

平成27年5月21日判決言渡 同日原本領収 裁判所書記官

平成26年(行ケ)第10165号 審決取消請求事件

口頭弁論終結日 平成27年4月28日

判 決

原 告 ユニバーシティ・オブ・シンシナティ

訴訟代理人弁理士 大 島 陽 一  
同 木 村 政 彦  
同 高 尾 智 満

被 告 特 許 庁 長 官  
指 定 代 理 人 安 藤 倫 世  
同 郡 山 順  
同 井 上 猛  
同 根 岸 克 弘

主 文

- 1 原告の請求を棄却する。
- 2 訴訟費用は原告の負担とする。
- 3 この判決に対する上告及び上告受理の申立てのための付加期間を30日と定める。

事実及び理由

第1 請求

特許庁が不服2012-3237号事件について平成26年2月25日にした審決を取り消す。

第2 事案の概要

## 1 特許庁における手続の経緯等

(1) 原告は、発明の名称を「赤血球の保存のための組成物及び方法」とする発明について、2005年（平成17年）2月17日を国際出願日とする特許出願（特願2007-556120号。以下「本願」という。）をした。

原告は、平成22年11月17日付けの拒絶理由通知を受けたため、平成23年4月25日付けで本願の特許請求の範囲について手続補正（以下「本件補正」という。甲15）をしたが、同年10月6日付けの拒絶査定（甲16）を受けた。

原告は、平成24年2月20日、拒絶査定不服審判を請求した（甲17）。

(2) 特許庁は、上記請求を不服2012-3237号事件として審理を行い、平成26年2月25日、「本件審判の請求は、成り立たない。」との審決（出訴期間の付加期間90日。以下「本件審決」という。）をし、同年3月11日、その謄本が原告に送達された。

(3) 原告は、平成26年7月9日、本件審決の取消しを求める本件訴訟を提起した。

## 2 特許請求の範囲の記載

本件補正後の特許請求の範囲の請求項1の記載は、次のとおりである（以下、請求項1に係る発明を「本願発明」という。甲15）。

### 「【請求項1】

赤血球を1～6℃で保存するための水性組成物であって、

前記組成物は、アデニンと、デキストロースと、少なくとも1つの非代謝性の膜保護糖と、pH緩衝系とを含んでおり、

前記pH緩衝系は、重炭酸アニオンを提供する少なくとも1つの物質と、リン酸アニオンを提供する少なくとも1つの物質と、ナトリウムカチオンを提供する少なくとも1つの物質とを含む生理学的に許容される緩衝剤の組み合わせを有し、

前記pH緩衝系は、1, 3-DPGからの2, 3-ジホスホグリセレート(DPG)の合成よりも解糖を優先する赤血球内の反応平衡を保存期間中に確立及び維持するのに十分な量の前記組成物が加えられる赤血球(RBC)懸濁液のpHを前記組成物が維持する働きをするのに十分な量で存在し、それによって、保存期間中に前記反応平衡でアデノシン三リン酸(ATP)合成が発生し、前記組成物は、外部由来の塩化物イオンを含まないことを特徴とする水性組成物。」

### 3 本件審決の理由の要旨

- (1) 本件審決の理由は、別紙審決書(写し)記載のとおりである。要するに、本願発明は、本願の出願前に頒布された刊行物である「Transfusion (2003), Vol. 43, No. 7, p. 867-872」(以下「刊行物1」という。原文甲1・訳文乙1)に記載された発明及び周知の技術的事項に基づいて当業者が容易に発明をすることができたものであって、特許法29条2項の規定により特許を受けることができないから、本願は拒絶すべきものであるというものである。
- (2) 本件審決が認定した刊行物1に記載された発明(以下「引用発明」という。)、本願発明と引用発明の一致点及び相違点は、以下のとおりである。

#### ア 引用発明

「以下の組成を有し、赤血球に対して300mlの体積で用いられる組成物EAS-76v6。

塩化ナトリウム	30.0mM
重炭酸ナトリウム	30.0mM
リン酸2ナトリウム	9.0mM
アデニン	2.0mM
デキストロース	50.0mM
マンニトール	30.0mM
pH	8.4

#### イ 本願発明と引用発明の一致点

「赤血球を保存するための水性組成物であって、前記組成物は、アデニンと、デキストロースと、少なくとも1つの非代謝性の膜保護糖と、pH緩衝系とを含んでおり、前記pH緩衝系は、重炭酸アニオンを提供する少なくとも1つの物質と、リン酸アニオンを提供する少なくとも1つの物質と、ナトリウムカチオンを提供する少なくとも1つの物質とを含む生理学的に許容される緩衝剤の組み合わせを有する水性組成物。」である点。

#### ウ 本願発明と引用発明の相違点

##### (相違点1)

本願発明では、赤血球を保存する温度が「1～6℃」であるのに対し、引用発明では、そのような特定がない点。

##### (相違点2)

本願発明では、pH緩衝系が「1,3-DPGからの2,3-ジホスホグリセレート(DPG)の合成よりも解糖を優先する赤血球内の反応平衡を保存期間中に確立及び維持するのに十分な量の前記組成物が加えられる赤血球(RBC)懸濁液のpHを前記組成物が維持する働きをするのに十分な量で存在し、それによって、保存期間中に前記反応平衡でアデノシン三リン酸(ATP)合成が発生」するものであるのに対し、引用発明では、そのような特定がない点。

##### (相違点3)

本願発明では、水性組成物が「外部由来の塩化物イオンを含まない」ものであるのに対し、引用発明では、そのような特定がない点。

### 第3 当事者の主張

#### 1 原告の主張

##### (1) 取消事由1 (相違点2の判断の誤り)

本件審決は、相違点2について、①本願発明のpH緩衝系の「前記組成物

が加えられる赤血球（RBC）懸濁液のpHを前記組成物が維持する」働きは、pH緩衝系のそもそもの働きである、②引用発明のpH緩衝系は、「保存期間中に前記反応平衡でアデノシン三リン酸（ATP）合成が発生」すること、すなわち、2,3-DPGの合成によってATP合成に必要な無機リン酸が消費されることを防ぎ、ATPを合成する解糖ステップが発生することにより、赤血球を良好に保存できる、狭い範囲のpHを維持することを目的とするものであり、引用発明の組成物EAS-76v6は、より高い赤血球ATP濃度を有し、十分な赤血球の回収率を得ている点で、この目的を達成しているとして、相違点2に係る本願発明の構成は、公知のpH緩衝系の機能に言及したものにすぎず、pH緩衝系の特定という観点からみて、相違点2は実質的な相違点とはいえない旨判断した。

しかしながら、本願発明の「前記pH緩衝系は、1,3-DPGからの2,3-ジホスホグリセレート（DPG）の合成よりも解糖を優先する赤血球内の反応平衡を保存期間中に確立及び維持するのに十分な量の前記組成物が加えられる赤血球（RBC）懸濁液のpHを前記組成物が維持する働きをするのに十分な量で存在し、それによって、保存期間中に前記反応平衡でアデノシン三リン酸（ATP）合成が発生し」との発明特定事項は、赤血球のpHが維持されるように、本願発明の水性組成物中の「pH緩衝系」の量について「十分な量」と特定したものである。

すなわち、本願の願書に添付した明細書（以下、図面を含めて「本願明細書」という。甲19）の段落【0031】に、「2,3-DPGの合成速度は、pHに比例する。pHが7.2よりも高い場合は、前記合成は著しく行われるが、それよりも低い場合は、低下する。保存系のpHを上昇させることで2,3-DPG合成を増大させると、2,3-DPG分子が合成されるごとにATP合成が1モルずつ減少するので、この試みには限界がある。したがって、従来望ましいと考えられたRBCの2,3-DPG濃度の上昇は、

実際には、RBCの保存期間を減少させる。」との記載があり、相違点2に係る本願発明の構成は、pH緩衝系を構成する物質が段落【0031】記載のような結果を引き起こすpHの上昇を防ぐために「十分な量」で存在することを特定したものである。

また、本願発明は、相違点2に係る本願発明の構成と「前記組成物は、外部由来の塩化物イオンを含まないこと」等の他の発明特定事項と協働して、本願明細書の段落【0072】記載のとおり、「一般的に本発明に係るEAS-81で保存された細胞は、AS-3で保存された細胞と比較して、エネルギー利用が優れており、それによりATP濃度が高く、溶血の程度が低く、形態が優れており、微小胞が少なく、pHがわずかに高かった。」という効果を奏するとともに、「EAS-81よりも古いEAS、特にEAS-76v6は、幾つかの点において、より優れた作用をするが、使用される容量が多いために、保存RBCがさらに希釈され、大量に輸血される患者に対して血液希釈を引き起こしかねない。」という刊行物1記載のEAS-76v6における問題を解決したものである。

そして、本願明細書の段落【0061】の表1によれば、本願発明の実施形態であるEAS-81の使用量は110mLであるのに対して、刊行物1記載のEAS-76v6の使用量は170mLであり、本願発明は、塩化物イオンを含まないことによりpH緩衝系の量を調整することができ、赤血球に添加される水性組成物の量を減らすことができる。

以上のとおり、相違点2に係る本願発明の構成は、公知のpH緩衝系の機能に言及しただけでなく、赤血球のpHが維持されるように、本願発明の水性組成物中の「pH緩衝系」の量を「十分な量」と特定したものであるから、引用発明との実質的な相違点であるといえる。

したがって、相違点2は実質的な相違点とはいえないとした本件審決の上記判断は誤りである。

(2) 取消事由 2 (相違点 3 の判断の誤り)

本件審決は、相違点 3 について、①刊行物 1 には、45, 40, 35, 30 mEq/l の塩化ナトリウムを含有する実験添加液 76 (EAS-76) の 4 つの型を比較することで、塩化ナトリウムの量を低減することにより、赤血球の溶血を減少させ、形態変化を抑制できることが記載されていること、②アデニン、デキストロース、マンニトール、リン酸のナトリウム塩を含む赤血球長期保存水溶液であって、塩化ナトリウムを含まないものが、「本願の優先日前」に周知であったこと(例えば、刊行物 A (特表 2000-516963 号公報。甲 2)、刊行物 B (特表平 5-503304 号公報。甲 3) 及び刊行物 C (特表平 5-503075 号公報。甲 4) の ARC30 参照) によれば、当業者であれば、塩化ナトリウムを必須の成分であると認識していたものとはいえ、引用発明について、刊行物 1 において低減することが強く動機付けられる塩化ナトリウムの低減をさらにすすめることにより、これを含まない組成とすることが、当業者にとって格別困難であったとはいえない旨判断したが(本件審決 16 頁 36 行～17 頁 13 行。判決注・本願は優先権主張を伴うものではないから、本件審決の上記「本願の優先日前」との記載は「本願の出願日前」の誤記と認められる。以下同じ。)、以下のとおり誤りである。

ア 刊行物 1 の記載事項

本願発明の「前記組成物は、外部由来の塩化物イオンを含まないこと」という発明特定事項は、組成物中の pH 緩衝系の必要量を変え、赤血球の pH を維持させるものである。

刊行物 1 には、例えば、「結果：より低い塩の型の EAS-76 中に保存された赤血球は、より少ない溶血と微小胞形成で、より高い赤血球 ATP 濃度を有していた。」(甲 1 の 867 頁左欄・乙 1 の 1 頁)、「より低いナトリウムとクロライドの濃度にもかかわらず、カリウムの損失はすべ

ての条件下で同じであった（図2B-D）」（甲1の870頁左欄41行～43行・乙1の頁～8頁）と記載されているように、塩化ナトリウム濃度の低い赤血球長期保存溶液が、塩化ナトリウム濃度のより高い赤血球長期保存溶液と同等以上の赤血球保存能力を備え得ることが示唆されている。

しかしながら、刊行物1記載の全ての組成物（赤血球長期保存溶液）は、塩化ナトリウム濃度が最低のEAS-76v6でさえ、その濃度は30mMであって、30mM以上の塩化ナトリウムを含むため（甲1の表1及び表3）、「外部由来の塩化物イオン」を含むものである。また、刊行物1には、赤血球長期保存溶液において、塩化ナトリウムを「30mM」から「0」とし、「外部由来の塩化物イオンを含まない構成」とすることについて記載も示唆もない。

そうすると、刊行物1に接した当業者は、刊行物1記載の全ての組成物（赤血球長期保存溶液）について塩化ナトリウムは必須の成分であると考えから、引用発明の組成物EAS-76v6について、塩化ナトリウムを含まない構成（相違点3に係る本願発明の構成である「外部由来の塩化物イオンを含まない」構成）とする動機付けはない。

#### イ 周知技術の認定の誤り

(ア) pH緩衝系は、その成分や適用される水溶液の性質によって、その能力は変動する。赤血球長期保存水溶液に塩化ナトリウムを含めない目的や、他の含有成分との関係も様々であるから、仮に特定の成分を有する赤血球長期保存水溶液において塩化ナトリウムを含まない構成が周知であったとしても、塩化ナトリウムを含まないことを赤血球長期保存水溶液の含有成分と分離した単独の特徴として把握することは困難である。

本願発明は、「重炭酸アニオン ( $\text{HCO}_3^-$ )」を提供する少なくとも

1つの物質を有する「pH緩衝系」を含み、かつ、「外部由来の塩化物イオンを含まない」水性組成物であり、「重炭酸アニオンを提供する物質」が存在することは、重要な特徴である。例えば、本願明細書の図2（別紙本願明細書図面参照）は、重炭酸ナトリウムを含まないAS-3と重炭酸ナトリウムを含むEAS-81（本願発明の実施例）について、これらに保存された後の赤血球の回収率を比較しているが、AS-3は、7週間後で回収率が約71%であるのに対して、EAS-81では、8週間後で回収率が約87%であり、重炭酸ナトリウムを含むEAS-81の方が赤血球の回収率が高いことは明らかであり、本願発明は、「重炭酸アニオンを提供する物質」を含むことにより、顕著な効果を奏している。

しかるところ、刊行物AないしC（甲2ないし4）に、塩化ナトリウムを含まない赤血球長期保存水溶液（OFAS1溶液）が記載されていることは認めるが、刊行物AないしC記載の赤血球長期保存水溶液には、「重炭酸アニオンを提供する物質」が含まれていない。

すなわち、刊行物A（甲2）については、「OFAS1溶液のpHは、水酸化ナトリウムの添加により約7.1に調整される。もちろん、この目的を達するのに他の塩基を使用してもよい」（12頁17行～20行）との記載があるように、刊行物A記載の赤血球長期保存水溶液は、水酸化ナトリウム等の強塩基でpHを調整しており、「重炭酸アニオンを提供する物質」を含むpH緩衝系を含まない。

次に、刊行物B（甲3）については、「好ましくは、溶液は塩化ナトリウムを含まない。しかしながら、生理学的浸透圧より僅かに大きい浸透圧を提供するためには、溶液中に最低量の塩化ナトリウムが存在している」（6頁9行～11行）との記載があるように、塩化ナトリウムを含まないか、又は最低量の塩化ナトリウムを含む水性の赤血球貯蔵

用溶液が記載されている。

しかしながら、刊行物B記載の塩化ナトリウムを含まない溶液には、重炭酸アニオンを提供する物質も含まれておらず（甲3の表1）、また、刊行物Bの「グアノシンの存在も2, 3-BPGの維持に有益であると思われる」（甲3の5頁右下欄24行～25行）との記載は、グアノシンを含む組成物が赤血球の保存に適することを示唆している。このように刊行物B記載の赤血球長期保存水溶液は、「重炭酸アニオンを提供する物質」を含まず、かつ、グアノシンを含む組成物であるのに対して、本願発明の赤血球長期保存溶液は、重炭酸アニオンを提供する物質を含み、グアノシンを含まない組成物である点で異なる。

さらに、刊行物C（甲4）については、「貯蔵緩衝液が塩化物イオンを欠いている」（請求項15）と記載されているように、塩化物イオンを含まない赤血球貯蔵溶液が記載されているが、刊行物Cの表1及び表2記載の溶液には、いずれも「重炭酸アニオンを提供する物質」が含まれていないから、刊行物C記載の赤血球長期保存水溶液は、「重炭酸アニオンを提供する物質」を含まない。

そうすると、「重炭酸アニオンを提供する物質」が含まれていない赤血球長期保存水溶液を記載した刊行物AないしCから、本願発明のように重炭酸アニオンを提供する物質を含むpH緩衝系を有する赤血球長期保存水溶液において、塩化ナトリウムを含まない構成のものが周知であったことを裏付けることはできない。

(イ) 被告が本件訴訟で提出した「Transfusion, 1971, Vol. 11, No. 3, p. 123-133」（乙2）には、重炭酸アニオン（ $\text{HCO}_3^-$ ）を含む赤血球長期保存水溶液が記載されているが、培地の正確な組成が掲載されていないため、本願発明の組成物の重炭酸アニオン以外の他の成分を含むか否か、含むとすればその量はどのくらいかを知ることはできず、また、外部由

