olf, Hamburg, Germany) に分注し、 -80°C で凍結保存した。後日、凍結保存した灌流液を溶解し、 15000rpm で5分間遠心分離して、F-キット (J. K インターナショナル) に添付された方法に従って尿素を測定した。灌流液の交換後の測定値は、交換前後で変化する測定値を上乘せして計算した。

測定結果を図8に示す。溶液中での吊り下げ型固定では灌流培養14時間後までは 1.098mM 、培養24時間では 2.566mM 、培養41.5時間では 3.529mM であった。

これより、臓器内血管全体への循環が確保されている溶液中での吊り下げ型固定は、従来法の肝臓の保存限界である20時間を超えて、尿素合成能が維持されていることが明らかになった。

10

【0055】

9. 胆汁生産量の測定

胆汁回収回路 (チューブ88及びスコット瓶68) に回収されてくる胆汁量について、1時間ごとに回収された重量から胆汁の生産量を、電子天秤を用いて測定した。

測定結果を図9に示す。溶液中での吊り下げ型固定では灌流培養開始時から培養40時間まで毎時 0.06g の経時的な胆汁生産が確認された。

これより、臓器内血管全体への循環が確保されている溶液中での吊り下げ型固定は、従来法の肝臓の保存限界である20時間を超えて、胆汁生産能が維持されていることが明らかになった。

【0056】

20

10. 腎臓の摘出及び前灌流回路への接続

ラットから腎臓を摘出し、腎臓の灌流培養に用いる灌流液流入/流出用カニューレ20、30を介して、肝臓の代わりに図5に示す前灌流回路に接続した。

ジエチルエーテル (Wako) をデシケーター内に充満させ、8-10週齢Wistarラット (SLC) をデシケーターに移動させて吸引麻酔した後、25G注射針 (Terumo) と1mlシリンジ (Terumo) を用いて終濃度 25mg/ml のペントバルビタールナトリウム (TCI, Tokyo, Japan) 溶液 $400\mu\text{l}$ を腹腔内に注射した。

深麻酔下のラットの下腹部から喉元までの皮膚を正中線に沿って切開した。腹膜を切開し、消化器系の臓器を移動させることで、腎臓、腎動脈、腎静脈、尿管を露出させた。腎動脈、腎静脈、尿管を周辺組織より剥離して、腎動脈、腎静脈、尿管のそれぞれの下から絹製縫合糸No.4 (Natumé) を通し、それぞれに結紮用ループを2箇所作った。前灌流回路 (図5) に 0.2ml/min で灌流液を流しておき、2つの腎動脈結紮用ループより腎臓から離れた部位で腎動脈を半切して素早く腎動脈に灌流液流入用カニューレ20を差し込んだ。直ちに背部大静脈を切断し、灌流液を流入させた。

30

2つの腎動脈結紮用ループを結紮して灌流液流入用カニューレ20を腎動脈に固定し、腎静脈を判切して素早く腎静脈に灌流液流出用カニューレ30を差し込み、2つの腎静脈結紮用ループを結紮して灌流液流出用カニューレ30を腎静脈に固定し、カニューレーション部分を少量のアロンアルファA (Daiichi Sankyo, Tokyo, Japan) で固定した。尿管を半切して尿管用カニューレ40を差し込み、ループを結紮し、アロンアルファA (Daiichi Sankyo) で固定した。

40

腎臓を摘出するために、その他の器官を切除後、腎臓周囲の脂肪組織を腎臓に連結したまま背面から腎臓を切り離した。

【0057】

11. 腎臓の灌流回路への接続

11-1. 静置固定 (従来法)

まず、腎臓を前灌流回路に接続したまま、培養容器10の固定具96に灌流液流入用カニューレ20を固定し、灌流液流出用カニューレ30を固定具98に固定し、尿管用カニューレ40も固定具 (図示せず) に固定した。尿管用カニューレ40はルアーロックフィッティング43 (ISIS) を介して培養容器10の外部へ流出する尿回収回路 (チュー

50

ブ 8 8 及びスコット瓶 6 8) に接続した。

続いて、灌流液流入用カニューレ 2 0 に接続しているシリコンチューブ (A S O N E) をペアン止血鉗子 (N a t u m e) ではさみ、一時的に液流を停止させた後、直ちに灌流液流出用カニューレ 3 0 をルアーロックフィッティング 3 3 (I S I S) を用いてチューブ 8 2 に連結し、灌流回路に接続した。その後、直ちに灌流液流入用カニューレ 2 0 をルアーロックフィッティング 2 3 (I S I S) を用いて前灌流回路から切り離し、灌流液流入用カニューレ 2 0 とチューブ 8 0 とを、ルアーロックフィッティング 2 3 (I S I S) を介して連結することで、腎臓への気泡の混入を防止するために予め培養液を満たして気泡を除去しておいた灌流回路と無菌的に接続した。さらに、これと同時に、灌流回路のペアン止血鉗子 (N a t u m e) を取り外すことで灌流回路の液流を開始した。

10

腎臓は、培養容器 1 0 内の台上に載置した。

1 1 - 2 . 溶液中での吊り下げ型固定 (本願発明の方法)

まず、腎臓を前灌流回路に接続したまま、腎臓と腎動脈、腎静脈、尿管を腎臓との位置関係を維持したままシリコンラバーの上へ移し、灌流液流入用 / 流出用 / 尿管用カニューレ 2 0 , 3 0 , 4 0 を 2 5 G 注射針 (T e r u m o) を用いてシリコンラバーに固定した。各カニューレの固定は、2 本の注射針を交差させて各カニューレを跨ぐようにシリコンラバーに刺すことで、抑え込むように固定した。さらに、腎臓周囲の脂肪組織を 2 5 G 注射針 (T e r u m o) を用いてシリコンラバーに固定した。

培養容器 1 0 の固定具 9 6 に灌流液流入用カニューレ 2 0 を固定し、灌流液流出用カニューレ 3 0 を固定具 9 8 に固定し、尿管用カニューレ 4 0 も固定具 (図示せず) に固定した。尿管用カニューレ 4 0 はルアーロックフィッティング 4 3 (I S I S) を介して培養容器 2 0 の外部へ流出する尿回収回路 (チューブ 8 8 及びスコット瓶 6 8) に接続した。

20

続いて、灌流液流入用カニューレ 2 0 に接続しているシリコンチューブ (A S O N E) をペアン止血鉗子 (N a t u m e) ではさみ、一時的に液流を停止させた後、直ちに灌流液流出用カニューレ 3 0 をルアーロックフィッティング 3 3 (I S I S) を用いてチューブ 8 2 に連結し、灌流回路に接続した。その後、直ちに灌流液流入用カニューレ 2 0 をルアーロックフィッティング 2 3 (I S I S) を用いて前灌流回路から切り離し、灌流液流入用カニューレ 2 0 とチューブ 8 0 とをルアーロックフィッティング 2 3 (I S I S) を介して連結することで、肝臓への気泡の混入を防止するために予め培養液を満たして気泡を除去しておいた灌流回路と無菌的に接続した。さらに、これと同時に、予めはさんでおいたペアン止血鉗子 (N a t u m e) を取り外すことで灌流回路の液流を開始した。

30

腎臓が固定されたシリコンラバーを反転させて腎臓を吊り下げ、絹製縫合糸 No . 4 (N a t u m e) 1 0 6 を用いてシリコンラバーを培養容器 1 0 付属の固定具 1 0 8 に固定後、培養容器 1 0 内部に P B S (-) を満たして腎臓を浮遊させた。培養容器を密閉してから流入用カニューレが下側に来るように培養容器 1 0 を縦置きし、腎臓を周囲の脂肪組織で吊り下げて浮遊させた。