来の塩化物イオンを含まない培地の開示もない。

さらに、乙2には、「ドナーN. O. , A. O. 及びR. W. のものに、130 mLのNaHCO<sub>3</sub>（重炭酸ナトリウム）を含む培地を供給した結果、最終的なpHは高くなった。しかしながら、これは、生存能力の一貫した増加を伴わなかった。」（原文129頁左欄27行～31行、訳文甲21参照）との記載がある。この記載は、赤血球保存溶液から塩化物イオンを除き、重炭酸イオンを加えることに価値を見出していないことを示すものである。

したがって、乙2から、重炭酸アニオンを含み、塩化ナトリウムを含まない赤血球長期保存水溶液が、本願の出願前に周知であったということとはできない。また、仮に乙2に重炭酸アニオンを含み、塩化ナトリウムを含まない赤血球長期保存水溶液の開示があるとしても、乙2の公知文献のみから、上記赤血球長期保存水溶液が周知であったということとはできない。

(ウ) したがって、刊行物AないしC及び乙2から、アデニン、デキストロース、マンニトール、リン酸のナトリウム塩を含む赤血球長期保存水溶液であって、塩化ナトリウムを含まないもの一般について本願の出願日前に周知であったということとはできないから、本件審決における周知技術の認定には誤りがある。

また、刊行物AないしC及び乙2から、重炭酸アニオン(HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>)を含み、塩化ナトリウムを含まない赤血球長期保存水溶液が、本願の出願前に周知であったということもできない。

#### ウ 容易想到性の判断の誤り

(ア) 前記アのとおり、刊行物1に接した当業者は、刊行物1記載の全ての組成物（赤血球長期保存溶液）について塩化ナトリウムは必須の成分であると考えから、引用発明の組成物EAS-76v6について、塩

化ナトリウムを含まない構成（相違点3に係る本願発明の構成である「外部由来の塩化物イオンを含まない」構成）とする動機付けはなく、かえって、引用発明の組成物E A S - 7 6 v 6から塩化ナトリウムを除去することには阻害事由がある。

次に、前記イのとおり、刊行物AないしC及び乙2から、アデニン、デキストロース、マンニトール、リン酸のナトリウム塩を含む赤血球長期保存水溶液であって、塩化ナトリウムを含まないもの一般について本願の出願日前に周知であったということはできないし、また、重炭酸アニオン ( $\text{HCO}_3^-$ ) を含み、塩化ナトリウムを含まない赤血球長期保存水溶液が、本願の出願前に周知であったということもできない。

(イ) 以上によれば、当業者は、引用発明において、塩化ナトリウムを含まない構成（相違点3に係る本願発明の構成である「外部由来の塩化物イオンを含まない」構成）を容易に想到することができたものはいえない。

したがって、これと異なる本件審決の判断は誤りである。

### (3) まとめ

以上によれば、本願審決には、相違点2及び3の判断に誤りがあり、本願発明は、刊行物1に記載された発明及び周知技術に基づいて当業者が容易に発明をすることができたものであるとした本件審決の判断は誤りである。

したがって、本件審決は、違法であるから、取り消すべきものである。

## 2 被告の主張

### (1) 取消事由1（相違点2の判断の誤り）に対し

ア 刊行物1（甲1）には、pHが6.4まで下がると「解糖は著しく遅くなり」、赤血球ATP濃度は減少し、膜損傷が増加すること、pHが7.0を上回ると、「いっそう速い解糖が使用量を超過するATP生産量を導くが、pHが7.2を上回る場合、「結果として生じる細胞内無機リン酸

の枯渇とATP生産の阻害を伴い、解糖は、(1, 3-DPGの転換による) 2, 3-DPG生産に転じる」こと、「pH操作の範囲は小さい」ことが記載されており(訳文(乙1) 8頁21行~9頁7行, 10頁6行~8行), また、「増加した解糖が、体積と添加液の緩衝能を増加させることにより、受け入れられ得る」こと、「本研究では、30meq/lの重炭酸ナトリウムの添加が9mmolのプロトンをバッファリングし、ヘモグロビンによりバッファリングされた8に加えて、12週間の間、6.6を上回るpHと、3μmol/gヘモグロビンを上回る赤血球ATP濃度が維持されるようになる」ことについても記載されている(訳文(乙1) 9頁23行~27行)。

したがって、刊行物1には、2, 3-DPGの合成によってATP合成に必要な無機リン酸が消費されることを防ぎ、ATPを合成する解糖ステップが発生することにより、赤血球を良好に保存できる、狭い範囲のpH(特にpH6.6~7.2)を維持することが、pH緩衝系の果たすべき機能として記載されている。

また、刊行物1の記載事項(訳文(乙1) 1頁20行~23行, 3頁11行~13行)によれば、引用発明の組成物EAS-76v6は、高い赤血球ATP濃度を有し、十分な赤血球の回収率を得ているから、本願発明と同様の機能を果たすものといえる。

したがって、「pH緩衝系は、…十分な量で存在し、それによって、保存期間中に反応平衡でATP合成が発生する」という相違点2に係る本願発明の構成は、pH緩衝系の公知の機能を述べたものであって、「量」という言葉を用いたpH緩衝系の機能の説明にすぎず、量を具体的数値で示したのではないから、かかる観点から、相違点2を実質的な相違点ではないとした本件審決の判断に誤りはない。

イ 仮に相違点2に係る本願発明の構成は「pH緩衝系の量」を「十分な量」

という機能で特定したものであるとしても、本願明細書（甲 1 4）の段落【0043】に「本発明者らは、本明細書で開示されている利点を可能にするために、組成物の必要な成分の範囲を決定した。本発明に係る組成物のある実施形態では…さらに具体的な実施形態では、組成物は…約 22～40 mMの重炭酸ナトリウムと、約 7～15 mMのリン酸 2 ナトリウムとを含む。」との記載があるのに対して、引用発明は、pH緩衝系として、「30.0 mMの重炭酸ナトリウム」と「9.0 mMのリン酸 2 ナトリウム」を含有しているのであるから、本願明細書で開示されている「利点を可能にするため」の「組成物の必要な成分の範囲」内の量である、「約 22～40 mMの重炭酸ナトリウム」に相当する 30 mMの重炭酸ナトリウムと、「約 7～15 mMのリン酸 2 ナトリウム」に相当する 9 mMのリン酸 2 ナトリウムとを含むものといえる。

そうすると、引用発明の E A S - 7 6 v 6 には、pH緩衝系が「利点を可能にするため」の「必要な成分の範囲」存在したものであるから、「十分な量で存在」していたといえる。

したがって、相違点 2 は実質的な相違点でないとした本件審決の判断に誤りはない。

ウ 以上によれば、原告主張の取消事由 1 は理由がない。

(2) 取消事由 2（相違点 3 の判断の誤り）に対し

ア 刊行物 1 の記載事項について

刊行物 1（甲 1）には、「赤血球の形態学は全ての型で良好であり、そしてほんのわずかだけ、低塩の型に保存された細胞が、より良かった（図 1 G）。溶血は全ての型で許容範囲内であったが、共分散分析を最後の 3 週間にわたり時間平均したとき、低塩の型において少しより低いものであった（図 1 H）。上澄み液で測定された微小胞タンパク質は低塩の型がより低かったが、ただぎりぎりの有意性（ $p = 0.062$ ，表 3）を達成する

程度であった」（訳文（乙1）7頁25行～30行）との記載があり、低塩の型にすることで効果があったことが示されている。

また、刊行物1には、「本研究では、EAS-76中の塩化ナトリウム濃度を45mMから30mMに下げたときに、溶血および微小胞形成の少ない、良好な赤血球ATPおよび2,3-DPGの維持が得られる結果となることを示すデータを提示する。」（訳文（乙1）3頁11行～13行）との記載がある。

一方で、刊行物1には、塩分量の作用について、「ただ添加液の塩分量だけが平均赤血球容積に影響を与えるように思われた。」（訳文（乙1）8頁3行～4行）と述べているだけで、塩化ナトリウムが必須成分であることの示唆はない。

したがって、刊行物1に接した当業者が、刊行物1記載の全ての組成物（赤血球長期保存溶液）について塩化ナトリウムを必須の成分であると考えるとの原告の主張は理由がない。

#### イ 周知技術について

刊行物AないしC（甲2ないし4）の記載事項は、「アデニン、デキストロース、マンニトール、リン酸のナトリウム塩を含む赤血球長期保存水溶液であって、塩化ナトリウムを含まないもの」が、本願の出願前に周知であったことを示している。例えば、刊行物C（甲4）に「該生物学的に適合しうる貯蔵緩衝液が塩化物イオンを欠いている」（請求項15）と、緩衝液の種類を特定することなく塩化物イオンを欠いていることが記載されているように、刊行物Cは、特定の緩衝液の種類を前提としたものではなく、緩衝液の種類と塩化物イオンの存在とは無関係である。

また、乙2には、重炭酸アニオン（ $\text{HCO}_3^-$ ）を含み、塩化ナトリウムを含まない赤血球長期保存水溶液が記載されている（訳文124頁右欄17行～39行、128頁の表3及びその脚注）。

そうすると、刊行物AないしC及び乙2の記載事項によれば、重炭酸アニオンを含むか、含まないかにかかわらず、本願の出願日前に、赤血球長期保存水溶液であって、塩化ナトリウムを含まないものが当業者に普通に知られていたものといえる。

したがって、「アデニン、デキストロース、マンニトール、リン酸のナトリウム塩を含む赤血球長期保存水溶液であって、塩化ナトリウムを含まないもの」が、本願の出願日前に周知であったとした本件審決の認定に誤りはない。

#### ウ 容易想到性について

刊行物1には、塩化ナトリウムを減少させた方が望ましいことが記載されていること、緩衝液の種類にかかわらず、塩化ナトリウムを含まない赤血球長期保存液が、本願の出願前に周知であったことからすると、引用発明において、塩化ナトリウムを含まない構成（相違点3に係る本願発明の構成である「外部由来の塩化物イオンを含まない」構成）とすることについて十分な動機付けがあるといえる。

そして、そもそも、塩化ナトリウムは、赤血球長期保存液の技術分野において、浸透圧調整のために広く用いられており（例えば、刊行物B（甲3）の4頁左上欄4行～5行、6頁左上欄9行～11行、刊行物C（甲4）の8頁左上欄7行～15行等）、他に浸透圧を補償する物質が系に存在すれば、塩化ナトリウムはあえて添加する必要がない物質であることは技術常識である。例えば、特開昭63-63616号公報（乙3）の保存溶液C（実施例2，第2表，第3表）は塩化ナトリウムを含まないものであるが、塩化ナトリウムが含まれる対応する保存溶液E（実施例3，第4表，第5表）に対して機能が劣らないことも示されている（3頁右下欄1行～5頁左上欄6行）。また、特開昭63-146824号公報（乙4）の実施例1～4の保存液は、他に浸透圧を補償する物質が系に存在するため、

塩化ナトリウムは特段添加されていない態様となっている（3頁左下欄16行～4頁左上欄17行）。

このように赤血球長期保存液の技術分野においては、浸透圧に関し、塩濃度を「等張」付近に調整するために、必要に応じて塩化ナトリウム等の塩が用いられており、塩化ナトリウムを添加しない態様もあるから、当業者であれば、引用発明のように塩化ナトリウムを加える場合も、塩化ナトリウムを加えない場合もあることを当然認識しているものといえる。

また、塩化物イオンにpHを調整する作用はないから、そもそも、pH緩衝系と塩化物イオンは無関係であり、どのような緩衝系であっても塩化物イオンは必須と認識されていた成分ではない。

したがって、引用発明について、刊行物1において低減することが強く動機付けられる塩化ナトリウムの低減をさらにすすめることにより、これを含まない組成とすることが、当業者にとって格別困難であったとはいえないとした本件審決の判断に誤りはない。

#### エ 小括

以上によれば、本件審決における相違点3の容易想到性の判断に誤りはないから、原告主張の取消事由2は理由がない。

#### (3) まとめ

以上のとおり、原告主張の取消事由はいずれも理由がなく、本願発明は、刊行物1に記載された発明及び周知技術に基づいて当業者が容易に発明をすることができたとした本件審決の判断に誤りはない。

### 第4 当裁判所の判断

#### 1 取消事由1（相違点2の判断の誤り）について

##### (1) 本願明細書の記載事項について

ア 本願発明の特許請求の範囲（請求項1）の記載は、前記第2の2のとおりである。

イ 本願明細書（甲 1 9 の「発明の詳細な説明」には、次のような記載がある（下記記載中に引用する表及び図面について別紙本願明細書図面を参照）。

（ア） 「本発明は、一般的には、赤血球（red blood cell：R B C）の保存に関する組成物及び方法に関連する。具体的には、本発明は、改善された R B C の保存組成物及び方法、及びそれらの利用法に関連する。」

（段落【0 0 0 2】）

（イ） 「【背景技術】

患者へ再注入するための赤血球（R B C）の保存方法は、現代手術の先駆けであり、比較的最近開発された技術である。この赤血球保存は科学的には困難であり、長期の保存期間の達成及び再注入される良質の赤血球の獲得のためのステップは追加されてきた。赤血球は、ドナーから採取されるとすぐに凝固し、栄養不足となり、A T P、2，3-D P G、膜の表面積及び完全性、並びにヘモグロビン（hemoglobin：H b）を失い、死に始める。1 9 1 6 年にRous及びTurner、並びに1 9 1 7 年にRobertsonが初めて全血の保存に成功した。その後、抗凝固剤としてのクエン酸と赤血球に使用される唯一の栄養素であるデキストロースとを含む酸－クエン酸－デキストロース（Acid-citrate-dextrose：A C D、1 9 4 3）、並びに代謝物質としての及び膜の維持のためのリン酸をさらに含むクエン酸－リン酸－デキストロース溶液（Citrate-phosphate-dextrose solution：C P D、1 9 5 7）の使用が全血の2 1 日間の保存に承認された。その後、アデニンを有するC P D（C P D A－1、1 9 7 9）が全血及び濃厚R B Cの保存期間を最大5週間までに延長するのに導入され、使用された。」（段落【0 0 0 3】）

「当初は、最終生産工程に行われる熱滅菌の際にグルコースがキャラメル化するのを防止するために、保存組成物は酸性になるように設計さ

れていた。1950年代にアデニンが添加物として有用であることが判明した。アデニンは、脱アミノ反応によって損失したアデニンを補う。1970年代には、血小板の除去及び血漿製剤の作成のために、採取された全血から血漿を除去することが望ましくなった。しかし、これにより、得られる「濃厚RBC」の回収率が減少した。」（段落【0004】）

「これを回避するために、添加液 (additive solutions: AS) として当該技術分野で公知の組成物が、RBC保存液の容量、栄養素及び他の有用なRBCの安定剤を再構築する目的で開発された。全血液から単離された赤血球 (RBC) を保存するための添加液の組成は、RBCの必要性に合わせて作成される。1981年には、開発されたある添加液でRBCを6週間までに保存することが可能となった。しかしながら、これらの溶液に保存された赤血球 (RBC) は、6週間後には常に劣化した。これは、人間のドナーへ再注入された赤血球の75%が24時間以内に循環系において生存できないことにより断定された。赤血球の冷蔵保存を継続すると、グルコースの消費が低下し、代謝廃棄物（すなわち、乳酸及び水素イオン）が増加することが確認された。このようなグルコースの代謝低下により、アデノシン三リン酸 (adenosine tri phosphate: ATP) が枯渇する。ATPは、循環系に戻される際のRBCの回収率に直接関連する。Adsol. RTM (AS-1), Nutri cel. RTM (AS-3), Optisol. RTM (AS-5), 及びErythroSol. RTMなどの添加液は、1~6°CでのRBCの保存を延長するように考案されている。米国で認可された3つの全てのAS (AS-1, AS-3, 及びAS-5) は、食塩水、アデニン、グルコース、並びに「細胞膜の保護剤」としての少量のクエン酸及び／又はマンニトールを含む。また、AS-3は、モノナトリウムリン酸塩

をも含む。米国で認可されたそれぞれのASは、RBCの6週間保存への使用のための認可の必要条件を満たすが、RBCを7週間保存することはできない。現在認可されているRBC添加液の組成物は、保存損傷（storage lesion）（ここでは、RBCの生存及び／又は機能を制限する保存の総合効果として定義する）がアポトーシス過程であると判明する以前に開発された。」（段落【0005】）

「保存期間後に患者に再注入されるRBCの許容されるインビボ回収率の程度を増大させるために、添加液及び保存方法を改善する試みが行われた。「Studies In Red blood cell Preservation-7. In vivo and in vitro Studies With A Modified Phosphate-Ammonium Additive Solution (Greenwalt et al., Vox. Sang. 65:87-94, 1993)」では、著者らは、20 mMの $\text{NH}_4\text{Cl}$ 、30 mMの $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ 、2 mMのアデニン、110 mMのデキストロース、55 mMのマンニトールを含む実験的な添加液（EAS-2）（pH=7.15）が人間のRBCの保存期間を現行基準である5～6週間から8～9週間に延長するのに有用であると断定した。しかしながら、EAS-2に存在するアンモニウムにより、この添加液に保存された濃厚RBCを直接注入することはできず、輸血の前に洗浄工程で上精を除去する必要がある。」（段落【0007】）

「「Studies in Red blood cell Preservation-8; Liquid Storage of Red Cells in Glycerol-Containing Additive Solution (Greenwalt et al., Vox. Sang. 67:139-143, 1994)」では、著者らは、9週間後において73%の濃厚赤血球の回収率を可能にする添加液（EAS-25）を示した。しかしながら、得られるRBC液は、約1パーセントのグリセロールを含む。したがって、人間にこのRBC液を大量に注入するのは安全ではない。」（段落【0008】）

「「Extending the Storage of Red Cells at 4. degree. C. (Meryman et al., Transfus. Sci. 15:105-115, 1994)」では、非常に希薄な懸濁液に低ヘマトクリット値で27週間ほど保存されたRBCは、許容範囲の生存率を示した。しかしながら、このように保存されたRBCは、カリウム及びアンモニアの高い含量並びにRBCの低い容量分率により、直接注入できない。この有効性を実現するためには、200mLのRBCに対して5Lの添加溶液が必要であり、これは、臨床的に実施できない。」（段落【0009】）

「認可及び市販されている製品に関しては、米国で現在認可されている添加液は、約6週間のみ保存効果があり、約80%のRBC回収率を示す。現在ヨーロッパで認可されている2つの添加液は、約7週間の保存効果があり、平均して77%の回収率（Baxter Healthcare (La Chatre, France) 市販のErythroSol) 及び75%の回収率（Maco Pharma市販のPAGGSマンニトール）を示す。Kurupら（Vox Sang 2003: 85:253-261）によって示された新規の添加液は、低濃度のATPにより、保存期間はより短いと思われる。」（段落【0010】）

「従来の発見の欠点に対応するために、本発明者らは、低量のリン酸2ナトリウムを含み、採取される血液に対するCPD（citrate-phosphate-dextrose：クエン酸塩ーリン酸ーデキストロース）などの酸性抗凝固液の効果を中和したアルカリ性の試験的な添加液（experimental additive solution：EAS）を開発した。これらのEASは、RBCのATPの濃度を改善し、溶血を減少させ、RBC膜の形態変化及び損失を減少させた（米国特許第6,150,085号及び第6,447,987号（Hess 及び Greenwalt）を参照（参照により本明細書に組み込まれるものとする））。様々なEASが9～12週間の保存に有効であることが判明した。これらのEASは、より優れた性能結果を示したが、塩

化ナトリウムを含むと共に比較的大量に使用されるように構成されている。その結果、保存されるRBCは著しく希釈されるので、大量に輸血される患者の血液が希釈される危険性が高まる。また、塩化ナトリウムを含んでいることにより、望ましい量で溶液系に溶解できるはずの緩衝塩及びリン酸の溶解度が制限される。」（段落【0011】）

「輸血可能な血液の需要が高いが、断続的である期間（戦時中など）、及び輸血可能な血液が必要だが、その需要が非一貫的及び散発的である地域では、RBC保存期間の延長は重要である。実際には、一般的な需要を把握する以前に安全な保存期間の終了のために多くのRBC製剤が無駄に廃棄されていると報告されており、それを考えると、RBCを安全に保存できる保存期間の延長は普遍的な課題である。」（段落【0012】）

「したがって、従来の添加液の量と同様に低量でRBCの回収率及び性能を維持又は高めるように構成されたRBCの保存組成物が必要である。長期の保存期間、より優れた回収率、及び注入されたRBCの生理的な性能の向上を可能にするような優れたRBC保存のための血液保存及び輸血の技術が常に必要である。したがって、より優れたRBC保存組成物及びその作成方法が必要になってくる。また、添加組成物が加えられたRBC懸濁液を人間に直接注入できるようにし、かつRBCの生理的な機能を高め、そのクリアランスの程度を低下させ、許容範囲の回収率を可能にする添加組成物も常に必要である。」（段落【0013】）

(ウ) 「【課題を解決するための手段】

したがって、本発明は、採取された赤血球の保存に適切な新規の組成物を提供する。従来、塩化ナトリウムは、保存組成物の適切な作用に必要であると考えられた。しかし、本発明者らは、このような組成物から塩化ナトリウムを実質的に除去すると、組成物の性質が向上し、pH緩

衝液系の機能が高まることを発見した。このpH緩衝液系の機能の高まりにより、保存及び再注入される赤血球の完全性及び機能性質の点、並びに必要な回収率を維持した状態及び認可のために規制法が制限するレベルを越えない溶血レベルを有する状態でRBCが保存される保存期間の点に関する利点が得られる。また、本発明の組成物は、従来の量において優れた性能を維持するので、とりわけ大量の輸血を必要とする患者に注入される赤血球の保存に適切である。」（段落【0014】）

「本発明のある実施形態は、約1～6℃における赤血球の保存のための組成物を提供する。組成物は、本質的には、アデニンと、デキストロースと、少なくとも1つの非代謝性の膜保護糖と、pH緩衝液系とを含む。pH緩衝液系は、重炭酸ナトリウムとリン酸2ナトリウムとを含み、組成物が約8～9のpHを有するのに十分な量で存在する。pH緩衝系は、1,3-DPGからの2,3-ジホスホグリセレート(DPG)の合成よりも解糖を優先する赤血球内の反応平衡を保存期間中に確立及び維持するのに十分な量の組成物が加えられる赤血球懸濁液のpHを前記組成物が維持する働きをするのに十分な量で存在し、それによって、保存期間中に反応平衡でATP合成が発生する。本発明の他の実施形態では、組成物は塩化ナトリウムを実質的に有しない。」（段落【0015】）

「本発明に係る組成物のより具体的な実施形態は、特定の組成物及びその量と、組成物のオスモル濃度及びpHの範囲とを対象にしている。他の具体的な実施形態は、赤血球のpHを特定の値の範囲で維持する働きのある本発明に係る組成物を対象にする。」（段落【0016】）

「本発明にしたがって作成された組成物及びRBC懸濁液は、注入後に十分な治療量のRBCが回収される保存期間を提供する。また、RBC注入のために確立及び承認されている公知の標準的な処理を行うこと

なく、RBC懸濁液を直接注入することができる。」（段落【0020】）

(エ) 「【発明を実施するための最良の形態】

本発明は、一般的に、赤血球（RBC）の保存に関する組成物及び方法に関連する。とりわけ、本発明は、新規の添加液と、クエン酸塩ーリン酸ーデキストロース（citrate phosphate dextrose：CPD）溶液、その溶液の異種型、クエン酸塩ーリン酸ーデキストロース2デキストロース（citrate phosphate double dextrose：CP2D）溶液、又はアフエレーシス（患者又はドナーからの全血液の除去）で酸ークエン酸ーデキストロース（acid citrate dextrose：ACD）溶液若しくは同様な溶液に採取された全血から分離されたRBCの保存に関する方法とに関連する。」（段落【0022】）

「本発明の目的上、「回収」という用語は、保存されたRBCの一部が人間に再注入された後の24時間の間に循環系に留まることを示す意味で本明細書で使用されている。」（段落【0023】）

「本明細書で使用されている「塩化物」は、アニオン性塩化物を意味する。したがって、「塩化物」という用語は、アニオン性塩化物及びそれらの塩（塩素アニオンと生理学的に許容されるカチオンとから作成される塩など）を含む。「塩化物」という用語は、塩素原子が共有結合している化合物（例えば、炭素原子と塩素とが共有結合した有機分子）を意味するものではない。」（段落【0024】）

「本明細書に使用されている「生理学的に許容される緩衝剤」は、人間の血液、血漿、若しくは血清に存在する、又は人間の体内に導入される際に耐容されるカチオン及びアニオンを発生させる緩衝剤を意味する。適切なカチオンとしては、陽子、アンモニウムカチオン、及び金属カチオンがある。適切な金属カチオンとしては、これらに限定されるも

のではないが、例えば、カチオン型のナトリウム、カリウム、カルシウム、及びマグネシウムがある。尚、ナトリウム及びカリウムの方が好ましく、その中でもナトリウムのカチオンが最も好ましい。アンモニウムカチオン（つまり、一般式 $R_4N^+$ の化合物（尚、Rは水素又は有機基である）は、生理学的に許容される限り使用され得る。好ましい実施形態では、カチオンは、水素（すなわち、水素イオン）と、カリウムと、アンモニウムと、マグネシウムと、それらの組み合わせとから選択される。本明細書で使用される「緩衝剤」は、組成物のpHを調整及び制御する物質を意味する。」（段落【0025】）

「本明細書に開示されている本発明に係る組成物は、水性である（つまり、水で調製されている）。本発明に係る好ましい水は、発熱物質（pyrogen）を本質的に含まないように処理されている（つまり、無菌である）。」（段落【0026】）

「本明細書に使用されている「mEq/L」は、水の量に比例して存在する特定の化合物（溶質）の濃度を意味する。さらに具体的には、mEq/Lは、1リットルの水当たりの溶質のミリ当量を意味する。1リットル当たりのミリ当量は、1リットル当たりの溶質のモル数に荷電種（群）の価数を掛け、それに1000を掛けたものである。」（段落【0027】）

「本発明のある実施形態は、赤血球を約1～6℃で保存するための水性組成物を提供する。前記組成物は、本質的には、アデニンと、デキストロースと、少なくとも1つの非代謝性の膜保護糖と、pH緩衝系とを含む。pH緩衝系は、生理学的に許容される緩衝剤の組み合わせを含み、重炭酸アニオンを提供する少なくとも1つの物質と、リン酸アニオンを提供する少なくとも1つの物質と、ナトリウムカチオンを提供する少なくとも1つの物質とを含む必要がある。本発明では、ある単一の緩衝塩

がこれらの要求の2つ以上を満たすことができると考えられる。」（段落【0028】）

「赤血球の保存技術では、赤血球の懸濁液系におけるATPの濃度が系の健全性に最も関連するものであることがよく知られている。赤血球は、解糖でd-グルコース（デキストロース）を最終的に乳酸に変換することでATPを生成する。したがって、乳酸の濃度曲線は、ATP合成に対しても良い指標になる。系の保存能力に関わらず、赤血球は限られた寿命を有する。採取された赤血球は様々な年齢を有し、その中には、自然死に近いものもある。保存系に新しいRBCが入ることがないので、再注入後の必要な回収率を維持できる保存期間には限度がある。したがって、系のATP産出能力全体は時間と共に減少する。しかし、添加液を加えると、その添加液が自然の濃度よりも高い濃度の栄養物質を提供するので、最初はATPが増加することがよくある。また、RBCは、最初は「膨張」する。これは、ATPの使用の減少にも関連する。」（段落【0029】）

「RBCを本発明に係る添加液に保存すると、理論的制約にとらわれずに、栄養溶液の容量の増加によって基質の供給が許容される濃度内で増加し、代謝廃棄物が希釈されるので、グルコース代謝に対するフィードバック阻害が減少すると考えられる。さらに、本発明に係る添加液は、初期にRBCの膨張を引き起こす特徴があると考えられる。その後の保存の間にRBCの容量は次第に減少する。

このような工程は、「調節性容量減少」と呼ばれる。この工程の間にRBCに存在するチロシンホスファターゼ活性が阻害される、又はチロシン・キナーゼが活性化されると考えられる。これらの酵素は、RBCの膜に大量に存在することが示された (Zipser, Y. and Kosower, N. S. (1996) *Biochem. J.* 314:881; Mallozzi C. et al. (1997) *FASEB J.* 1

1 :1281)。RBC膜のバンド3タンパクのリン酸化反応により、バンド3タンパクに結合しているホスホフルクトキナーゼ、アルドラーゼ、及びグリセロアルデヒド-3-リン酸デヒドロゲナーゼが細胞質に放出されると考えられる (Harrison, M. L. et al. (1991) J. Biol. Chem. 266:4106; Cossins, A. R. and Gibson J. S. (1997) J. Exper. Biol. 200:343; Low, P. S. et al. (1993) J. Biol. Chem. 268:14627; Low, P. S. et al. (1995) Protoplasma 184:1961)。解凍経路にこれらの3つの酵素が作用すると、RBCによるグルコースの代謝が増加し、それにより、ATPの合成が増大し、RBC内のATPの濃度が増加すると考えられる。したがって、添加液組成物の調製の目的は、ATPの合成ができる限り高い率でできる限り長く維持されることである。」(段落【0030】)

「本発明者らは、ATP合成を最大限にするための手掛かりがRBCの細胞内のpHを7.2に到達させることなく、できる限りその近くに維持することであると発見した。ATPの濃度は、保存の初期には一定に維持する又は一時的に増加させすが、その後、減少する。RBCのATP濃度が $2\ \mu\text{mol/g Hb}$ よりも低下すると、RBCの回収率は通常、75%未満になる。RBCは、保存の初期に2,3-DPGを失う。一般的に、ATPの初濃度は、約 $15\ \mu\text{mol/g Hb}$ 又は約 $1.1\ \text{mol/mol Hb}$ である。7~10日目には、濃度は通常、初濃度の10分の1に低下する。2,3-DPGの合成速度は、pHに比例する。pHが7.2よりも高い場合は、前記合成は著しく行われるが、それよりも低い場合は、低下する。保存系のpHを上昇させることで、2,3-DPG合成を増大させると、2,3-DPG分子が合成されるごとにATP合成が1モルずつ減少するので、この試みには限界がある。したがって、従来望ましいと考えられたRBCの2,3-DPG濃度の上

昇は、実際には、RBCの保存期間を減少させる。」（段落【0031】）

「保存系の環境が酸性になればなるほど、RBCの代謝は低下する。pHが7.2のときには、ラパポート・シャント（Rappaport shunt）（「Alkaline CPD and the preservation of red blood cell 2, 3-DPG（Hess et al, (2002) Transfusion, 42:747-752」を参照（参照により本明細書に含まれるものとする））として知られる機構が起きる。この機構では、1, 3-DPGから2, 3-DPGが合成され、ATP合成に必要なリン酸が消費され、解糖的に2分子のATPを合成する解糖ステップが回避される。系に対するこの機構の正味の影響は、ATPの枯渇である。細胞内pHが7.2未満である場合は、シャントは効果的に遮断され、ATP合成が最大限になる。自然状態では、シャントはある程度機能し、2, 3-DPGは他の細胞機構に対して重要である。しかしながら、本発明者らは、インビボ環境外での保存期間中に赤血球を保存するためには、シャント作用の最小化が望ましいと発見した。」（段落【0032】）

「したがって、本発明に係る組成物の実施形態では、pH緩衝系は、1, 3-DPGからの2, 3-ジホスホグリセレート（DPG）の合成よりも解糖を優先する赤血球内の反応平衡を保存期間中に確立及び維持するのに十分な量の組成物が加えられる赤血球懸濁液のpHを前記組成物が維持する働きをするのに十分な量で存在し、それによって、保存期間中に反応平衡でATP合成が発生する。本発明に係る組成物のある具体的な実施形態では、組成物は、その組成物が加えられた赤血球（RBC）懸濁液のpHを約6.4～7.4の間に維持する働きがある。さらに具体的な実施形態では、組成物は、その組成物が加えられた赤血球（RBC）懸濁液のpHを約7.0～7.2の間に維持する働きがある。

さらに具体的な実施形態では、組成物は、その組成物が加えられた赤血球（RBC）懸濁液のpHを約7.1よりも高く、約7.2よりも低い値に維持する働きがある。」（段落【0033】）

「本発明者らは、塩化物を実質的に含まない添加液を作成した。意外なことに、塩化物の不在は系に対して悪影響を及ぼすことなく、むしろそれにより、緩衝効果を増大させるために緩衝系をさらに追加することができる。本発明のある実施形態は、約1～6℃での赤血球の保存のための水性組成物をも対象にしている。この組成物は、アデニンと、デキストロースと、少なくとも1つの非代謝性の膜保護糖と、pH緩衝液系とを含む。pH緩衝系は、重炭酸アニオンを提供する少なくとも1つの物質と、リン酸アニオンを提供する少なくとも1つの物質と、及びナトリウムカチオンを提供する少なくとも1つの物質とを含む生理学的に許容される緩衝剤の組み合わせを含む。pH緩衝系は、1,3-DPGからの2,3-ジホスホグリセレート（DPG）の合成よりも解糖を優先する赤血球内の反応平衡を保存期間中に確立及び維持するのに十分な量の組成物が加えられる赤血球懸濁液のpHを前記組成物が維持する働きをするのに十分な量で存在し、それによって、保存期間中に反応平衡でATP合成が発生する。組成物は、外部由来の塩化物イオンを実質的に含まない。本明細書に使用されている「外部由来の塩化物イオンを実質的に含まない」は、組成物に塩化物イオンを発生させる物質が一切加えられていないことを意味する。」（段落【0034】）