【 0 0 5 8 】

1 2 . 腎臓の灌流培養

灌流液流入用カニューレ 2 0 とマイクロキャリアスピナーフラスコ 6 2 (B e l l c o) の間のペリスタルティックポンプ 7 0 (I W A K I) を尿量が 0 . 3 m l / hour となるように適時調節し、腎臓へ灌流液を流入させた。

40

培養容器をスピナーフラスコ 6 2 よりも垂直方向に持ち上げて静置することで、高低差による重力によって腎臓から灌流液を流出させた。その他は肝臓の灌流培養と同様とした。

1 3 . 障害酵素活性の測定

尿回収回路 (チューブ 8 8 及びスコット瓶 6 8) に回収されてくる尿を、5 0 μ l ずつ 0 . 5 m l チューブ (e p p e n d o l f , H a m b u r g , G e r m a n y) に分注し、- 8 0 で凍結保存した。後日、凍結保存した尿を溶解し、1 5 0 0 0 r p m で 5 分間遠心分離して、その上清の G O T / G P T 酵素活性をトランスアミナーゼ C I I - テストワコー (W a k o) に添付された方法に従って測定した。

50

測定結果を図10に示す。培養40時間後の通常の静置固定(11-1)ではGOTが0.6IU/Kidney以上でGPTが0.08IU/Kidney以上であるのに対して、溶液中での吊り下げ型固定(11-2)では約GOTが0.1IU/KidneyでGPTはほぼ0IU/Kidneyであった。さらに、培養60時間後の溶液中での吊り下げ型固定(11-2)では、GOTは約0.3IU/Kidneyであり、GPTは約0.01IU/Kidneyであった。これより、溶液中での吊り下げ型固定は、通常の静置固定に比べて、臓器の障害が抑制されていることが明らかになった。

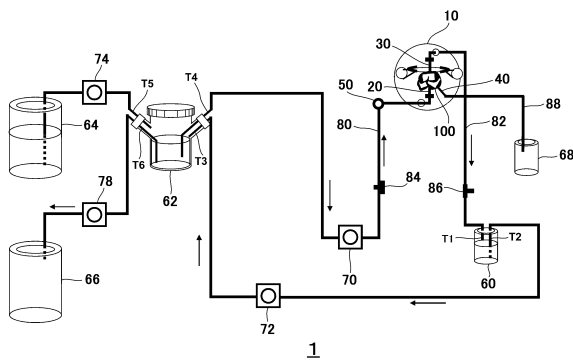
【符号の説明】

【0059】

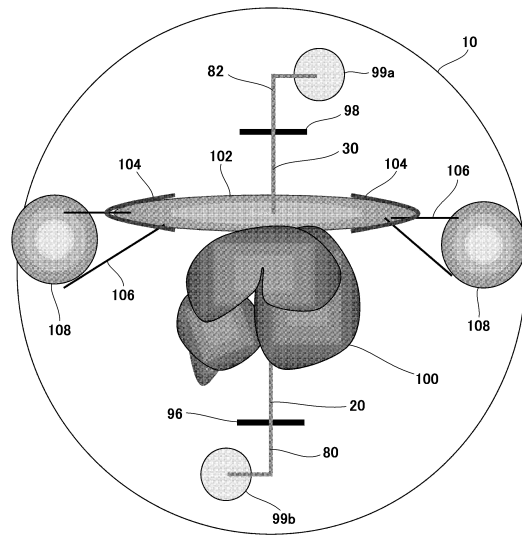
1...臓器灌流培養装置; 10...培養容器; 20...灌流液流入用カニューレ; 21、31、41、109、110、111...肝臓用/腎臓用カテーテル部分; 22、32、42...パラフィルム; 23、33、43...パラフィルム; 24、34...軟性絹製縫合糸; 25、35、45...シリコンチューブ; 30...灌流液流出用カニューレ; 40...胆管用/尿管用カニューレ; 50、50'...気泡除去装置; 60、64、66、68、92...スコット瓶; 62...マイクロキャリアスピナーフラスコ; 70、72、74、78、94...ポンプ; 80、82、88...チューブ; 84、86...流路切り替えコック; 96、98...固定具; 99a、99b...貫通孔; 100...肝臓; 102...横隔膜; 104...肋骨; 106...縫合糸、108...固定具