「本発明に係る組成物のさらなる実施形態では、ナトリウムカチオンを提供する少なくとも1つの物質は、重炭酸ナトリウムと、リン酸2ナトリウムと、それらの組み合わせとから成る群から選択される。さらに具体的な実施形態では、重炭酸アニオンを提供する少なくとも1つの物質は、重炭酸ナトリウムである。さらなる実施形態では、リン酸アニオ

ンを提供する少なくとも1つの物質は、リン酸ナトリウムと、リン酸2ナトリウムと、リン酸3ナトリウムと、それらの組み合わせとから成る群から選択される。さらに具体的な実施形態では、リン酸アニオンを提供する少なくとも1つの物質は、リン酸2ナトリウムである。本発明に係る組成物の他の実施形態では、生理学的に許容される緩衝剤の組み合わせは、 $H^+$ と、カリウムと、アンモニウムと、マグネシウムと、それらの組み合わせとから成る群から選択される生理学的に許容されるカチオンを提供する少なくとも1つの物質をさらに含む。」（段落【0036】）

「本発明に係る組成物のさらなる実施形態では、少なくとも1つの非代謝性の膜保護糖は、マンニトールである。幾つかの糖アルコールは、特に単糖由来の糖アルコール（例えば、ソルビトール、マンニトール、キシリトール、エリトリトール）は、親水性の低分子であり、脂質バリアを介して容易に拡散し、細胞の安定性に重要な働きをし得る。特にマンニトールは、インビボでヒドロキシルラジカルのスカベンジャーとして作用する抗酸化物質として知られている。マンニトールは、細胞膜の完全性の維持に重要な役割を担い、膜保護糖として見なされている。他の低分子のポリオールもまた、膜保護糖として機能する。グルコース及びマンニトールが同じ分子量（180 g／モル）を有することを留意されたい。糖アルコールは、赤血球によって代謝されることはない。」（段落【0037】）

「本明細書に使用されているオスモル濃度は、実験的に求められる値である。オスモル濃度は、溶液によって完全な半透過性膜（水を通過させるが、溶質を通過させない）にかかる浸透圧の純水と比較した測定値である。オスモル濃度は、溶液中の溶質の数に依存するが、溶質の特性に依存しない。単純な溶液のオスモル濃度は、1分子の解離するパーテ

ィクルの数をモル濃度に掛けたものに等しい。実際の溶液に関しては、オスモル濃度の求め方は、より複雑である。1 L当たりの当量が大きいタンパクは、「大きなパーティクル」を少量しか含まないのでオスモル濃度に少ししか寄与しないことがある。溶液中では、全ての分子が解離しているわけではない。カチオンは、他のアニオン又はタンパクに結合していることがある。溶液の容量全てが水に由来するものではない。正確に測定するためには、これらの要因を計算に加える必要がある。」（段落【0038】）

「張度は、オスモル濃度に非常に関連し、かつ生物細胞の状態を説明するのにより有用な値であり、物質によって細胞膜に発生する浸透圧の血漿と比較した測定値である。オスモル濃度は、浸透圧物質を完全な非透過性と過程した際の水の有効勾配を測定した値である。オスモル濃度は、単純に溶解した「パーティクル」の数である。例えば、300 mMのグルコース溶液と150 mMのNaCl溶液は同じオスモル濃度を示す。しかしながら、これらの溶液に置かれた細胞は、非常に異なる作用をする。張度は、溶液が細胞内容量の膨張を抵抗する傾向を示す機能的用語である。」（段落【0039】）

「さらなる実施形態では、本発明に係る組成物のオスモル濃度は、約200～310 mOsmの間である。さらに具体的な実施形態では、本発明に係る組成物のオスモル濃度は、約221～280 mOsmの間である。非常に具体的な実施形態では、オスモル濃度は、約270 mOsmである。」（段落【0040】）

(オ) 「上記に説明したように、RBCはグルコース（d-グルコース＝「デキストロース」）を代謝し、ATPを合成する。廃棄物は、乳酸及び水素イオンである。水素イオンは次第に蓄積し、pHを下げ、さらなる代謝を阻害する。重炭酸塩は、水素イオンと結合し、RBCの炭酸脱

水酵素によって水及び二酸化炭素に変換される緩衝系として示された。二酸化炭素の放散 (diffusion) を可能にする保存容器では、逆反応は防止され、反応は $\text{CO}_2$ の形成へと進行する。重炭酸塩系の緩衝系は、非常に有用である。添加液において生理的濃度で存在する重炭酸は、 $\text{pCO}_2$ を発生させる。この $\text{pCO}_2$ により、600 mLの塩化ビニル袋から一週間に1~2 mmolの $\text{CO}_2$ が放散される。しかしながら、重炭酸を用いたRBC保存添加液作成の以前の試みは、ATP合成の増加及び保存期間の延長という点では失敗した。例えば、Beutler (BAG-PM) は、RBC保存液に重炭酸を添加したが、高pHを制御することができず、それにより、ATPが枯渇した。」(段落【0041】)

「RBC添加液の組成物に食塩水が不要であることと、ATP合成に悪影響を及ぼすことなくデキストロースの濃度を低下させることができることとを発見したことにより、本発明者は、溶液パラメータに生じた「余裕」を利用して、pH緩衝系を増加及び微調整することができた。本明細書に開示されている緩衝液系は、添加液組成物に対して適切な初期pHをもたらすだけでなく、RBCのATP合成を最大限にする細胞内pHを調整するpHをもたらす。緩衝系は、保存期間中にこれらのpH制御を行うことができる。したがって、pH緩衝系の緩衝能力は意図的に調整されている。本発明に係る組成物のある実施形態では、組成物のpHは、約8~9である。さらに具体的な実施形態では、組成物のpHは、約8.2~8.8である。なおさらに具体的な実施形態では、組成物のpHは、約8.4~8.6である。非常に具体的なある実施形態では、組成物のpHは、約8.5である。他の実施形態は、6週間の保存期間中に6.5~7.2の間のpHで少なくとも2 mEq増加する組成物が加えられる赤血球 (RBC) 懸濁液において緩衝能力を示す緩衝系の前記組成物を対象にしている。本明細書に開示している緩衝系は、

少なくともこの値の緩衝能力を示すが、RBC懸濁液に対してさらに大きな緩衝能力を示すことができる。それにより、保存期間はさらに延長する。」（段落【0042】）

「本発明者らは、本明細書で開示されている利点を可能にするために、組成物の必要な成分の範囲を決定した。本発明に係る組成物のある実施形態では、組成物は、約1～3mMのアデニンと、約20～115mMのデキストロースと、約15～60mMの非代謝性の膜保護糖と、約20～130mMの重炭酸ナトリウムと、約4～20mMのリン酸2ナトリウムとを含む。さらに具体的な実施形態では、組成物は、約2mMのアデニンと、約60～100mMのデキストロースと、約40～60mMの非代謝性の細胞膜保護糖と、約22～40mMの重炭酸ナトリウムと、約7～15mMのリン酸2ナトリウムとを含む。なおさらに具体的な実施形態では、組成物は、約2mMのアデニンと、約80mMのデキストロースと、約55mMの非代謝性の膜保護糖と、約26mMの重炭酸ナトリウムと、約12mMのリン酸2ナトリウムとを含み、約8.5のpHを有する。」（段落【0043】）

(カ) 「【実施例】

表1：試験された添加液の組成物」（段落【0061】）

「[実施例1]

この実施例は、EAS-81（表1を参照）として表す本発明に係る添加液のある実施形態の性能の分析結果及び利点を説明するためである。

EAS-81及びその比較対象であるAS-3（Nutricel, Pal Biomedical製造）は従来の容量で使用されており、一方、比較対象EAS-61及びEAS-76v6は希釈された状態及びさらに大きな容量で使用されている。EAS-81及びEAS-76v6は、両方とも重炭酸塩を含む。図1では、重炭酸塩を含む組成物は丸印で表されており、重炭

酸塩を含まないものはダイヤモンド印で表されている。容量の大きい組成物は塗りつぶされた印で表されており、従来と同じ容量の組成物は中空の印で表されている。本明細書で開示されている添加液の全ての容量は全血500mL当たりであり、添加液と全血との比は1：4.5である。」（段落【0062】）

「第1の実施例は、PVCバッグでの10週間に及ぶ保存の際の、RBC代謝及び完全性に対する保存液成分の効果を評価するためのプーリング研究 (pooling study) として行われた。プーリングにより、従来の血液保存研究における相違の最大の原因（異なるドナーから採取されたRBCの本来の違い）を減少させることができる。プーリングでは、各ドナーから採取された細胞の一部が従来のユニット容量 (unit size) で研究の各群に使用される。間接抗グロブリン試験 (indirect antiglobulin test : IAT) に反応しないRBCユニットを4つのABO式血液型ユニットのセットに分類する。次に、それぞれのセットをプール及び混合し、同一の4つのプール・ユニットに等分する。各プールの1ユニットを本研究のそれぞれの4つの群に使用する。」（段落【0063】）

「AS-3及びEASの組成物は、表1に開示されている。「The effects of phosphate, pH, and AS volume on RBC stored in saline-adenine-glucose-mannitol solutions (Hess et al., Transfusion, vol. 40: 1000-1006, Aug. 2000)」（参照により本明細書に組み込まれるものとする）に示されているように、EASは、USP市販のアデニンと、Sigma Chemicals社 (St. Louis, MO) 市販の糖及び塩とから作成し、1リットルの保存バッグ (Code 4R2032, Baxter Healthcare, Deerfield, IL) に無菌的にフィルターする。保存バッグを37°Cで2週間静置する。次に、溶液をさらに2週間インキュベートする。7日目及び14日目に細菌及びカビの不在で無菌性を確認する (SeptiCheck, Becton-Dickins

on Microbiology Systems, Sparks, MD)。次に、溶液を600 mLのPVCバッグ（品目番号 4R2023, Baxter Healthcare Corp, Deerfield, IL）に重量で等分する。全ての連結部には、無菌の連結器具を使用する（SCD 312, Terumo Medical Corp, Elkton, MD）。」（段落【0064】）

「RBCユニットの作成：

トリプルバッグ回収システム（triple-bag collection system）（品目番号 #127-23, Pall Corporation, East Hills, NY）内の70 mLのCP2D溶液に標準ユニットの血液（500 ± 55 mL）を回収した。それぞれのユニットの白血球を内部白血球フィルターで除去した。遠心分離を5分間行い、血漿を65 mLだけ残し、それ以外の血漿を除去し、表示した容量のAS又はEASを無菌的に加える。各ユニットを直立状態で10週間に1～6°Cで保存する（毎週の混合及び15 mLのサンプル採取のときを除いて）。」（段落【0065】）

「インビトロ測定：

白血球除去（全血からの白血球の除去）は、フローサイトメトリー法で確認する。全ヘモグロビン（Hb）濃度は、血液分析装置（Hematology Cell Counter System Series 9110+, Baker, Allentown, PA）で測定する。細胞の平均容積（Mean cell volume : MCV）は、RBCの数の測定及び保存懸濁液のマイクロヘマトクリット値で求める。「A micromodification of the Drabkin hemoglobin assay for measuring plasma hemoglobin in the range of 5 to 2000 mg/dl (Moore et al., Biochem Med 26:167-173, 1981)」（参照により本明細書に組み込まれるものとする）に記載されているように、上精Hbは、分光光度法を用いて改良ドラブキン・アセイ（modified Drabkin assay）で測定する。溶血のパーセンテージは、全Hbに対する遊離のHbの比及びヘマトクリット値を

測定することによって求める。」（段落【0066】）

「RBCのATPの濃度は、脱タンパクしたPRBCの上精から測定する。細胞のアリコートを冷却した10%のトリクロロ酢酸と混合し、血液タンパクを沈澱させ、2700 x gで10分間遠心分離する。次に、タンパクの無い上精を測定するときまでに-80℃で冷凍する。市販の測定キット（Procedures 366-UV, Sigma Diagnostics, St. Louis, MO）を使用してATPを酵素的に分析する。」（段落【0067】）

「血液ガス、重炭酸、及びpHは、血液ガス測定装置（Corning 855, Ithica, NY）を使用して測定する。したがって、pHを37℃で測定する。細胞外ナトリウム、塩化物、リン酸、乳酸、及びグルコースは、プログラム可能な化学分析器（Hitachi 902 Analyzer, Boehringer Mannheim Corporation, Indianapolis, IN）を使用して測定する。「Morphology of stored, rejuvenated human erythrocytes (Usry, Moore, and Manolo, Vox Sang 28:176-183, 1975)」（参照により本明細書に含まれるものとする）に記載の方法したがって、円盤状～ウニ状～球状のRBCの形状変化の平均度を測定する。微小胞は、保存期の後期に上精から測定する。血漿を超遠心分離し、微小胞の沈澱を食塩水で3回洗浄し、ブラッドフォード法（BioRad, Richmond, CA）を使用して全タンパク量を測定する。」（段落【0068】）

「4つのRBC保存溶液の比較試験の結果は、図1及び2に示されている。全ての保存溶液では、1週目にRBCのATPの濃度が上昇した（図1（A））。EASでは、ATP濃度は、2週目にも上昇し続け、本試験の全期間中にはAS-3のATP濃度よりも高い状態を維持した。EAS-81は、8週目及びそれ以降には、それよりも容量の大きいEAS61と同じ濃度のATPを有していた。一方、重炭酸の緩衝系を有する容量のより大きいEAS-78では、ATPの濃度は少し高か

った。」（段落【0069】）

「全ての保存溶液では、溶血（赤血球の破壊）は、保存期間と共に増加する（図1（B））。しかしながら、AS-3は、全ての時間において他の溶液よりも高い溶血率を示した。溶血は、EAS81でわずかに減少し、他のEASでさらに減少した。容量がより大きい溶液では、重炭酸の存在で溶血がさらに減少することはなかった。予想通りに、容量がより少ない溶液のヘマトクリット値は他の溶液のものよりも高かった（図1（C））。また、RBCは、保存期間中には全ての溶液で容積を失った。」（段落【0070】）

「全ての時点において、重炭酸を含むEASにおける乳酸の濃度は、より高かった（図1（D））。8週間の保存期間で合成された全乳酸は、AS-3で9mMであり、EAS-61で12mMであり、EAS-81で13mMであり、EAS-78で15mMであった。RBC外のpH及びRBC内のpHに関しても同様に、全ての時点において、重炭酸を含むEASの方が高かったが、RBC内pHの違いには統計的有意性は無い（図1（E）及び図1（F））。緩衝能力の原因となる、重炭酸の損失並びにPCO<sub>2</sub>の増加及び減少は、図1（G）で示されている。」（段落【0071】）

「一般的に本発明に係るEAS-81で保存された細胞は、AS-3で保存された細胞と比較して、エネルギー利用が優れており、それによりATP濃度が高く、溶血の程度が低く、形態が優れており、微小胞が少なく、pHがわずかに高かった。EAS-81よりも古いEAS、特にEAS-76v6は、幾つかの点において、より優れた作用をするが、使用される容量が多いために、保存RBCがさらに希釈され、大量に輸血される患者に対して血液希釈を引き起こしかねない。」（段落【0072】）

(キ) 「 [実施例 2] 」

本実施例は、従来の容量でEAS製剤を使用することでRBCを8週間保存することができ、かつその際には6週間の保存に使用される従来の溶液よりも、RBCの回収率が良く、溶血率が低く、RBCの膜がさらに維持されることを示すものである。」 (段落【0073】)

「米国食品医薬品局 (United States Food and Drug Administration : FDA) 及びアメリカ血液銀行協会 (American Association of Blood Banks) のドナー基準を満たす12人のボランティアのドナーを選択した。ドナーらは500 mL (1ユニット) の全血を提供した。提供された全血をCP2Dバッグ (品目番号 #127-23, Pall Corporation, East Hills, NY) に回収し、白血球を除去し、65 mLの血漿だけを残し、その残りの血漿を除去した。110 mLのEAS-81を加え、濃厚RBC溶液のサンプルの半分 (n = 6) を6週間、残りの半分 (n = 6) を8週間1~6°Cで保存した。保存終了の1週間前に一定ユニットを無菌的にサンプリングし、培養した。細菌の生育が示されなかった場合には、少量のRBCを51-Cr標識し、ドナーに戻し、モーオフ・プロトコル (Moroff protocol) を使用して単標識測定 (single label measurement) を行うことでRBC回収率を測定した。」 (段落【0074】)

「表計算プログラムソフトウェア (Excel, Microsoft, Redmond, WA) を使用して、平均グラフ及び標準誤差を作成し、保存群の記述統計を計算した。各保存系の乳酸合成を最初から測定し、ヘモグロビン及び血清タンパクの含有量を測定するために乳酸の最終濃度及び保存系の容量の差異を調節した。SyStat Ver. 6 (SPSS Inc., Chicago, IL) を使用してRBCの回収値の箱髭図を作成した。」 (段落【0075】)

「CP2D/EAS-81で6週間保存した白血球除去済みのRBCの24時間 (再注入後) におけるインビボ自己回収率は85 ± 5%であ

り、8週間保存したものの回収率は $87 \pm 2\%$ である(図2)。保存期間がより長かったRBCの回収率がさらに高かったわけだが、この回収率の異常な増加は、本試験の規模が小さいため、及び異なるドナーから採取された血液が異なる維持能力を有するためであろう。しかしながら、これらの回収率は、現在認可されている全ての保存溶液のものよりも高く、米国及びヨーロッパでの認可のための基準を満たす(つまり、米国の回収率基準である $75\%$ を越える回収率及び米国の溶血率の制限基準である $1\%$ よりも低い溶血率を示し、ヨーロッパの回収率基準である $75\%$ を越える回収率及びヨーロッパの溶血率の制限基準である $0.8\%$ よりも低い溶血率を示す)。本試験でのRBC溶血率は、6週間目で $0.2 \pm 0.2$ であり、8週間目で $0.4 \pm 0.2$ であった。RBCの微小胞タンパクの濃度は、6週間目で $8 \pm 4 \text{ mg/dL}$ であり、8週間目で $12 \pm 6 \text{ mg/dL}$ であり、わずかに約 $5\%$ のRBCヘモグロビン損失に相当する。」(段落【0076】)

「保存期間及び注入される赤血球のより優れた生理機能に関して、本発明に係るEAS-81の優れた保存能力は、幾つかの点に由来すると思われる。第1に、新規のpH制御系は、細胞内の反応平衡がATPを消費する2,3-DPG合成を回避し、解糖に向かうのに必要な細胞内pHを維持するのに必要な懸濁液pHを保存期間中に維持することができる。また、高濃度の細胞外リン酸によって細胞外 $\text{Ca}^{++}$ 濃度が制限されるので、リン脂質のスクランブリング並びに膜変形及び損失などのアポトーシス工程が抑制される。これにより、注入後のRBCの回収率が向上し、RBC膜の質がさらに良くなる。したがって、注入された患者での急速なインビボ・クリアランスの発生が減少し、注入後の長期間における回収可能なRBCのパーセンテージが高くなる。EAS-81製剤は、NaClを含まずにその代わりに特定の緩衝化合物をさらに多

く含み、適切なオスモル濃度を保持する。このEAS-81製剤により、RBC懸濁液のpHはより効果的なものとなり、その制御もより長く持続し、Ca<sup>++</sup>濃度の上昇及びATP濃度の低下に関連する細胞の有害な反応を最小限にするのに必要なリン酸が生じる。また、EAS-81を従来の量で使用できるので、大量の輸血を必要とする患者への使用に適切である。」（段落【0077】）

(ク) 「【図面の簡単な説明】

【図1】プーリング研究のグラフ表示図であり、下記の4つの溶液におけるRBCの保存効果を時間（週）の関数として示す。1) 110mLのAS-3（-◇-）、170mLのEAS-61（-◆-）、170mLのEAS-78（-●-）、及び110mLのEAS-81（-○-）。パネルAで示されているように、重炭酸を含む組成物（丸印）は、重炭酸を含まない同量の組成物（ダイヤモンド印）よりも高いATP濃度を示した。また、重炭酸を含む組成物は、乳酸（パネルD）、細胞外及び細胞内のpH（パネルE及びF）、並びに重炭酸及びPCO<sub>2</sub>濃度（パネルE及びF）に関してもより高い値を示した。容量のより大きな組成物は（塗りつぶされた印）では、溶血率及びヘマトクリット値が低下した（それぞれパネルB及びC）

【図2】体内への再注入から24時間後に抽出された赤血球のインビボ回収率を示す図である。尚、RBCは、再注入前にEAS-81で6週間（n=6）及び8週間（n=6）で保存され、その回収率の結果は歴史的対象と比較（1985年にSimonらに報告されたAS-3に関する研究）される。各試験では、<sup>51</sup>Cr単標識の方法が使用された。」（段落【0078】）

ウ 前記ア及びイによれば、本願明細書には、本願発明に関し、以下の点が開示されていることが認められる。

(ア) 赤血球は、ドナーから採取されるとすぐに凝固し、栄養不足となり、ATP、2, 3-DPG、膜の表面積及び完全性、並びにヘモグロビン(hemoglobin: Hb)を失い、死に始めるため、患者へ再注入するための赤血球(RBC)の保存は科学的に困難であった。そこで、長期の保存期間の達成及び再注入される良質の赤血球の獲得のための保存方法及び保存組成物が開発されてきたが、「濃厚RBCの回収率」に課題があったため、RBC保存液の容量、栄養素及び他の有用なRBCの安定剤を再構築する目的で、添加液(additive solutions: AS)が、開発されてきた(段落【0003】ないし【0005】)。

従来から市販されているAS-3等の添加液は6週間程度しか赤血球を保存することができず(段落【0005】)、また、「本発明者ら」が以前に開発したアルカリ性の試験的添加液(EAS)は9~12週間の保存に有効であったが、塩化ナトリウムを含むとともに比較的大量に使用されるように構成されていたため、保存されるRBCが著しく希釈され、大量に輸血される患者の血液が希釈される危険性が高まり、また、塩化ナトリウムを含むことにより緩衝塩及びリン酸の溶解度が制限されるという問題があった(段落【0011】)。

さらに、保存されたRBC液は人間に直接注入する必要があり(段落【0007】ないし【0009】)、また、RBCを安全に保存できる保存期間の延長は普遍的な課題である(段落【0012】)。

そこで、従来と同様に低量でRBCの回収率及び性能を維持又は高められるように構成されたRBCの保存組成物が必要とされ、また、添加組成物が加えられたRBC懸濁液を人間に直接注入できるようにし、かつRBCの生理的な機能を高め、そのクリアランスの程度を低下させ、許容範囲の回収率を可能にする添加組成物が必要とされていた(段落【0013】)。

(イ) 「本発明者ら」は、従来、保存組成物の適切な作用に必要であると考えられていた塩化ナトリウムを当該組成物から実質的に除去すると、組成物の性質が向上し、pH緩衝系の機能が高まり、これにより、保存及び再注入される赤血球の完全性及び機能性質の点、必要な回収率を維持した状態及び認可のために規制法が制限するレベルを越えない溶血レベルを有する状態でRBCが保存される保存期間の点において利点が得られることを見だし、前記(ア)の各課題を解決するための手段として、本願発明の組成物を発明した(段落【0014】、【0015】)。

(ウ) 本願発明は、外部由来の塩化物イオンを実質的に含まない構成とすることにより、溶液パラメータに生じた「余裕」を利用して、緩衝効果を増大させるためにpH緩衝系をさらに追加することができ、従来と同程度の容量で、保存期間がさらに延長できるという効果を奏する(段落【0034】、【0042】、【0077】)。

(2) 刊行物1の記載事項について

刊行物1(原文甲1・訳文乙1)には、次のような記載がある(下記記載中に引用する「図面」については別紙甲1図面を参照)。

ア 「背景：より良い貯蔵が赤血球の有効性と安全性を改善することができる。赤血球のATP生産量を最適化することと、溶血を最小にすることは、革新的により長い貯蔵をもたらした。」

「設計と方法の研究：第1の研究で、赤血球はCPD液(当審注：血液保存液(CPD(Citrate phosphate Dextrose)液))にパックされた24のユニットは4つのグループに含まれ、再等分されて、そして45、40、35、あるいは30mEq/lの塩化ナトリウムを含有する実験添加液76(EAS-76)の4つの型の1つの、300mlに加えられた。各ユニットは形態学と生化学的測定のために12週間毎週サンプルを取得された。第2の研究において、10人のボランティアが、AS-1での6

週間の保存, 対, 30 mEq/l の塩化ナトリウムを含有するEAS-76のバリエーション6 (EAS-76v6) での12週間の保存における, テクネチウム/クロム法での24時間後の生体内回収率のクロスオーバー比較のために, 2ユニットの赤血球を提供した。」

「結果: より低い塩の型のEAS-76中に保存された赤血球は, より少ない溶血と微小胞形成で, より高い赤血球ATP濃度を有していた。赤血球2, 3-DPGは2週間維持された。12週間EAS-76v6中に保存された赤血球は,  $78 \pm 4\%$  の24時間の生体での回収率を示した。」

「結論: 許容範囲の回収率と0.6%の溶血で12週間, また, 正常な2, 3-DPG濃度で2週間, 赤血球を保存することが可能である。」

(以上, 原文867頁左欄・訳文1頁)

イ 「現代の赤血球液状保存システムは, よく機能しており, 安全かつ安価で95%有効な同種赤血球の全国への供給がサポートされている(1)。現代の赤血球保存に限界が認められるのは, 自己輸血用の血液の提供, 軍事行動のための血液の輸送, 未熟児におけるドナー暴露の制限など, 少数の臨床背景のみであるが, これらの臨床背景では, より長期の保存に明らかかな利点がある。しかし, 長期間保存された古い赤血球は, その流動性に乏しい特性や有毒な細胞破壊成分により, 外傷患者の死亡や輸血関連急性肺障害の発症の原因となる可能性がある(2-4)。より優れた赤血球保存システム構築の研究を続けることは, 依然として重要である。」

「著者らがこれまでに報告してきた, 9, 10, および11週間の赤血球保存は, 赤血球ATP濃度を維持し, 膜損失を防ぐことにより, 機能すると思われる(5-7)。赤血球ATP濃度の維持は, 赤血球が血液循環に戻され, 微小循環内で局所血管拡張を発生させる手段としてATPを分泌しなければならない際の, 赤血球の生存性の維持および正常な流動性に対して影響を及ぼす(3)。膜損失を減少させることも, 細胞の剛性を低

くすることで良好な流動特性に寄与すると同時に、凝血促進性膜微小胞や炎症誘発性リゾリン脂質などの膜破壊成分の負荷の低減にも寄与する(8, 9)。保存期間中の膜損失の削減は、赤血球ATP濃度と相関しているようである。」

「略語：EAS = 実験添加液 (experimental additive solution) 」

(以上、原文867頁右欄・訳文2頁)

ウ 「以前の研究で、我々は、赤血球 ATPは、20 mMマンニトール添加の重炭酸塩含有実験添加液 (EAS-67) で、11週間後も $3.1 \pm 0.3 \mu\text{mol/g}$ ヘモグロビンの濃度を示すが、1.35%の溶血率を伴うことを示した(7)。我々はまた、マンニトールを30 mM (EAS-76)まで増加させると、溶血率は0.76%に低下するが、微小胞形成は増大することも示した。本研究では、EAS-76中の塩化ナトリウム濃度を45 mMから30 mMに下げたときに、溶血および微小胞形成の少ない、良好な赤血球 ATPおよび2,3-DPGの維持が得られる結果となることを示すデータを提示する。この溶液 (実験添加液76バリエーション6 (EAS-76 v 6) と呼ぶ) 中で保存された赤血球は、二重標識法を用いたクロスオーバー研究で、12週間保存後に、許容される24時間生体内回収率を示した。」

「材料と方法

ボランティア

同種間輸血のための標準的な血液ドナー基準を満たした34名の健康なボランティアに対して、本研究への参加に関するインフォームドコンセントを行った。24名のボランティアは、ウォルター・リード陸軍研究所の治験審査委員会 (Institutional Review Board) によって承認されたプロトコルに従って研究に参加し、10名のボランティアは、シンシナティ大学の治験審査委員会によって承認されたプロトコルに従って参加した。」

### 「研究 1

最初に、ポリ塩化ビニルバッグに保存されている 1 2 週間の間に、保存液の成分が赤血球の代謝および完全性に与える影響を評価するために、「プーリング」研究を実施した。プーリングでは、各ドナーから採取された細胞の一部を、従来のユニット容量は維持しつつ、研究の各群に含めることにより、従来の血液保存研究における変動性の最大の原因である、異なるドナーから採取された赤血球間の違い (10) を減少させることができる。間接抗グロブリン試験で非反応な赤血球ユニットを 4 つの ABO 式血液型一致ユニットのセットにグループ化した。次に、各セットをプール、混合した後、等分して、4 つの同一のプールユニットを作成した。各プールの 1 ユニットの、本研究の 4 つの群のそれぞれで使用した。」

(以上、原文 868 頁左欄・訳文 3 頁～4 頁)

#### エ 「表 1. 各実験添加液の組成

	E A S -76	E A S -76v4	E A S -76v5	E A S -76v6
名称	(mM)	(mM)	(mM)	(mM)
塩化ナトリウム	45.0	40.0	35.0	30.0
重炭酸ナトリウム	30.0	30.0	30.0	30.0
リン酸 2 ナトリウム	9.0	9.0	9.0	9.0
アデニン	2.0	2.0	2.0	2.0
デキストロース	50.0	50.0	50.0	50.0
マンニトール	30.0	30.0	30.0	30.0
pH	8.4	8.4	8.4	8.4

全ての添加液は赤血球に対して 300 ml の体積で用いられる。」

#### 「保存溶液

表 1 では、各種 E A S の組成を比較している。E A S は、医薬品グレードのアデニン、糖、および塩 (Sigma, ミズーリ州セントルイス) から研究室

で作成し，前述のとおり，無菌的にろ過して1リットル保存用バッグ（品目番号4R2032, Baxter Healthcare, イリノイ州ディアフィールド）に入れた（10）。バッグは，37℃で2週間保持した。次に，溶液を培養し，培養物をさらに2週間インキュベートした。細菌増殖およびかびの生育が7～14日間ないことで，無菌性を確認した後（セプティチェック，Becton-Dickinson Microbiology Systems社製，メリーランド州スパーク），溶液を重量単位で600mlのポリ塩化ビニルバッグ（品目番号4R2023, Baxter Healthcare）に等分した。すべての連結部には，滅菌連結器具（SCD 312, Terumo Medical Corp., メリーランド州エルクトン）を使用した。」

#### 「赤血球ユニットの準備

血液の標準的なユニット（450±45ml）がトリプルバッグ収集システム（コード 4R1402 , バクスター・ヘルスケア）中の63mlのCPD液に集められた。ユニットはろ過（Sepacell RS - 2000フィルター，コード 4R3303, バクスター・ヘルスケア）によって白血球を減らされた。赤血球は5分間遠心分離され，引き続いて65mlの血漿以外を除去し，その後，適当なEAS-76の型が無菌状態で加えられた。ユニットは，週に1度の混合と15ミリリットルのサンプルの除去以外，直立状態で1～6℃で12週間保存された。」

#### 「試験管内測定

白血球の減少は，フローサイトメトリー法により確認した。総ヘモグロビン（ヘモグロビン）濃度は，臨床用血液分析装置（Hematology Cell Counter System Series 9110+, Baker, ペンシルベニア州アレンタウン）を使用して測定した。平均赤血球容積は，赤血球数，および保存懸濁液のマイクロヘマトクリット値から求めた。上精ヘモグロビン濃度は，改良Drabkinアッセイを用いて，分光光度法で測定した（11）。溶血のパーセンテージは，全ヘモグロビンに対する遊離のヘモグロビンの割合とヘマトクリッ

ト値により求めた。」

「赤血球 ATP および 2, 3-DPG の濃度は、脱タンパクした赤血球の上精で測定した。細胞のアリコートを、冷却した 10% のトリクロロ酢酸と混合して、血漿タンパクを沈殿させ、 $2700 \times g$  で 10 分間遠心分離した後、タンパク質のない上精をテストするときまで  $-80^{\circ}\text{C}$  で冷凍した。ATP と 2, 3-DPG を、市販の検査キット (Procedures 366-UV および 35-UV, Sigma) を使用して酵素的に分析した。」

(以上、原文 868 頁右欄・訳文 4 頁～5 頁)

オ 「血液ガス、重炭酸塩、および pH を、血液ガス測定装置 (Corning 855, ニューヨーク州イサカ) を使用して測定または計算した。pH は、 $37^{\circ}\text{C}$  で測定した。細胞外ナトリウム、カリウム、塩化物、リン酸、乳酸塩、およびグルコースは、プログラム可能な化学分析装置 (Hitachi 902 Analyzer, Boehringer Mannheim Corporation, インディアナ州インディアナポリス) を使用して測定した。赤血球の円盤状赤血球からウニ状赤血球、球状赤血球への形状変化の平均度を、Usry らの方法にしたがって測定した (12) 。」

「保存期間の終了時に、微小胞を上精で測定した。血漿を超遠心分離し、微小胞の沈澱物を生理食塩水で 3 回洗浄した後、Bradford の方法 (BioRad, カリフォルニア州リッチモンド) を使用して、総タンパク量を測定した。」

## 「研究 2

FDA および AABB のドナー基準を満たす 10 名のボランティアが、非無作為化クロスオーバー赤血球保存研究に参加した (表 2)。ボランティアはまず、450 mL の全血を提供した。提供された全血は、赤血球として  $1\sim 6^{\circ}\text{C}$  で 6 週間、CPD/AS-1 (バッグコード 3033, Baxter Healthcare) に保存した。保存終了の 1 週間前に、ユニットを無菌的にサンプリングし、培養した。培養物の生育が示されなかった場合は、保存した赤