10

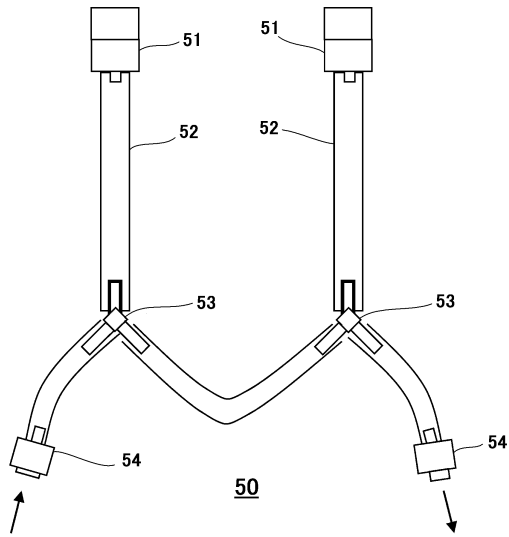
【図1】



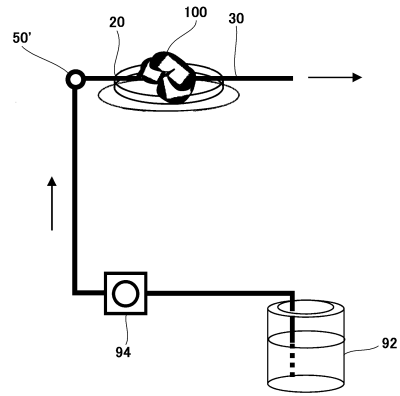
【図2】



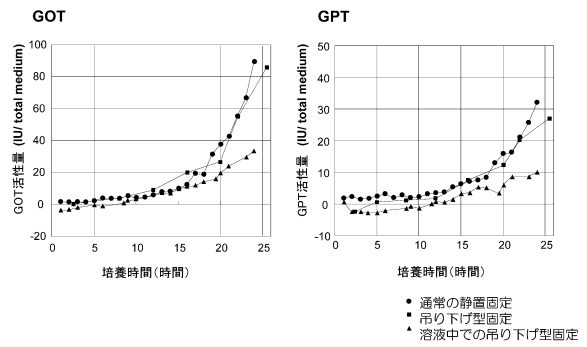
【 図 4 】



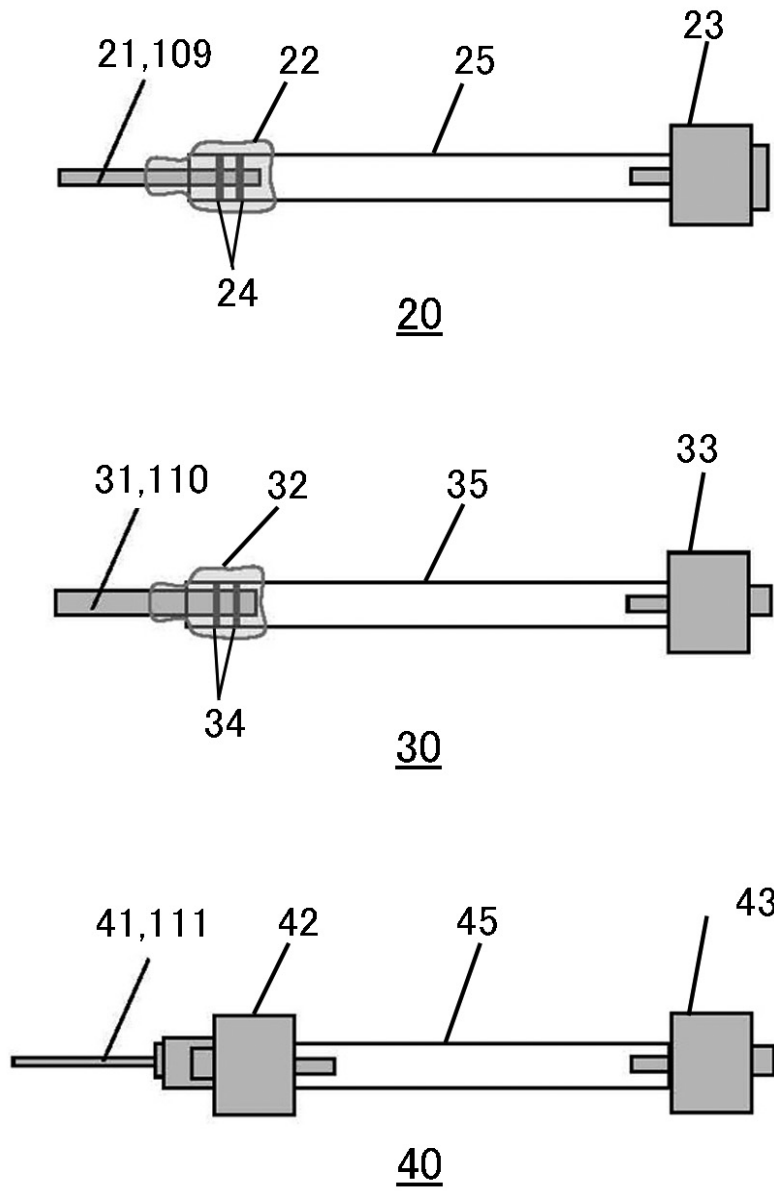