血球の少量を $^{51}\text{Cr}$ で標識し、ドナーに戻した。同時に、新鮮な自己赤血球を $^{99\text{m}}\text{Tc}$ で標識し、Heatonらの方法にしたがって、 $\text{Cr}$ -標識した細胞とともに注入した（13）。8週間後、ドナーの血液をCPDに再採血し、赤血球を300mLのEAS-76v6に12週間保存し、二重標識法による24時間生体内回収率を再度測定した。」

（以上、原文869頁左欄・訳文5頁～6頁）

#### カ 「統計

平均値および標準誤差は、12週間保存グループの記述統計として計算した（Microsoft Excel, Microsoft, ワシントン州レッドモンド）。分散および共分散分析の計算を行った（GB-Statバージョン8.0, Dynamic Microsystems, メリーランド州シルバースプリング）。赤血球の回収値の箱ひげ図も作成した（SyStat Ver. 6, SPSS, イリノイ州シカゴ）。」

#### 「結果

連続的により低いナトリウム濃度となるよう設計された一定容量のEASの添加は、より低ナトリウム濃度の細胞外懸濁媒体をもたらした。これは、逆に、初期平均赤血球容積として測定された、連続的により大きくなる細胞膨張をもたらした。」

「表2. ボランティアの特性とクロスオーバー24時間赤血球回収率研究の結果\*

列左から、ボランティア番号、性別、身長（cm）、体重（kg）、 $^{99\text{m}}\text{Tc}$ 測定の前赤血球体積における研究1と研究2の比、1時間でのATP量における研究1と研究2の比、終了時のATP量における研究1と研究2の比、24時間回収率（%）における研究1と研究2の比。

行上から、ボランティア番号1～10（10人）。

\* 研究1ではAS-1に6週間保存した血液を使用、研究2ではEAS-76v6に12週間保存した血液を使用した。」

「表3. 12週間保存後の結果—EAS—76とそのバリエーションの比較\*  
列左から、添加液、塩化ナトリウム濃度 (mM) , 0日におけるNa<sup>+</sup>濃度 (mEq/L) , 0日における平均赤血球容積 (fL) , 形態指数, 微小胞タンパク質 (mg/dL 赤血球) , 溶血 (%) , 赤血球ATP ( $\mu\text{mol/g}$  ヘモグロビン) 。

行上から、添加液EAS—76～EAS—76v6 (4種) 。

\* 平均値±標準誤差。n=6プール」

(以上、原文869頁右欄・訳文6頁～7頁)

キ 「赤血球ATP濃度は全てのグループで保存第1週の間は減少し、続く2, 3週で増加し、その後残りの期間はゆっくりと減少した(図1A)。より低い塩分量の型では、ATP濃度のより大きな初期減少 ( $p=0.058$ ) が見られ、4週間での測定か ( $p=0.04$ ) , 7週間での測定か ( $p=0.002$ ) にかかわらず、45mEq/lの型におけるよりも大きなATP濃度の回復がみられた。」

「赤血球2,3DPG濃度は1週目に約17 $\mu\text{mol/g Hb}$  (1.2 $\text{mol/mol Hb}$ ) まで上昇し、その後減少した(図1B)。2週目での濃度は、平均して12 $\mu\text{mol/g Hb}$ となった。」

「細胞外pHはすべてのグループで等しく、そしてすべてのグループで12週間の保存の間に7.2から6.6まで減少した(図1C)。その間に、血漿乳酸濃度が32mMまで上昇し(図1D)、しかし一方、重炭酸塩濃度は26から8mEq/lまで減少した(図1E)。PCO<sub>2</sub>は6週目に最大値135mmHgに達した(図1F)。」

「赤血球の形態学は全ての型で良好であり、そしてほんのわずかだけ、低塩の型に保存された細胞が、より良かった(図1G)。溶血は全ての型で許容範囲内にあったが、共分散分析を最後の3週間にわたり時間平均したとき、低塩の型において少しより低いものであった(図1H)。上澄み

液で測定された微小胞タンパク質は低塩の型がより低かったが、ただぎりの有意性 ( $p = 0.062$ , 表3) を達成する程度であった。」

「平均赤血球容積は、より低張のEAS-76の型の添加で増加した(図2A)。より低いナトリウムとクロライドの濃度にもかかわらず、カリウムの損失はすべての条件下で同じであった(図2B-D)。細胞外リン酸塩濃度は、最初の2週間にわたり、赤血球に移行することにより減少した(図2E)。糖分が代謝されたことにより、グルコース濃度は減少した(図2F)。ただ添加液の塩分量だけが平均赤血球容積に影響を与えるように思われた。」

「CPD/EAS-76 v 6に12週間保存した赤血球の平均の24時間生体内自己回収率は、 $78 \pm 3\%$ であった(図3)。この値は、同じドナーの赤血球をCPD/AS-1に6週間保存した場合に比べて低かったが、FDAの認可基準の75%より大きく基準の範囲内であり、また95%片側確率の70%より大きい。」

(以上、原文870頁左欄・訳文7頁～8頁)

ク 「図1. 塩化ナトリウム濃度を1リットルあたり45mEq (-◆-) , 40mEq (-■-) , 35mEq (-▲-) , 30mEq (-●-) と変化させたEAS-76バリエーションでの塩化ナトリウム濃度減少の影響を示すプーリング研究。(A) 赤血球ATP濃度の増加は塩化ナトリウム濃度の低下の結果である。これに対して、(B) 2,3-DPG濃度、(C) pH, および(D) 乳酸産生は、塩化ナトリウム濃度に関係なく同等である。プロトンは、(E) 重炭酸塩濃度が低下し、(F)  $\text{CO}_2$ がバッグから拡散するため、系から除去される。(G) 形態はこれらの系で良く維持されるが、低塩濃度バリエーションのほうが若干より良く維持される。(H) 溶血も、EASの低塩濃度バリエーションで減少した。」

「議論

赤血球の保存は代謝エネルギーの絶え間ない供給を必要とする。このエネルギーは主に解糖から得られる（14）。その充足度は赤血球ATP濃度として測定され得る。流通している添加液中での水溶液保存の典型的な条件下、4 mモルのグルコースが6週間で消費される。その結果、8 mモルの乳酸塩とプロトンが生産され、そして懸濁液のpHは7.0から6.4まで低下する（10）。最終的なpHにおいて、解糖は著しく遅くなり、赤血球ATP濃度は2.5  $\mu$ モル/g Hb以下に減少し、そして膜損傷が増加する。24時間での生体内回収率としての赤血球の生存率は、6週間で依然として78～84%であるが、全ての現在認可されている添加液保存システムの7週間では、75%以下に低下する（13, 15, 16）。」

「より長い保存はアルカリ性の添加液を使うことによって達成されることができ、その結果、保存はより高いpHで始まる。pHが7.0を上回ると、いっそう速い解糖が使用量を超過するATP生産量を導き、赤血球ATP濃度は保存の第1週に上昇する。ヘモグロビンは7.0を上回るpHにおいてより良い緩衝剤であり、増加した酸負担量はpHのより少ない減少により滴定される（17）。しかしながらpHが7.2を上回る場合、解糖は、結果として生じる細胞内無機リン酸の枯渇とATP生産の阻害を伴い、2,3DPG生産に転用される（18）。pH操作の範囲は小さい。」

（以上、原文870頁右欄・訳文8頁～9頁）

ケ 「図2. 塩化ナトリウム濃度を1リットルあたり45mEq (-◆-) , 40mEq (-■-) , 35mEq (-▲-) , 30mEq (-●-) と変化させたEAS-76バリエーションでの塩化ナトリウム濃度減少の影響を示すプーリング研究。(A) 塩化ナトリウム濃度の減少の結果、増加した平均赤血球容積。(B) 細胞外ナトリウム濃度。(C) 細胞外カリウム濃度。赤血球からのカリウム流量はナトリウム濃度またはpHの変化の影響を受けない。(D) 塩化物濃度, (E) リン酸塩濃度, および (F) グルコース濃度。3週目以前の細胞へのリン酸

塩の移動，および3週目以後の細胞からのリン酸塩の移動は，他の電解質の濃度と関係しない。」

「図3．二形態での保存後の赤血球の24時間生体内回収率に関する非無作為化クロスオーバー研究の結果。赤血球は，最初，CPD/AS-1に6週間保存し，測定された回収率は $83 \pm 6\%$  ( $n=10$ )であった。8週間の間において，2回目のユニットを採血し，CPD/EAS-76v6に12週間保存した。回収率は $78 \pm 4\%$  ( $n=10$ )であった。」

(以上，原文871頁左欄・訳文9頁)

コ 「増加した解糖が，体積と添加液の緩衝能を増加させることにより，受け入れられ得る。本研究では， $30 \text{ meq/l}$ の重炭酸ナトリウムの添加が $9 \text{ mmol}$ のプロトンバッファリングし，ヘモグロビンによりバッファリングされた8に加えて，12週間の間，6.6を上回るpHと， $3 \mu\text{mol/g}$ ヘモグロビンを上回る赤血球ATP濃度が維持されるようになる。バッグ中の利用可能なエネルギーを2倍にすることは，保存寿命を2倍にするように思われる。」

「重炭酸塩が，炭酸脱水酵素によって二酸化炭素と水に分離された炭酸を形成するために遊離のプロトンと結合したことにより，このシステムは働いた。二酸化炭素がビニール袋から放散したので，0.5lの細胞内外の水について，二酸化炭素濃度は $26$ から $8 \text{ meq/l}$ まで減少した。60gのヘモグロビンの飽和を完了するための，1モルの酸素のバッグ中への同時の放散は，0.5モルのボーア・プロトンの放出，つまり，すでに十分大きいプロトンフラックスへの小さい付加を引き起こす。pH活性化されたホスホグリセロールムターゼによる1,3-ジホスホグリセレートの変換が2週間の2,3DPGの濃度の上昇を維持する。2,3DPG合成のエネルギーコストは，保存の第3週の間，2,3DPG分解速度の最大傾斜から判断すると，おそらく，1モルのプロトンより少ない。」

「貯蔵システム安定性の最も重要な基準は、24時間の生体回収率として測定される、標準的生存能力である。赤血球ATP濃度の維持と回収率との関係は、ますますよく理解される。それは今までしばらくの間、ATPを増加させるための活性化溶液中での赤血球のインキュベーションが回収率を増加させることが知られていた。Hogmanらの研究(19)では、リン酸塩とアデニンを含む温中性溶液中の2時間のインキュベーションで、77から89%まで回復フラクションが増加した。これは最初の24時間で循環から取り除かれた細胞の半分以下が回復不可能な損傷を受けていたことを意味する。最近、ホスファチジルセリンを膜の外表面から動かすアミノリン脂質転座酵素の活性が、ATP濃度に高感受性であり、典型的な赤血球保存期間の終末期のATP濃度では働くのをやめることが認識されてきた(20)。赤血球ATPの育成または維持が、この損傷を防ぐ。我々は、膜損傷はATP濃度を維持することによっても防ぐことができることを、この系統の実験添加液の発展において繰り返し示してきた。膜損傷が赤血球の変形能を減少させ、そして減少した回収率と相関している。」

(以上、原文871頁右欄・訳文9頁～10頁)

サ 「我々はFDAの免許取得基準を満たすであろう12週間の赤血球保存液を作り出した。それはまた、最初の2週間、2,3DPG濃度を正常な範囲に維持する。この系統の溶液のさらなる発展が必要である。」

(原文872頁左欄・訳文10頁)

### (3) 相違点2の判断の誤りの有無について

原告は、本件審決が、相違点2に係る本願発明の構成は、公知のpH緩衝系の機能に言及したものにすぎず、pH緩衝系の特定という観点からみて、相違点2は実質的な相違点とはいえない旨判断したが、相違点2に係る本願発明の構成(発明特定事項)は、公知のpH緩衝系の機能に言及しただけでなく、赤血球のpHが維持されるように、本願発明の水溶性組成物中の「pH

緩衝系」の量を「十分な量」と特定したものであり、引用発明との実質的な相違点であるといえるから、本件審決の上記判断は誤りである旨主張するので、以下において判断する。

ア 相違点2に係る本願発明の構成について

本願発明の特許請求の範囲（請求項1）の記載によれば、本願発明の「前記pH緩衝系は、1, 3-DPGからの2, 3-ジホスホグリセレート（DPG）の合成よりも解糖を優先する赤血球内の反応平衡を保存期間中に確立及び維持するのに十分な量の前記組成物が加えられる赤血球（RBC）懸濁液のpHを前記組成物が維持する働きをするのに十分な量で存在し、それによって、保存期間中に前記反応平衡でアデノシン三リン酸（ATP）合成が発生」するとの構成（相違点2に係る本願発明の構成）は、「1, 3-DPGからの2, 3-ジホスホグリセレート（DPG）の合成よりも解糖を優先する赤血球内の反応平衡を保存期間中に確立及び維持」し、これにより「保存期間中に前記反応平衡でアデノシン三リン酸（ATP）合成が発生」するのに「十分な量」のpH緩衝系が含まれていることを意味するものと理解できる。

次に、本願明細書（甲19）には、「本発明者らは、ATP合成を最大限にするための手掛かりがRBCの細胞内のpHを7.2に到達させることなく、できる限りその近くに維持することであると発見した。…2, 3-DPGの合成速度は、pHに比例する。pHが7.2よりも高い場合は、前記合成は著しく行われるが、それよりも低い場合は、低下する。」（段落【0031】）、「pHが7.2のときには、ラパポート・シャント（Rappaport shunt）（…）として知られる機構が起きる。この機構では、1, 3-DPGから2, 3-DPGが合成され、ATP合成に必要なリン酸が消費され、解糖的に2分子のATPを合成する解糖ステップが回避される。系に対するこの機構の正味の影響は、ATPの枯渇である。細胞内pHが

7. 2未満である場合は、シャントは効果的に遮断され、ATP合成が最大限になる。」（段落【0032】）、「本発明に係る組成物の実施形態では、pH緩衝系は、1, 3-DPGからの2, 3-ジホスホグリセレート（DPG）の合成よりも解糖を優先する赤血球内の反応平衡を保存期間中に確立及び維持するのに十分な量の組成物が加えられる赤血球懸濁液のpHを前記組成物が維持する働きをするのに十分な量で存在し、それによって、保存期間中に反応平衡でATP合成が発生する。本発明に係る組成物のある具体的な実施形態では、組成物は、その組成物が加えられた赤血球（RBC）懸濁液のpHを約6.4～7.4の間に維持する働きがある。」

（段落【0033】）との記載がある。上記記載によれば、本願発明の「1, 3-DPGからの2, 3-ジホスホグリセレート（DPG）の合成よりも解糖を優先する赤血球内の反応平衡を保存期間中に確立及び維持」し、これにより「保存期間中に前記反応平衡でATP合成が発生」するようにするためには、赤血球細胞（RBC）内のpHを7.2に到達することなく、できる限りその近くに維持することが必要であること、具体的な実施形態として、本願発明の組成物は、赤血球細胞（RBC）を含む赤血球懸濁液のpHを約6.4～7.4の間に維持する働きがあることを理解することができる。

したがって、本願明細書には、本願発明のpH緩衝系の「十分な量」とは、「保存期間中に赤血球懸濁液のpHを約6.4～7.4の間に維持することができる量」を含むことが開示されているものと認められる。

#### イ 引用発明における赤血球懸濁液のpHについて

刊行物1（原文甲1・訳文乙1）には、①「赤血球の保存は代謝エネルギーの絶え間ない供給を必要とする。このエネルギーは主に解糖から得られる（14）。その充足度は赤血球ATP濃度として測定され得る。流通している添加液中での水溶液保存の典型的な条件下、4mモルのグルコー

スが6週間で消費される。その結果、8 mモルの乳酸塩とプロトンが生産され、そして懸濁液のpHは7.0から6.4まで低下する(10)。最終的なpHにおいて、解糖は著しく遅くなり、赤血球ATP濃度は2.5  $\mu$ モル/g Hb以下に減少し、そして膜損傷が増加する。…」、「より長い保存はアルカリ性の添加液を使うことによって達成されることができ、その結果、保存はより高いpHで始まる。pHが7.0を上回ると、いっそう速い解糖が使用量を超過するATP生産量を導き、赤血球ATP濃度は保存の第1週に上昇する。ヘモグロビンは7.0を上回るpHにおいてより良い緩衝剤であり、増加した酸負担量はpHのより少ない減少により滴定される(17)。しかしながらpHが7.2を上回る場合、解糖は、結果として生じる細胞内無機リン酸の枯渇とATP生産の阻害を伴い、2,3DPG生産に転用される(18)。pH操作の範囲は小さい。」(以上、原文870頁右欄・訳文8頁～9頁)、②「増加した解糖が、体積と添加液の緩衝能を増加させることにより、受け入れられ得る。本研究では、30 mEq/lの重炭酸ナトリウムの添加が9 mmolのプロトンをバッファリングし、ヘモグロビンによりバッファリングされた8に加えて、12週間の間、6.6を上回るpHと、3  $\mu$ モル/gヘモグロビンを上回る赤血球ATP濃度が維持されるようになる。…」(原文871頁右欄・訳文9頁)との記載がある。