【 図 5 】



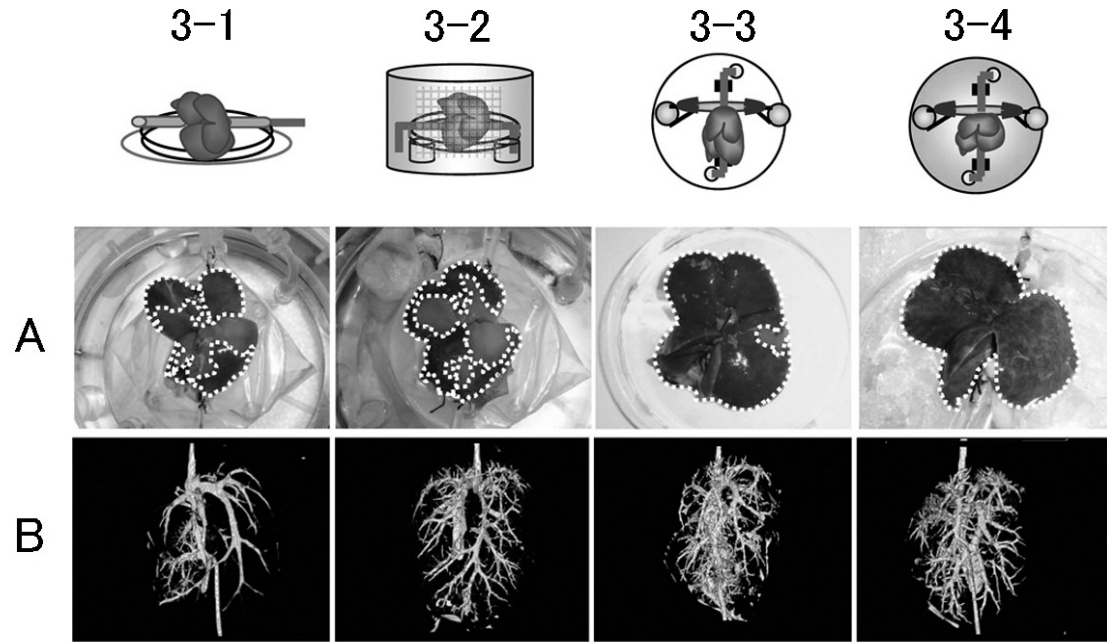
【 図 7 】



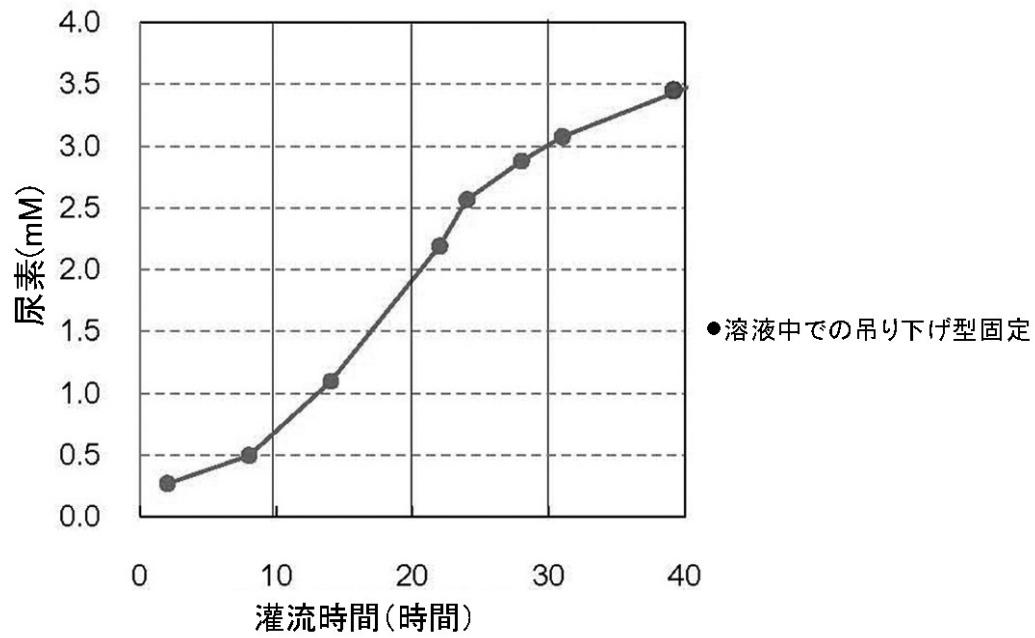
【図3】



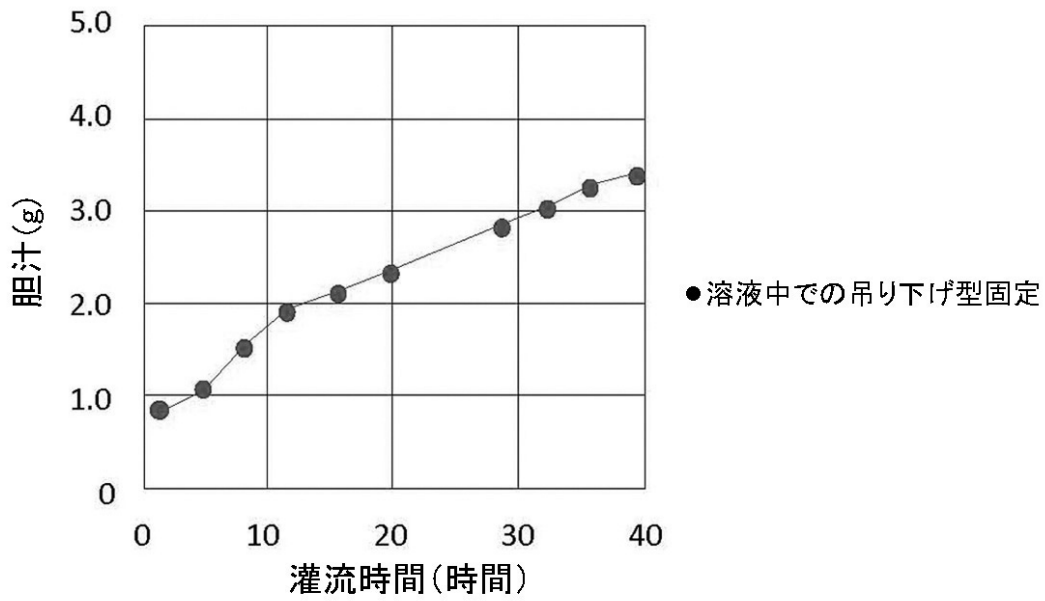
【 図 6 】