上記記載は、「添加液の緩衝能」を増加させることにより、「増加した解糖」によって「ATP生産量」を導き、「ATP濃度」を上昇させ、あるいは一定の濃度に維持させることを示すものであり、「添加液の緩衝能」によって、「1,3-DPGからの2,3-ジホスホグリセレート(DPG)の合成よりも解糖を優先する赤血球内の反応平衡を保存期間中に確立及び維持」することにより「保存期間中に前記反応平衡でアデノシン三リン酸(ATP)合成が発生」することを開示するものといえる。

また、刊行物1には、引用発明（EAS-76v6）を用いて赤血球を12週間保存した場合について、「細胞外pHはすべてのグループで等しく、そしてすべてのグループで12週間の保存の間に7.2から6.6まで減少した（図1C）。」（原文870頁左欄・訳文7頁）との記載がある。上記記載は、保存期間中に、細胞外pHすなわち赤血球懸濁液のpHが6.6から7.2までの間に維持されたことを開示するものといえる。

#### ウ 検討

前記ア及びイによれば、本願発明のpH緩衝系の「十分な量」とは、「保存期間中に赤血球懸濁液のpHを約6.4～7.4の間に維持することができる量」を含むものであり、引用発明におけるpH緩衝系の量は、保存期間中に赤血球懸濁液のpHを6.6から7.2までの間に維持することができる量であり、「約6.4～7.4の間」と範囲が重複することが認められる。

そうすると、引用発明におけるpH緩衝系の上記量は、本願発明のpH緩衝系の「十分な量」に含まれるものといえる。

したがって、相違点2は、実質的な相違点とはいえない。

#### エ 原告の主張について

原告は、本願発明は、相違点2に係る本願発明の構成と「前記組成物は、外部由来の塩化物イオンを含まないこと」等の他の発明特定事項と協働して、本願明細書の段落【0072】記載のとおり、「一般的に本発明に係るEAS-81で保存された細胞は、AS-3で保存された細胞と比較して、エネルギー利用が優れており、それによりATP濃度が高く、溶血の程度が低く、形態が優れており、微小胞が少なく、pHがわずかに高かった。」という効果を奏するとともに、使用される容量が多いために、保存RBCがさらに希釈され、大量に輸血される患者に対して血液希釈を引き起こしかねない。」という刊行物1記載のEAS-76v6における問題

を解決したものであり、本願明細書の段落【0061】の表1（別紙本願明細書図面参照）によれば、本願発明の実施形態であるEAS-81の使用量は110mLであるのに対して、刊行物1記載のEAS-76v6の使用量は170mLであり、本願発明は、塩化物イオンを含まないことによりpH緩衝系の量を調整することができ、赤血球に添加される水性組成物の量を減らすことができるから、相違点2は、引用発明との実質的な相違点である旨主張する。

しかしながら、原告が挙げる、本願発明は、塩化物イオンを含まないことによりpH緩衝系の量を調整することができ、赤血球に添加される水性組成物の量を減らすことができるとの点は、本願発明の「外部由来の塩化物イオンを含まない」構成による効果をいうものであり、pH緩衝系の量が「十分な量」かどうかの構成に係る相違点2が実質的な相違点かどうかとは別個の問題であるというべきである。

したがって、原告の上記主張は理由がない。

#### (4) 小括

以上によれば、相違点2は実質的な相違点ではないとの本件審決の判断は、その結論において誤りはないから、原告主張の取消事由1は理由がない。

#### 2 取消事由2（相違点3の判断の誤り）について

原告は、本件審決は、相違点3について、アデニン、デキストロース、マンニトール、リン酸のナトリウム塩を含む赤血球長期保存水溶液であって、塩化ナトリウムを含まないものが、本願の出願前に周知であったことからすると、当業者であれば、塩化ナトリウムを必須の成分であると認識していたものとはいえず、引用発明について、刊行物1において低減することが強く動機付けられる塩化ナトリウムの低減をさらにすすめることにより、これを含まない組成とすることが、当業者にとって格別困難であったとはいえない旨判断したが、刊行物1に接した当業者は、刊行物1記載の全ての組成物（赤血球長期保存溶

液) について塩化ナトリウムは必須の成分であると考えから、引用発明の組成物EAS-76v6について、塩化ナトリウムを含まない構成とする動機付けはなく、かえって、引用発明の組成物EAS-76v6から塩化ナトリウムを除去することには阻害事由があり、また、アデニン、デキストロース、マンニトール、リン酸のナトリウム塩を含む赤血球長期保存水溶液であって、塩化ナトリウムを含まないものが、本願の出願前に周知であったということはできないから、本件審決の上記判断は誤りである旨主張するので、以下において判断する。

(1) 周知技術について

ア 本願出願前に、アデニン、デキストロース、マンニトール、リン酸のナトリウム塩を含む赤血球長期保存水溶液であって、塩化ナトリウムを含まないものが周知であったかどうかについて判断する。

(ア) 刊行物A(甲2)には、「19. 請求の範囲第15項に記載の赤血球保存法であって、添加液が、約2mMのアデニン、約110mMのデキストロース、約65mMのマニトール、約20mMのクエン酸ナトリウム、および、約20mMのリン酸二水素ナトリウムを含むが、塩化ナトリウムは含まない水溶液から成ることを特徴とする酸素除去・添加剤使用による赤血球長期保存法。」(5頁4行～8行)、「OFAS1添加液は、FDA承認溶液AS-1(現在の処方では2mMのアデニン、122mMのデキストロース、42mMのマニトール、および、154mMの塩化ナトリウム)、および、AS-3(現在の処方では2.2mMのアデニン、61mMのデキストロース、70mMの塩化ナトリウム、20mMのクエン酸ナトリウム、2mMのクエン酸、および、20mMのリン酸水素ナトリウム)に見られる組成を含むが、新規の組成を全く含まない。しかしながら、OFAS1溶液は塩化ナトリウムを含まない。OFAS1液のpHは、水酸化ナトリウムの添加により約7.1に調整される。もちろん、この目的を達する

のに他の塩基を使用してもよい。」（12頁11行～19行）との記載がある。

(イ) 刊行物B（甲3）には、「5. クエン酸ナトリウム、リン酸二水素ナトリウム、リン酸二ナトリウム、アデニン及びマンニトールよりなり300mOsm/l未満の浸透圧を有する、水性の赤血球貯蔵溶液。」

（1頁左欄）、「本発明は赤血球を懸濁し及び貯蔵するための水性溶液を提供する。該溶液は、クエン酸ナトリウム、リン酸二水素ナトリウム及びリン酸二ナトリウムとの組み合わせ、アデニン及びマンニトールを含有する。好ましくは、該溶液は生理学的pHである約7.4に調整されている。…該溶液はまた、低浸透圧に処方されている。従って、好ましくは該溶液は塩化ナトリウムを含有しない。」（4頁左下欄1行～7行）、「好ましくは、溶液は塩化ナトリウムを含まない。しかしながら、生理学的浸透圧より僅かに大きい浸透圧を提供するためには、溶液中に最低量の塩化ナトリウムが存在していてよい」（6頁左欄9行～11行との記載がある。

(ウ) 刊行物C（甲4）には、「6. 工程（b）における該生物学的に適合しうる貯蔵緩衝液が塩化物イオンを欠いている請求項1の方法。」（1頁右欄）、「本発明はさらに、輸血可能な赤血球の保存期間を延長する方法であって、実質的に塩化物を含有せず、少なくとも1種の実質的に非透過性溶質を含有する、機能的に低張で、生物学的に適合する緩衝溶液中上記血球を洗浄および貯蔵することを含む方法を提供する。」（4頁右下欄14行～5頁左上欄1行）、「表2 赤血球の血液内pHを上昇させることができる生物学的に適合した緩衝液の実例」として、「グルコース、クエン酸ナトリウム、 $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ 、 $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 、アデニン、マンニトール」からなる「ARC30」（8頁右欄）の記載がある。

- (エ) 甲 2 3 (Blood, 1973, vol. 42, No.1, p17-25) には、血液保存液として、  
「101.4 mMの重炭酸ナトリウム、14.3 mMの炭酸ナトリウム、  
55 mMのグルコース、1 mMのアデニン、2 mMのリン酸ナトリウム、  
及び27.4 mMのマンニトールを含む溶液」である「BAGPM液」  
(原文18頁1行～3行・訳文1頁) の記載がある。
- (オ) 乙 2 (Transfusion, 1971, vol. 11, No.3, p123-133) には、赤血球の保  
存に用いる人工培地の組成について、「種々の実験培地を試験した。培  
地の作成は以前の報告<sup>19</sup>に従った。グルコース以外の培地成分をすべて  
混合し、NaOHを用いてpHを7.0から7.6の範囲で調整した。  
グルコースについてはカラメル化反応を避けるため単独で加圧滅菌した  
後に培地に加えた。アデニンの濃度はすべての培地で赤血球-保存液混合  
物における最終濃度が1 mMとなるように調整した。すべての培地のNa<sup>+</sup>  
イオン濃度は特に指示がない限り0.120から0.130Mであ  
る。グルコース濃度は55 mM、つまりACD液中に採取された血液の  
約2倍の量で存在する。リン酸イオン濃度は5～60 mMの範囲であり、  
HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>が存在する培地以外では残りの陰イオンはCl<sup>-</sup>である。」、  
「すべての保存液は最終濃度1 mMのアデニンを含む。各濃縮赤血球に  
対して、上記に示した場合を除き同量の人工培地を加えた。人工培地中  
のナトリウムは、130 mMのNaHCO<sub>3</sub>を含む培地を除き0.12  
から0.13 Mの濃度で存在した。130 mMのNaHCO<sub>3</sub>を含む培  
地ではNa<sup>+</sup>濃度は0.14 Mであった。」(原文123頁標題, 12  
4頁右欄17行～39行, 128頁の表3及びその脚注・訳文1頁),  
「ドナーN. O., A. O. 及びR. W. のものに、130 mLのNa  
HCO<sub>3</sub> (重炭酸ナトリウム) を含む培地を供給した結果、最終的なp  
Hは高くなった。しかしながら、これは、生存能力の一貫した増加を伴  
わなかった。」(原文129頁左欄27行～31行, 訳文甲21参照)

との記載がある。

(カ) 乙3 (特開昭63-63616号公報) には、「クエン酸ナトリウム10mM, リン酸水素二ナトリウム・二水和物6mM, アデニン0.5mM, マルトース130mM, グルコース15mM, L-アルコールビン酸-2-リン酸エステルマグネシウム塩30mM」からなる赤血球濃厚液の保存用液(3頁右下欄第2表), 「また, 浸透圧の調整のために塩化ナトリウムを必要量加えることも可能である。」(3頁右上欄6行~8行)との記載がある。

(キ) 乙4 (特開昭63-146824号公報) には、「赤血球と等張(280~350mO s.) となるように塩化ナトリウムで浸透圧調整するのが好ましい。」(3頁右上欄4行~6行), 「血液保存及び賦活用薬剤組成液」(実施例3)として、「マンニトール23.66g(130ミリモル), クエン酸トリナトリウム2.58g(10ミリモル), リン酸二水素ナトリウム・2水和物0.94g(6ミリモル), アデニン0.068g(0.5ミリモル)及びホスホエノールピルビン酸モノナトリウム・1水和物10.40g(50ミリモル)」を水に溶解した, 1リットル水溶液(3頁右下欄18行~4頁左上欄7行)の記載がある。

イ 前記アの各文献には, いずれも赤血球保存液が記載されており, 当該赤血球保存液は塩化ナトリウムあるいは塩化物イオンを含まないものである。

しかるところ, 赤血球保存液は, 一般に, 赤血球とほぼ等張となるような浸透圧に調整されており(乙4), 塩化ナトリウムは, 赤血球保存液において, 浸透圧調整の役割を果たす成分として用いられている(乙3, 4)。

そして, 上記のように塩化ナトリウムを含まない赤血球保存液に関する複数の文献が存在すること及びその記載内容からすると, 本願出願当時, 塩化ナトリウム以外の成分により浸透圧が所望の範囲となる場合には, 塩

化ナトリウムは、添加する必要のない任意成分であると認識されていたものと認められる。

加えて、上記各文献のいずれにも、塩化ナトリウムあるいは塩化物イオンの有無が、赤血球保存液におけるpH緩衝系の成分の種類と直接関連することをうかがわせる記載はない。

以上によれば、赤血球保存液に含まれるpH緩衝系の成分の種類によることなく、塩化ナトリウムあるいは塩化物イオンを含まない赤血球保存液は、本願出願当時、周知であったことが認められる。

ウ 原告は、これに対し、①pH緩衝系は、その成分や適用される水溶液の性質によって、その能力は変動し、赤血球長期保存水溶液に塩化ナトリウムを含まない目的や、他の含有成分との関係も様々であるから、仮に特定の成分を有する赤血球長期保存水溶液において塩化ナトリウムを含まない構成が周知であったとしても、塩化ナトリウムを含まないことを赤血球長期保存水溶液の含有成分と分離した単独の特徴として把握することは困難である、②刊行物AないしC記載の赤血球長期保存水溶液には、本願発明が含有する「重炭酸アニオンを提供する物質」が含まれておらず、また、乙2には、培地の正確な組成が掲載されていないため、外部由来の塩化物イオンを含まない培地の開示はなく、仮に乙2に重炭酸アニオンを含み、塩化ナトリウムを含まない赤血球長期保存水溶液の開示があるとしても、乙2の公知文献のみから、上記赤血球長期保存水溶液が周知であったということとはできないとして、刊行物AないしC及び乙2から、アデニン、デキストロース、マンニトール、リン酸のナトリウム塩を含む赤血球長期保存水溶液であって、塩化ナトリウムを含まないもの一般について本願の出願日前に周知であったということとはできない旨主張する。

しかしながら、塩化ナトリウムあるいは塩化物イオンを含まない赤血球保存液が周知であったことは、前記イのとおりであり、pH緩衝系は、そ

の成分や適用される水溶液の性質によって、その能力は変動し、赤血球長期保存水溶液に塩化ナトリウムを含めない目的や、他の含有成分との関係も様々であることは、上記周知技術を認定する妨げとなるものではない。

また、甲23には、「重炭酸アニオンを提供する物質」である「重炭酸ナトリウム」を含み、塩化ナトリウムを含まない赤血球保存液が記載されている。

さらに、乙2の「 $\text{HCO}_3^-$ が存在する培地以外では残りの陰イオンは $\text{Cl}^-$ である。」（124頁右欄34～36行）との記載は、 $\text{HCO}_3^-$ が存在する培地では、残りの陰イオンとして $\text{Cl}^-$ （塩化物イオン）は含まれていないことを積極的に示唆するものであり、乙2における培地、すなわち赤血球保存液において塩化物イオンが必須の成分として含まれているわけではないことを示すものといえる。

したがって、原告の上記主張は採用することができない。

## (2) 引用発明における塩化ナトリウムの機能について

刊行物1（原文甲1・訳文乙1）には、表1に記載された塩化ナトリウム濃度を45.0mMから30.0mMまで低下させた他は同じ組成である保存液を作成し、赤血球を12週間保存したところ、「結果：より低い塩の型のEAS-76中に保存された赤血球は、より少ない溶血と微小胞形成で、より高い赤血球ATP濃度を有していた。赤血球2,3-DPGは2週間維持された。12週間EAS-76v6中に保存された赤血球は、 $78 \pm 4\%$ の24時間の生体での回収率を示した。」（原文867頁左欄・訳文1頁）、「本研究では、EAS-76中の塩化ナトリウム濃度を45mMから30mMに下げたときに、溶血および微小胞形成の少ない、良好な赤血球ATPおよび2,3-DPGの維持が得られる結果となることを示すデータを提示する。この溶液（実験添加液76バリエーション6（EAS-76v6）と呼ぶ）中で保存された赤血球は、二重標識法を用いたクロスオーバー研究で、12

週間保存後に、許容される24時間生体内回収率を示した。」(原文868頁左欄・訳文3頁)との記載がある。

また、塩化ナトリウムの量を45.0mMから30.0mMまで低下させた保存液について、「…より低張のEAS-76の型の添加…(図2A)」(原文870頁左欄・訳文7頁)との記載がある。

刊行物1の上記各記載によれば、刊行物1には、pH緩衝系として重炭酸ナトリウムとリン酸2ナトリウムを含み、さらにアデニン、デキストロース、マンニトール及び塩化ナトリウムを含む赤血球保存液において、塩化ナトリウムの濃度を45mMから30mMまで低下させて「より低張」すなわち浸透圧をより低くした組成物を用いて赤血球を12週間保存すると、良好な赤血球ATPおよび2,3-DPGの維持が得られ、 $78 \pm 4\%$ の生体での24時間回収率を示したことが記載されているものと認められる。