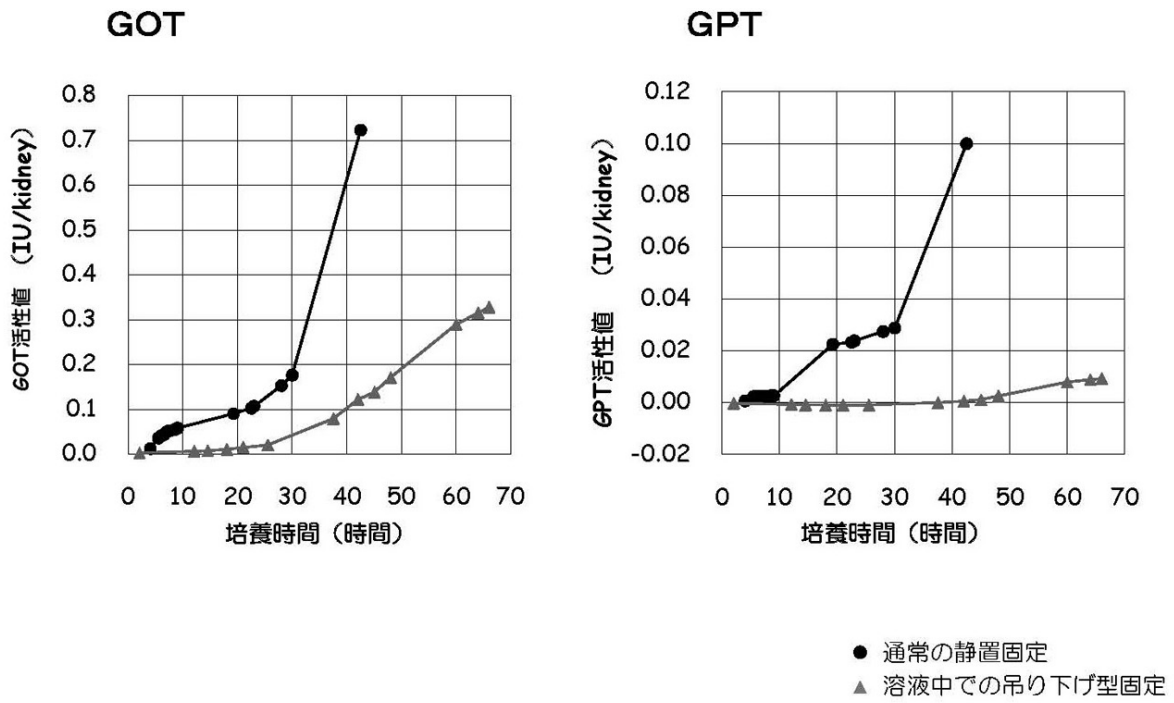
【 図 8 】



【 図 9 】



【 図 1 0 】



フロントページの続き

審査官 渡邊 潤也

(56)参考文献 特表2001-516768(JP,A)
特開2003-206201(JP,A)
特開平11-164684(JP,A)

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

C12M 1/00, 3/00

A01N 1/02

C12N 5/071

A61K 27/00

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamIII)

CPlus/MEDLINE/BIOSIS/WPIDS(STN)