そうすると、刊行物1から、引用発明における塩化ナトリウムは、その濃度を調節すれば浸透圧を調節することができる成分であることを理解することができる。

他方で、刊行物1には、塩化ナトリウムあるいは塩化物イオンが、赤血球の保存のために必要不可欠な成分であることについての記載や示唆はない。

### (3) 相違点3の容易想到性について

ア 前記(1)イ認定のとおり、本願出願当時、塩化ナトリウムは、赤血球保存液において、浸透圧調整の役割を果たす成分として用いられていたこと、塩化ナトリウム以外の成分により浸透圧が所望の範囲となる場合には、塩化ナトリウムは、添加する必要のない任意成分であると認識されていたこと、赤血球保存液に含まれるpH緩衝系の成分の種類によることなく、塩化ナトリウムあるいは塩化物イオンを含まない赤血球保存液は周知であったことが認められる。

また、前記(2)認定のとおり、刊行物1には、塩化ナトリウム濃度を調節

すれば浸透圧を調節できることが記載されているが、塩化ナトリウムあるいは塩化物イオンが、赤血球の保存のために必要不可欠な成分であることについての記載や示唆はない。

そうすると、刊行物1（甲1）に接した当業者は、引用発明において、塩化ナトリウムは赤血球保存のために必須の成分ではなく、他の成分により浸透圧を所望の範囲に調節すれば必ずしも添加する必要がないことを認識するものといえるから、引用発明において、塩化ナトリウムを使用せず、その他の成分で浸透圧を引用発明と同程度に調節したものとし、その結果「外部由来の塩化物イオンを含まない」組成としたとしても、赤血球保存液として十分機能するものと考え、引用発明において、塩化ナトリウムを除去して、上記周知の「外部由来の塩化物イオンを含まない」構成（相違点3に係る本願発明の構成）を採用することを容易に想到することができたものというべきである。

イ 原告は、これに対し、①刊行物1記載の全ての組成物（赤血球長期保存溶液）は、塩化ナトリウム濃度が最低のEAS-76v6でさえ、その濃度は30mMであって、30mM以上の塩化ナトリウムを含むため（甲1の表1及び表3）、「外部由来の塩化物イオン」を含むものであり、また、刊行物1には、赤血球長期保存溶液において、塩化ナトリウムを「30mM」から「0」とし、「外部由来の塩化物イオンを含まない構成」とすることについては記載も示唆もないから、刊行物1に接した当業者は、刊行物1記載の全ての組成物（赤血球長期保存溶液）について塩化ナトリウムは必須の成分であると考え、②そうすると、引用発明の組成物EAS-76v6について、塩化ナトリウムを含まない構成（相違点3に係る本願発明の構成である「外部由来の塩化物イオンを含まない」構成）とする動機付けはなく、かえって、引用発明の組成物EAS-76v6から塩化ナトリウムを除去することには阻害事由があるとして、当業者は、引用発明

において、塩化ナトリウムを除去して、「外部由来の塩化物イオンを含まない」構成（相違点3に係る本願発明の構成）を採用することを容易に想到することができたものとはいえない旨主張する。

しかしながら、前記アで認定したとおり、甲1に接した当業者は、引用発明において、塩化ナトリウムを赤血球保存のために必須の成分として認識することはなく、他の成分により浸透圧を所望の範囲に調節すれば必ずしも添加する必要がないことを認識し、引用発明において、塩化ナトリウムを使用せず、その他の成分で浸透圧を引用発明と同程度に調節したものとし、その結果「外部由来の塩化物イオンを含まない」組成としたとしても、赤血球保存液として十分機能するものとするものといえるから、引用発明において、塩化ナトリウムを除去して、本願出願前に周知であった「外部由来の塩化物イオンを含まない」構成を採用することを容易に想到することができたものと認められる。

したがって、原告の上記主張は理由がない。

#### (4) 小括

以上によれば、引用発明において塩化ナトリウムを含まない組成とすることは当業者にとって格別困難であったとはいえないとした本件審決の相違点3の判断に誤りはないから、原告主張の取消事由2は、理由がない。

### 3 結論

以上の次第であるから、原告主張の取消事由はいずれも理由がなく、本願発明は刊行物1に記載された発明及び周知技術に基づいて当業者が容易に発明をすることができたとした本件審決の判断に誤りはないから、本件審決にこれを取り消すべき違法は認められない。

したがって、原告の請求は棄却されるべきものである。

裁判長裁判官 富 田 善 範

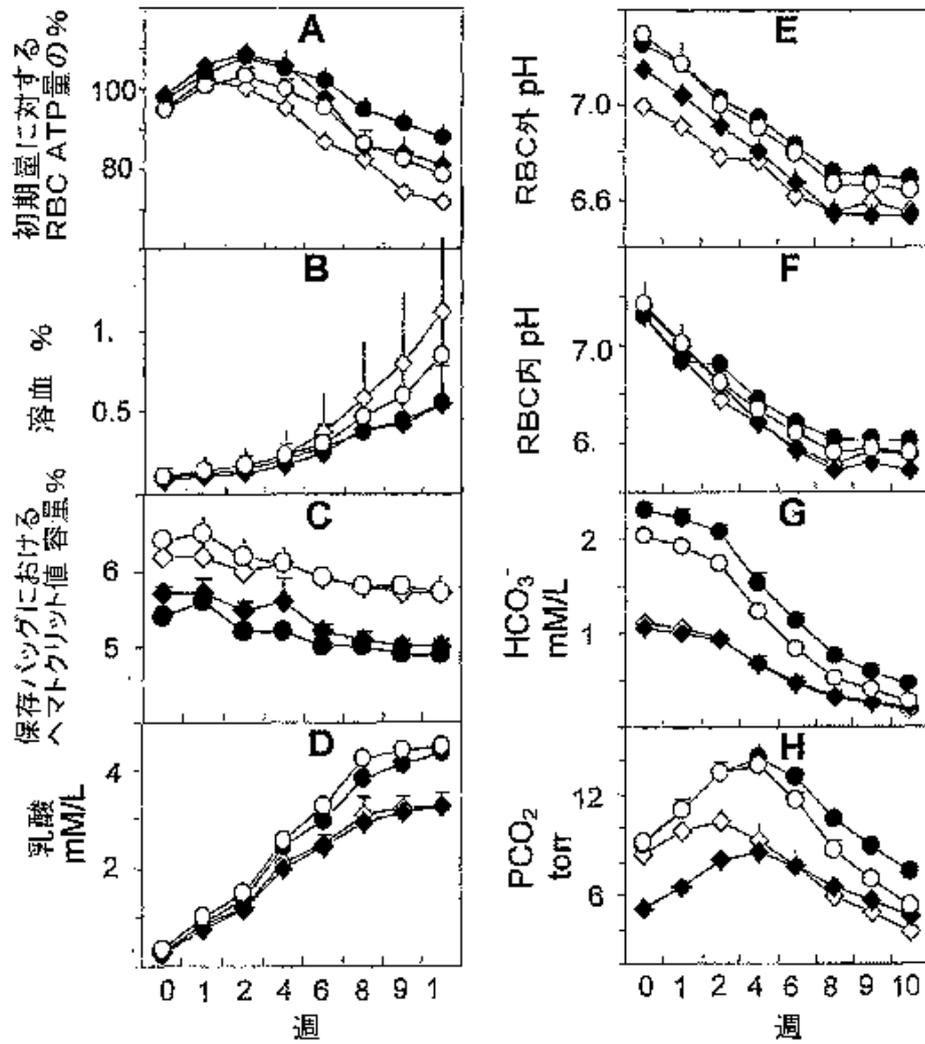
裁判官 大 鷹 一 郎

裁判官 鈴 木 わ か な

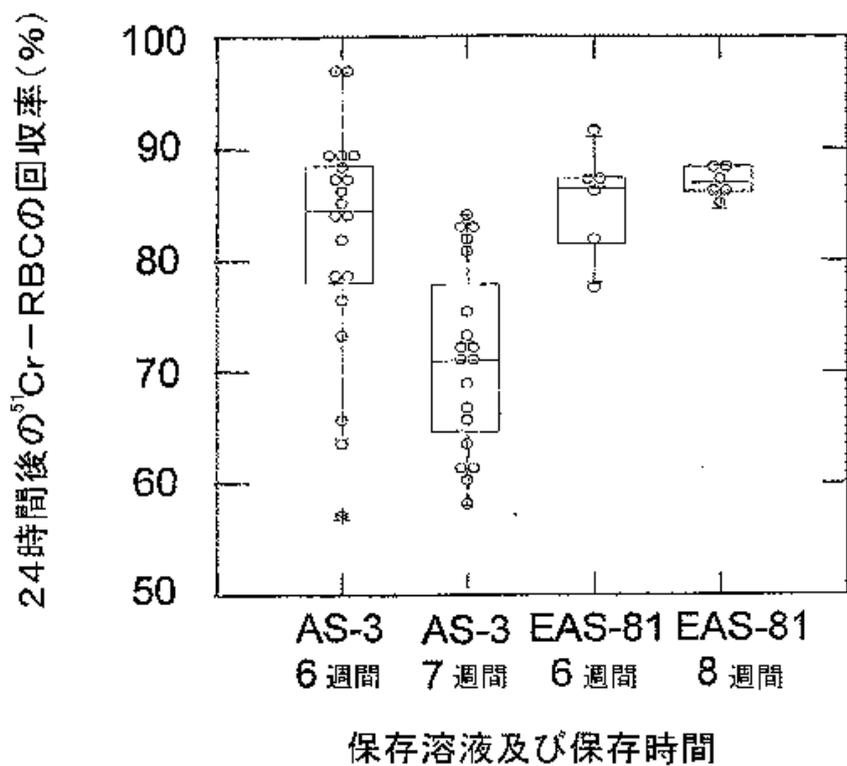
(別紙)

本願明細書図面

【図1】



【図 2】



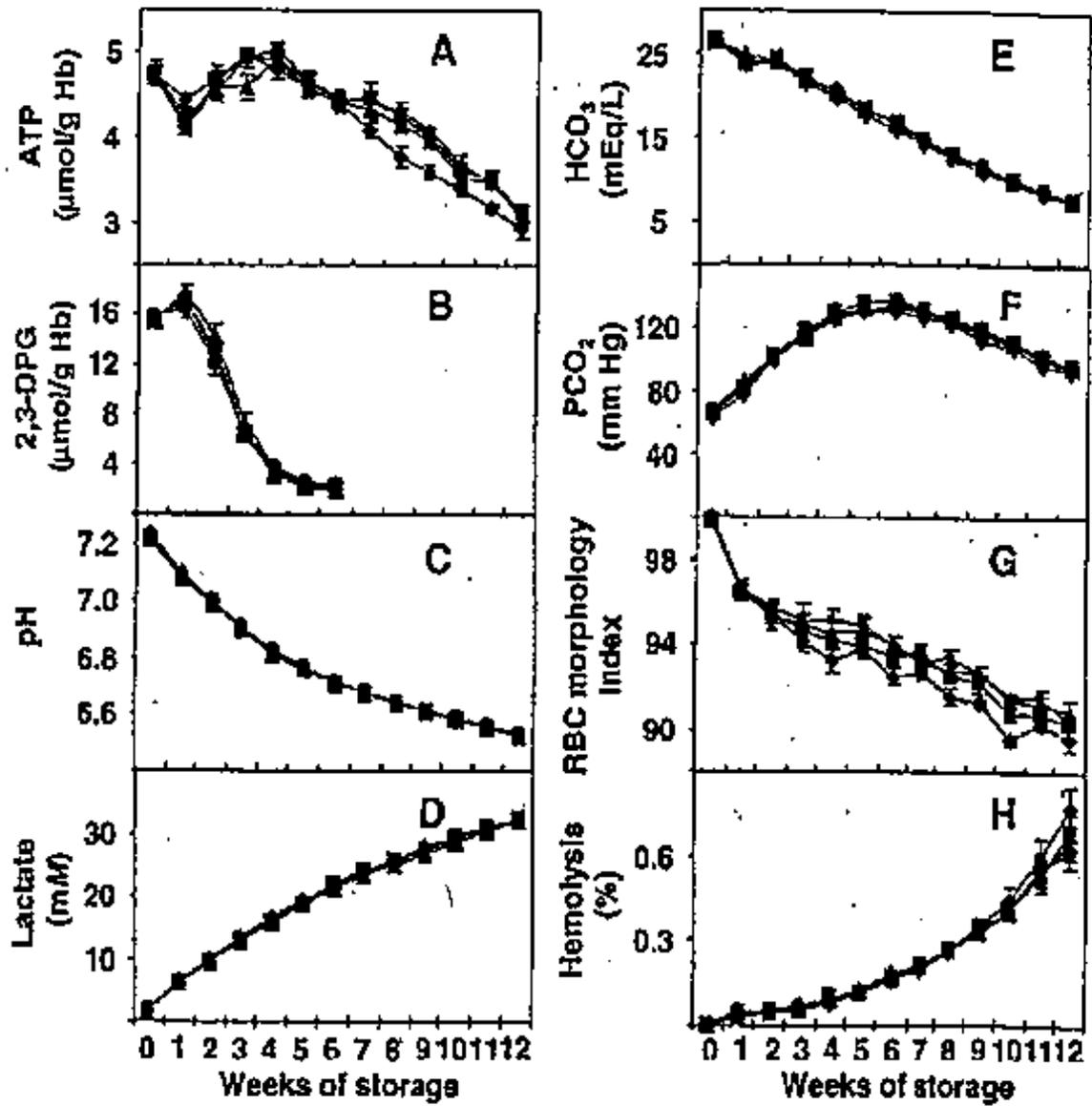
【表 1】

	AS-3	EAS-61	EAS-76v6	EAS-81
NaCL	70	26	30	
NaHCO <sub>3</sub>			30	26
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	23			
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>		12	9	12
アデニン	2	2	2	2
クエン酸ナトリウム	18			
デキストロース	55	110	50	80
マンニトール		55	30	55
容量	110	170	170	110
pH	5.8	8.3	8.4	8.5

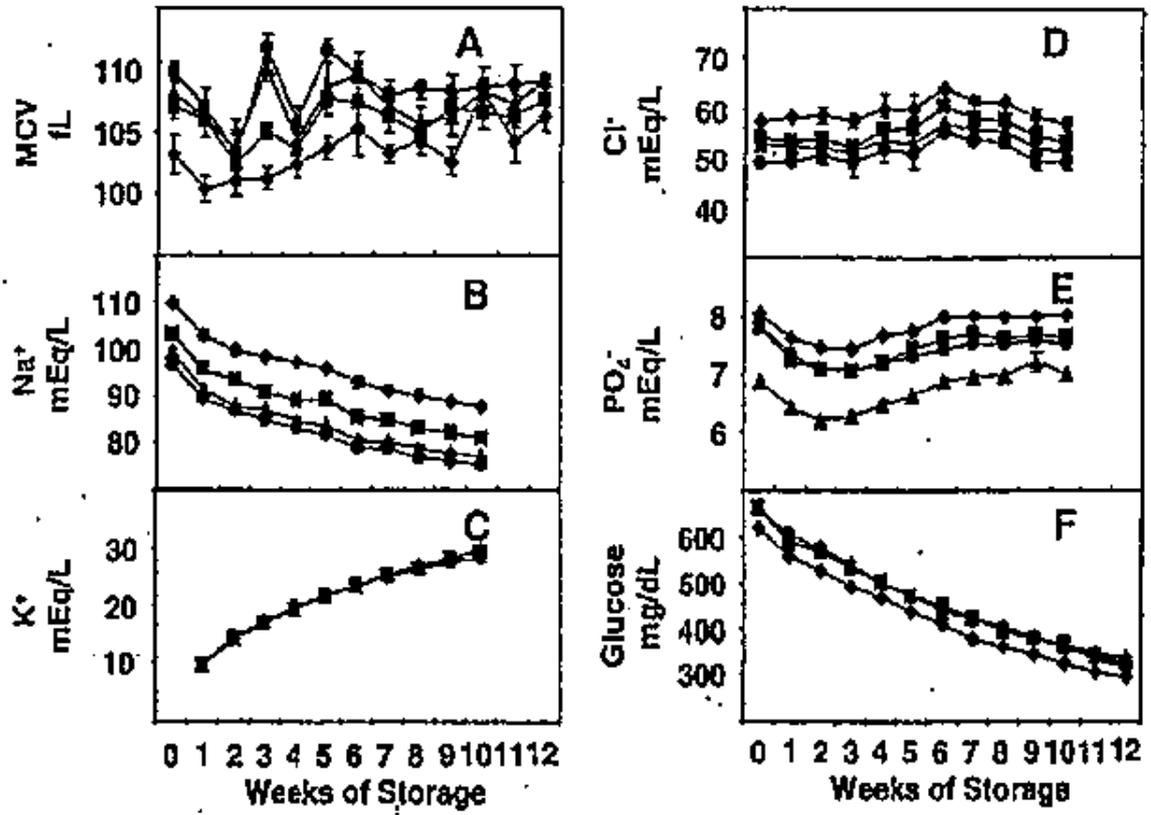
(別紙)

甲 1 図面

【 図 1 】



【图 2】



【图 3】

